

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 359**

51 Int. Cl.:

B01D 59/44 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2009 PCT/US2009/031020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09091841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2009 E 09702741 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2242561**

54 Título: **Composiciones y procesos para un mejor análisis de espectrometría de masas**

30 Prioridad:
15.01.2008 US 14671

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2017

73 Titular/es:
**AGENA BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
4755 Eastgate Mall
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:
BECKER, THOMAS

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 601 359 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

Composiciones y procesos para un mejor análisis de espectrometría de masas

5 La invención se refiere, en general, a composiciones y métodos para su uso con espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una poderosa herramienta analítica utilizada para la medición de la masa molecular de los analitos en una muestra. Cuando se utiliza un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, la velocidad de vuelo de los iones es de aproximadamente 10^7 veces más rápida que la velocidad de migración de las moléculas en un gel electroforético, por lo tanto, la espectrometría de masas ofrece un método de análisis extremadamente rápido, incluso cuando la medición del espectro se repite de 10 a 100 veces para lograr una buena relación señal-ruido.

El análisis por espectrometría de masas normalmente comienza con la ionización de las muestras por cualquiera de una serie de medios, por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) o ionización por electropulverización (ES). Los procedimientos de preparación y medición MALDI consisten en primer lugar en la imbibición de las moléculas de analito en un soporte de muestras en una matriz sólida o líquida absorbente de radiación IR o UV que generalmente es un ácido orgánico. El soporte de la muestra que comprende la matriz y el analito se coloca en la fuente de iones de un espectrómetro de masas. La matriz se vaporiza por un pulso de láser corto y por lo tanto la molécula de analito se transporta a la fase gaseosa en un estado no fragmentado. La molécula de analito se ioniza por el choque y reacciona con los iones de la matriz generados al mismo tiempo. Se aplica una tensión que acelera los iones en un tubo de vuelo de campo libre. Debido a sus diferentes masas, los iones en la fuente de iones se aceleran a diferentes velocidades con los iones más pequeños que llegan al detector antes que los iones más grandes. Los tiempos de vuelo variables se convierten en las diferentes masas de los iones.

Un método alternativo para ionizar un analito es la electropulverización (o ES). Como el MALDI, la electropulverización permite la ionización/vaporización de moléculas polares. Inicialmente, la muestra de interés se disuelve en un disolvente que, en cierta medida, existirá en una forma ionizada. En ES convencionales, la solución se bombea a través de un capilar fino que se eleva a un alto potencial. Las pequeñas gotas cargadas se pulverizan desde el capilar ES en un gas de baño a presión atmosférica y descienden por un gradiente de presión y potencial hacia un orificio en el sistema de alto vacío del espectrómetro de masas. A medida que las gotas atraviesan este camino, se desolvatan y reducen su tamaño de tal manera que las fuerzas de Coulomb superficiales superan las fuerzas de tensión superficial. Como resultado, las gotitas se rompen en gotitas más pequeñas hasta que un ion se desorbe de la gotita o el disolvente se elimina por completo. El mecanismo exacto de la formación de iones no es del todo claro, pero el resultado es un haz de iones, que se muestrean por el espectrómetro de masas. Una descripción más detallada del proceso de ES se proporciona en *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications* editado por Cole (John Wiley and Sons, Nueva York).

Cualquiera que sea el método de ionización utilizado, la formación de aductos no deseados durante la ionización puede comprometer la calidad y la resolución de los espectros generados por espectrometría de masas. Más específicamente, la presencia de aductos no deseados puede hacer que un analito sea difícil de detectar y analizar, especialmente los analitos de baja masa o en baja cantidad. O'Brien (Actas de la 50^a Conferencia ASMS sobre Espectrometría de Masas y Temas Afines, Orlando, Florida, 2-6 de Junio de 2002) describe la detección por espectrometría de masas de aductos de proteínas polifenólicos. Ayorinde et al. (Rapid Communications in Mass Spectrometry 2003; 17: 1735-1742) describe la detección de azúcares, ácidos ascórbicos, ácido cítrico y benzoato de sodio en bebidas no alcohólicas por espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.

La presente invención se define en las reivindicaciones. Se describen procesos y composiciones para mejorar el análisis por espectrometría de masas. En el presente documento se proporcionan métodos de preparación de muestras de espectros de masa que reduzcan o minimicen la formación de aductos de manera rentable y fácil de poner en práctica que por lo demás no altere la ionización, el análisis de masas o la detección de iones de la muestra. Los métodos y composiciones mejorados de la invención permiten la identificación y cuantificación fáciles de los picos de analitos, lo que aumenta el número de llamadas correctas. Estas mejoras resultan particularmente útiles para muestras contaminadas con sal de sodio y/o amoníaco, así como muestras con concentraciones bajas de analito. En ciertas realizaciones, se describe a continuación el uso de ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo, como aditivo aducto reductor que disminuye la presencia de aductos en los espectros de masas, y aumenta la relación señal a ruido (s/r). Aunque las realizaciones de la invención se refieren en lo sucesivo al uso de "ácido ascórbico", se entiende que la persona experta en la técnica puede utilizar el ácido ascórbico, ascorbato, una sal del mismo, un tautómero del mismo o un análogo del mismo (descrito más adelante) en métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Se describe un método para reducir la formación de aductos en una muestra que comprende un analito a ser analizado por espectrometría de masas que comprende la etapa de añadir un aditivo reductor de aducto, que comprende ácido ascórbico, a la muestra antes del análisis del analito por espectrometría de masas. En una realización relacionada, el aditivo reductor de aducto puede comprender además oxalato de amonio. El aditivo reductor de aducto se puede utilizar en combinación con otros aditivos reductores de aducto (aditivos reductores de

aducto conocidos o aún no descubiertos). El aditivo reductor de aducto se puede utilizar en combinación con una o más resinas.

5 El analito es un ácido nucleico tal como el ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. Las mejoras descritas en el presente documento se pueden aplicar a una variedad de formatos de espectrometría de masas como procedimientos de manipulación de muestras antes de que el análisis de masas pueda generar aductos indeseables. Ejemplos de formatos de espectrometría de masas incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas (MS) de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), espectrometría de masas por desorción láser (LDMS), MS con electropulverización (ES), MS de resonancia con ion ciclotrón (ICR), y MS por transformada de Fourier. Las mejoras descritas en el presente documento son fácilmente aplicables a los formatos de espectrometría de masas en los que se el analito se volatiliza y se ioniza ("MS de ionización", por ejemplo, MS MALDI-TOF, LDMS, ESMS).

15 También se describe un método para reducir la formación de aductos en una muestra que comprende un analito a ser analizado por espectrometría de masas que comprende la etapa de añadir un aditivo reductor de aducto, que comprende ácido ascórbico, a una matriz antes del análisis del analito por espectrometría de masas. El método también puede comprender la etapa adicional de añadir el aditivo reductor de aducto al analito (así como la matriz) antes del análisis del analito por espectrometría de masas. El aditivo reductor de aducto puede comprender además oxalato de amonio. En algunas realizaciones, la composición de matriz comprende ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), citrato de diamonio (DAC), o una combinación de los mismos. El analito es un ácido nucleico tal como el ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico. El aditivo reductor de aducto también se puede añadir al analito.

25 Se describen métodos para la preparación de un sustrato adecuado para su uso en la espectrometría de masas que comprende la etapa de depositar un material matriz que comprende un aditivo reductor de aducto sobre el sustrato, en el que el aditivo reductor de aducto comprende ácido ascórbico. El aditivo reductor de aducto puede comprender además oxalato de amonio. El método puede comprender además la etapa de sellar el sustrato. Los métodos de sellado de un sustrato incluyen, pero no se limitan a, las condiciones influidas por procesos de envasado, tales como sellado al vacío y sellado por calor, por ejemplo. El método puede comprender además la etapa de tratar el sustrato con un agente o gas para minimizar la oxidación. El sustrato se puede lavar con un gas inerte, por ejemplo argón, antes del sellado. El sustrato se puede sellar y/o empaquetar para limitar o eliminar la exposición a la luz o la radiación UV antes del análisis por espectrometría de masas. El sustrato se puede sellar y/o empaquetar para mantener un pH dado. Los sustratos se pueden empaquetar en un recipiente, incluyendo sin limitación, un recipiente de polímero (por ejemplo, recipiente de polietileno, polipropileno, poliestireno). El sustrato puede comprender sílice o dióxido de silicio.

35 También se describen composiciones para ser analizadas por espectrometría de masas que comprenden un analito y un aditivo reductor de aducto. El aditivo reductor de aducto comprende ácido ascórbico. El aditivo reductor de aducto puede comprender además oxalato de amonio.

40 Se describe una composición adecuada para el análisis por espectrometría de masas que comprende un analito y un aditivo reductor de aducto, en el que el aditivo comprende el ácido ascórbico. La composición también puede comprender oxalato de amonio.

45 Se describe un sitio diana para la espectrometría de masas que comprende un sustrato y un aditivo reductor de aducto que comprende ácido ascórbico. El sitio diana también puede comprender oxalato de amonio. El sitio diana puede comprender además un material de matriz. El material de matriz se puede pre-cargar en el sustrato. El sitio diana puede comprender además un analito. La composición se puede sellar. Los métodos de sellado de sustratos incluyen, pero no se limitan a, sellado al vacío y sellado por calor. La composición se puede tratar con un agente o gas para minimizar la oxidación. La composición se puede lavar con un gas inerte, por ejemplo argón, antes del sellado. La composición se puede sellar y/o empaquetar para limitar o eliminar la exposición a la luz o radiación UV. La composición se puede sellar y/o empaquetar para mantener un pH dado.

55 También se describe un método para la preparación de un analito para el análisis por espectrometría de masas, que comprende: (a) poner en contacto una solución que comprende un analito con una composición que comprende ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo, preparando de este modo una muestra para el análisis por espectrometría de masas; y (b) la introducción de la muestra a un espectrómetro de masas. La composición también puede comprender oxalato de amonio. El analito a veces es un ácido nucleico, incluyendo, pero no limitado a un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y similar, o una combinación de los mismos. El análisis por espectrometría de masas se puede seleccionar del grupo que consiste de: espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), espectrometría de masas por desorción láser (LDMS), espectrometría de masas por electropulverización (ES), espectrometría de masas de resonancia con ion ciclotrón (ICR), y espectrometría de masas por transformada de Fourier. La composición puede comprender ácido ascórbico, y la composición puede no comprender un análogo del ácido ascórbico.

65 En el presente documento también se proporciona un método para el análisis de un analito mediante espectrometría de masas, que comprende: (a) introducir una muestra en un espectrómetro de masas, en el que la muestra comprende un analito y ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo; y (b) el análisis de la muestra

mediante espectrometría de masas, en el que dicho análogo es como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la muestra comprende, además, oxalato de amonio. El analito es un ácido nucleico, incluyendo, pero no limitado a un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y similar, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la muestra comprende un analito y ácido ascórbico.

En el presente documento también se proporciona un sustrato que comprende una matriz de puntos, en el que cada punto comprende (i) espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y (ii) ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo, matriz y análogo que son tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, cada punto comprende además oxalato de amonio, y en ciertas realizaciones, uno o más de los puntos comprenden, además, un analito. El analito es un ácido nucleico, incluyendo, pero no limitado a un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico y similar, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la matriz comprende ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), u otra matriz adecuada para el análisis de un ácido nucleico mediante espectrometría de masas MALDI. Las composiciones de puntos que incluyen ácido ascórbico y una matriz (por ejemplo, 3-HPA) pueden absorber la luz ultravioleta (por ejemplo, absorben la luz UV de aproximadamente 220 nm a aproximadamente 300 nm (por ejemplo, de aproximadamente 260 nm a aproximadamente 270 nm; 266 nm)). La matriz puede comprender un componente adecuado para la proteína o péptido por espectrometría de masas MALDI, incluyendo, pero no limitado a, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido alfa-ciano-3-hidroxi-cinámico, y ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico. En ciertas realizaciones, el sustrato es un chip (por ejemplo, un chip de silicio). Cada punto puede comprender ácido ascórbico, y cada punto puede no comprender un análogo del ácido ascórbico.

Ejemplos del análisis por espectrometría de masas que se pueden mejorar por los métodos y composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, secuenciación, genotipado o análisis por metilación de ácidos nucleicos. El análisis puede ser un análisis cualitativo o cuantitativo realizado por espectrometría de masas.

La FIG. 1 muestra un espectro de masas generado utilizando un oligonucleótido sintético de 17 meros (GTG GTG GTG GTG GTG GT) detectado directamente sobre la matriz convencional sin modificar. En la figura, se identificó la presencia de un aducto de amoniaco (la altura del pico es de aproximadamente el 12 % del pico principal a 5335 Da).

La FIG. 2 muestra un espectro de masas generado utilizando el mismo oligonucleótido sintético de 17 meros (GTG GTG GTG GTG GTG GT) detectado directamente sobre la matriz modificada con ácido ascórbico. Como se ve en la figura, el aducto de amoniaco ya no está presente.

La FIG. 3 muestra un espectro de masas generado a partir de un producto de extensión del gen RhD visto sobre una matriz convencional sin modificar que resulta en un pico de extensión a 7571 Da y un pico del aducto + 55 Da ($\text{NH}_3 + \text{K}$) a 7626 Da. El pico del aducto genera una llamada de inserción falso positivo (RSR: 2; Probabilidad: 88 %).

La FIG. 4 muestra un espectro de masas generado a partir de un producto de extensión del gen RhD visto sobre la matriz modificada con ácido ascórbico que resulta en un pico de extensión a 7571 Da, pero sin ningún pico de aducto + 55 Da. Se elimina la llamada de inserción falso positivo (RSR: 0; Probabilidad: 0 %).

La espectrometría de masas ofrece una forma muy precisa y sensible para medir la masa molecular de analitos tales como ácidos nucleicos y péptidos. La espectrometría de masas de esta manera proporciona una herramienta poderosa para el análisis de moléculas de otro modo difíciles de medir. Sin embargo, la presencia de productos de aductos no deseados puede hacer que un analito sea difícil de detectar y analizar con precisión, especialmente analitos de baja masa o en baja cantidad. El problema se agrava aún más cuando se detectan varios analitos en un solo espectro de masas como parte de la reacción de multiplexado.

Los aductos se forman cuando los iones, normalmente cationes, se asocian a biomoléculas en condiciones de espectrometría de masas, creando así picos de masa no deseados. Cualquier parte del procesamiento de la muestra (por ejemplo, la bioquímica, la manipulación de la muestra, la dispensación de muestra, etc.), la limpieza de la muestra (por ejemplo, la adición de resina), la ionización de la muestra, o la detección de la muestra puede contribuir a la formación de aductos.

En el caso de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), el propio material de la matriz puede servir como fuente de formación de aductos. Por ejemplo, a menudo se utiliza una mezcla de ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) y citrato de diamonio (DAC) como matriz UV eficaz para el análisis de ácidos nucleicos basado en MALDI. Las sales de amonio (por ejemplo, DAC) se añaden a las matrices, y al 3-HPA en particular, porque se sabe que reducen aún más la formación de aducto catiónico a ADN de cadena sencilla (ssDNA) (Wu, JK, et al., Rapid Comm. Mass Spectrom 1993, 7, 191.; Pieles, et al., Nucleic Acid Research, 1993, 21, 14, 3191). Sin embargo, los resultados proporcionados en el presente documento indican que el DAC es la principal fuente para la formación de aductos de amoniaco (NH_3). Por ejemplo, la Figura 1 muestra la presencia de un pico de masa de aducto de NH_3 a + 17 Da de los espectros de masas.

Otro factor que contribuye a la formación de aducto de amoniaco es la resina de intercambio catiónico amoniaco, que se puede utilizar para desalar el analito antes del análisis MALDI (Nordhoff, E., et al., Rapid Comm. Mass Spectrom. 1992, 6, 771). Como se describe en los Ejemplos a continuación, los aductos de amoniaco se forman

predominantemente con bases de guanina y timina. Por lo tanto, estos aductos son más pronunciados en ensayos en los que los analitos de ácido nucleico son ricos en estas bases.

Además, la resina de intercambio catiónico con amoniaco puede no eliminar por completo todos los iones de sodio de la cadena principal del ADN. Esta falta de eliminación da lugar a un pico de masa de aducto de iones de sodio a + 22 Da. Otros aductos se pueden formar a partir del material de la matriz, y pueden ser más comunes en presencia de bases de timina. Por ejemplo, cuando como matriz se utiliza el ácido 3-hidroxipicolínico, se encuentran picos de masa de aducto a 94, 138, y 188 Da. Juntos, todos estos picos de aductos pueden dar lugar a una mala interpretación de los resultados de la espectrometría de masas. Por lo tanto composiciones y procesos que reducen en gran medida la cantidad y frecuencia de los aductos, en especial aductos alcalinos y de amoniaco, son útiles para mejorar la precisión, la sensibilidad y el rendimiento del análisis basado en espectrometría de masas. La presencia de un aditivo reductor de aducto puede reducir, o abrogar, un pico de aducto presente en una muestra analizada sin aditivo reductor de aducto. Como se muestra en el presente documento, se ha demostrado que la adición de ácido ascórbico reduce la puntuación promedio de formación de aductos (definido en el presente documento) en hasta un 40 % en comparación con una matriz convencional tratada con resina a intensidades de productos de extensión comparables (véanse los Ejemplos 1-3). Además, la matriz modificada con aditivo de ácido ascórbico ha demostrado ser física y químicamente estable durante un período de 6 meses (véase el Ejemplo 4) que permite que los sustratos se traten previamente con ácido ascórbico durante la fabricación.

Analito

Se describe la mejora del análisis basado en espectrometría de masas de analitos tales como ácidos nucleicos, (por ejemplo, oligonucleótidos y polinucleótidos), proteínas, péptidos y lípidos, incluyendo sus análogos y conjugados particulares, tales como glicoproteínas o lipoproteínas. Otras sustancias que pueden ser susceptibles de análisis MALDI dentro de las presentes enseñanzas son moléculas pequeñas, metabolitos, productos naturales y productos farmacéuticos. Los métodos y composiciones de la presente invención son particularmente útiles para polinucleótidos que comprenden una mayoría de guaninas y timinas ya que estos polinucleótidos son más susceptibles a la formación de aducto de amoniaco.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos de cadena sencilla y/o de doble cadena, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), así como análogos o derivados del ARN o ADN. También se incluye en el término "ácido nucleico" análogos de ácidos nucleicos tales como ácido nucleico peptídico (PNA), ADN fosforotioato, nucleótidos acíclicos y otros de dichos análogos y derivados o combinaciones de los mismos.

Los análogos de nucleótidos contenidos en un polinucleótido pueden ser, por ejemplo, los nucleótidos de masa modificada, que permiten la diferenciación de la masa de los polinucleótidos; nucleótidos que contienen un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, radiactivo, luminiscente o quimioluminiscente, que permite la detección de un polinucleótido; o nucleótidos que contienen un grupo reactivo, tal como biotina o un grupo tiol, que facilita la inmovilización de un polinucleótido a un soporte sólido. Un polinucleótido también puede contener uno o más enlaces a la cadena principal que se pueden escindir selectivamente, por ejemplo, química, enzimática o fotolíticamente. Por ejemplo, un polinucleótido puede incluir uno o más desoxirribonucleótidos, seguidos de uno o más ribonucleótidos, que pueden ir seguidos por uno o más desoxirribonucleótidos, una secuencia de este tipo que se puede escindir en la secuencia de ribonucleótidos por hidrólisis básica. Un polinucleótido también puede contener uno o más enlaces que son relativamente resistentes a la escisión, por ejemplo, un cebador de oligonucleótido quimérico, que puede incluir nucleótidos unidos por enlaces de ácidos nucleicos peptídicos y al menos un nucleótido en el extremo 3', que está unido por un enlace fosfodiéster, o similar, y se puede extender por una polimerasa.

Muestra

Tal como se usa en el presente documento, "muestra" se refiere a una composición que contiene un analito a analizar. En ciertas realizaciones, la muestra es de una "muestra biológica". Un material biológico en general se considera cualquier material obtenido de una fuente viva (por ejemplo, un ser humano, animal, planta, bacteria, hongo, protista, virus). La muestra biológica puede estar en cualquier forma, incluyendo materiales sólidos (por ejemplo, tejidos, sedimentos celulares y biopsias) y fluidos biológicos (por ejemplo, orina, sangre, saliva, líquido amniótico y lavado de la boca (que contienen células bucales)). Preferentemente los materiales sólidos se mezclan con un fluido.

Matriz

El material de la matriz se utiliza en ciertas formas de espectrometría de masas, como la espectrometría MALDI, por ejemplo. El material de la matriz sirve para separar entre sí las moléculas de analito, para absorber la energía conferida por los fotones láser, y para transferir la energía a las moléculas de analito, lo que resulta en su desorción e ionización. Una vez que se ioniza el analito, se puede utilizar un espectrómetro de masas tal como un analizador tiempo de vuelo (TOF) para medir masas de iones.

La elección de un material de matriz para el análisis por espectrometría de masas a menudo depende del tipo de biomoléculas analizadas. Por ejemplo, para el análisis de ácidos nucleicos por espectrometría de masas, una matriz que se utiliza a menudo es una mezcla de ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA) y citrato de diamonio (DAC). Otro material de matriz utilizado para facilitar la ionización de analitos de la muestra es el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). El DHB también sufre de la formación de aductos y la generación de ruido químico que interfiere con el análisis de la muestra. El ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (α -CHCA) es un ejemplo de una matriz ampliamente utilizada para la ionización de analitos de proteínas y péptidos en espectrometría de masas láser asistida por matriz-tiempo de vuelo. Sin embargo, los aductos de α -CHCA son comunes y pueden interferir con la capacidad para detectar con precisión analitos de baja masa y en bajas cantidades. Se describen matrices adicionales que se pueden utilizar con aditivos captadores de radicales libres descritos en el presente documento para el mejor análisis por espectrometría de masas por Li et al. (Rapid Comm. Mass Spectrom. 12:993-998 (1998), M.C. Fitzgerald y L.M. Smith (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1995. 24: 117-40), y Nordhoff et al. (Mass Spectrometry Reviews, 1996, 15, 67-138; todos los cuales se incorporan en el presente documento como referencia), y los ejemplos de matrices incluyen, sin limitación, 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), ácido antranílico, ácido nicotínico, salicilamida, 1-isoquinolinol, T-2-(3-(4-t-butil-fenil)-2-metil-2-propenilideno) malononitrilo (DCTB), ácido sináptico (SA), ditranol (DIT), 3-aminoquinolina, ácido trans-3-indolacrílico (IAA), ácido 2-(4-hidroxifenilazo) benzoico (HABA), ácido succínico, 2,6-dihidroxiacetofenona, ácido ferúlico, ácido cafeico, glicerol y nitroanilina.

El material de matriz puede combinarse con aditivo(s) o analito(s) antes o después de que la matriz se deposite sobre un sustrato. Cuando los analitos están embebidos en una matriz de material absorbente de la luz, la matriz generalmente está presente en exceso con respecto al analito. La incorporación de moléculas de analito en una cierta forma en materiales de matriz normalmente cristalinos durante su cristalización, o al menos en las superficies límite entre los pequeños cristales de la matriz, es ventajosa para el proceso MALDI. El aditivo se puede mezclar primero con el material de la matriz en solución, y la solución de material de matriz/aditivo combinado se deposita sobre el sustrato donde cristaliza.

La matriz se puede depositar sobre el sustrato para formar puntos discretos mediante la disolución de la matriz en una solución que comprende ácido ascórbico y un disolvente adecuado, tal como agua. La solución resultante se deposita sobre el sustrato MALDI y el sustrato se puede colocar en una cámara de vacío de tal manera que la solución de matriz/ácido ascórbico se seca al vacío. El ácido ascórbico puede servir como material de la matriz –solo o en combinación con otras matrices.

Para depositar la matriz, el aditivo o el analito a un sustrato se pueden utilizar varios métodos. En una realización, la aplicación de cada elemento se realiza en pasos separados. Por ejemplo, el material de la matriz se puede precargar sobre un sustrato y el analito se puede añadir en un momento posterior usando un aparato de dispensación de líquido apropiado (por ejemplo, dispositivos de dispensación de una herramienta pin piezoeléctrica). Los elementos se pueden depositar en combinación. Por ejemplo, la matriz y el aditivo se pueden combinar primero (es decir, disueltos en un disolvente) y se pueden depositar juntos sobre el sustrato, seguido de la adición de un analito. Se puede permitir que una matriz o depósito de matriz/aditivo se seque sobre un sustrato, formando cristales de matriz a medida que se evapora el disolvente. La deposición subsiguiente de la solución de analito en la parte superior de la matriz seca da lugar a la disolución parcial del depósito de matriz seca y la co-cristalización de la matriz re-disuelta con el analito.

El aditivo reductor de aducto se puede utilizar directamente como material de matriz, y en algunas realizaciones, el aditivo reductor de aducto se utiliza como componente de un material de matriz. El material de la matriz puede incluir aditivo reductor de aducto y uno o más de los materiales de matriz de espectrometría de masas descritos en el presente documento (por ejemplo, uno o más de 3-HPA, DAC, DHB, CHCA, THAP, DCTB, DIT, SA, IAA, HABA). Cuando se utiliza aditivo reductor de aducto con uno o más materiales de matriz de espectrometría de masas, el aditivo reductor de aducto oscila entre el 99 % y el 1 % en peso del peso total del material de matriz (por ejemplo, aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % en peso del peso total del material de matriz), y algunas veces el aditivo reductor de aducto se encuentra en una relación molar (es decir, moles de aditivo a moles de matriz de espectrometría de masa) de aproximadamente 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3 o 1:2, por ejemplo.

Aditivo

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aditivo reductor de aducto" es una sustancia añadida a uno cualquiera o más de los componentes o reactivos necesarios para el análisis por espectrometría de masas. Estos componentes o reactivos incluyen la muestra, el analito, el material de la matriz, el sustrato o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el aditivo reductor de aducto es ácido ascórbico, o cualquier derivado del mismo con esencialmente el mismo efecto reductor de aducto.

El aditivo reductor de aducto puede ser un captador de radicales libres. Se puede utilizar cualquier captador de radicales libres adecuado para su uso en el análisis por espectrometría de masas, y, en ciertos casos, adecuado para su uso en el análisis por espectrometría de masas de ácidos nucleicos. Ejemplos de captadores de radicales

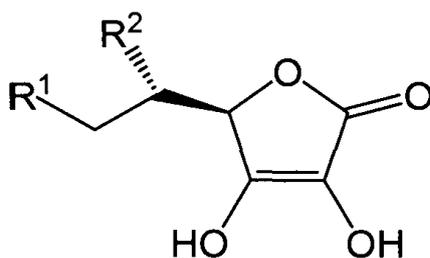
libres incluyen, sin limitación, ácido ascórbico, retinol, tocotrienol, tocoferol, la coenzima Q10, la melatonina, el licopeno, la luteína, el alfa-caroteno, el beta-caroteno, la zeaxantina, la astaxantina, la cantaxantina, flavonas (por ejemplo, luteolina, apigenina, tangeritin), favonoles (por ejemplo, la quercetina, el kaempferol, la miricetina, la isorhamnetina, proantocianidinas), favononas (por ejemplo, hasperetina, naringenina, eriodictiol), los fitoestrógenos de isoflavonas (por ejemplo, la genisteína, la daidzeína, la gliciteína), estilbenoides (por ejemplo, el resveratrol, el pterostilbeno), antocianinas (por ejemplo, cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina), ácidos y ésteres fenólicos (por ejemplo, ácido elágico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido rosmarínico, ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido chicórico, galotaninos, elagitaninos), fenólicos no flavonoides (por ejemplo, la curcumina, xantonas, la silimarina, el eugenol) y antioxidantes orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fítico, lignanos, ácido úrico, N-acetilcisteína). La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente captadores de radicales libres que son adecuados como aditivo o matriz para espectrometría de masas mediante pruebas rutinarias de tales captadores en análisis en paralelo, como se muestra en los Ejemplos en el presente documento.

El aditivo puede estar esencialmente libre de impurezas y por lo tanto no necesita su purificación. Si el aditivo reductor de aducto no es esencialmente puro, se puede purificar por métodos conocidos en la técnica para eliminar las impurezas, por ejemplo, por purificación en resina de intercambio iónico.

El aditivo se puede disolver en forma líquida (por ejemplo, disuelto en agua) y a continuación se puede depositar sobre la matriz precargada o se puede depositar directamente sobre el sustrato sin matriz precargada. Como alternativa, el aditivo puede combinarse con la matriz antes de depositarla sobre el sustrato. El aditivo y la matriz se pueden combinar para obtener una concentración de la matriz de 1 a aproximadamente 20 mg/ml y una concentración de aditivo de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM. El uso de cantidades insuficientes de aditivo no reducirá significativamente la formación de aductos, mientras que el uso de demasiado aditivo puede suprimir las señales originales en los espectros de masas. Los expertos en la técnica son capaces de determinar sin excesiva experimentación la cantidad apropiada de aditivo para optimizar el análisis de un analito en particular mediante la variación de la cantidad de aditivo y determinar el efecto sobre las características espectrales.

El aditivo reductor de aducto se puede utilizar solo o en combinación con otras sustancias que reducen o eliminan la presencia de aductos no deseados. El aditivo de ácido ascórbico se puede combinar con otros aditivos capaces de reducir el ruido de fondo en los espectros de masas. Otros aditivos adecuados conocidos incluyen resina, sales de amonio volátiles, particularmente sales volátiles de amonio monobásico, dibásico o tribásico. Preferentemente, los aditivos de sal no son demasiado básicos como para que interfieran con la muestra que se analiza. Los aditivos pueden ser fosfatos y sulfatos monobásicos (por ejemplo, fosfato de amonio monobásico), y citratos dibásicos (por ejemplo, citrato de amonio dibásico), y citratos tribásicos (por ejemplo, citrato de amonio tribásico).

El aditivo reductor de aducto es ácido ascórbico, ascorbato, una sal del mismo, un tautómero del mismo, o un análogo del ácido ascórbico (incluyendo sales y tautómeros de análogos), que tiene una estructura de acuerdo con la siguiente fórmula:



en la que:

R^1 y R^2 son independientemente OH, halógeno, R^3 , OR^3 , azido, ciano, CH_2R^3 , CHR^3R^4 , SR^3 , NR^3R^4 , y R^3 y R^4 son independientemente H, alquilo, acetileno o ciano, o un anillo carbocíclico de arilo, un anillo heterocíclico de arilo, un anillo carbocíclico no arilo o un anillo heterocíclico no arilo opcionalmente sustituidos. Los análogos del ácido ascórbico usados tal como se usa en el presente documento generalmente son agentes de captación de radicales libres, y la actividad de captación de radicales libres de un análogo del ácido ascórbico se puede determinar por la persona experta en la técnica (por ejemplo, valoración con un agente de oxidación tal como 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), yodo, mezcla de yodato y yoduro o N-bromosuccinimida).

El término "opcionalmente sustituido" como se usa en el presente documento indica que el grupo o grupos particulares descritos pueden no tener sustituyentes distintos del hidrógeno, o el grupo o grupos pueden tener uno o más sustituyentes que no son hidrógeno. Si no se especifica lo contrario, el número total de tales sustituyentes que pueden estar presentes es igual al número de átomos de H presentes en la forma no sustituida del grupo que se describe. Cuando un sustituyente opcional está unido a través de un doble enlace, tal como un oxígeno de carbonilo

(=O), el grupo ocupa dos valencias disponibles, por lo que el número total de sustituyentes que pueden estar incluidos se reduce de acuerdo con el número de valencias disponibles.

5 El ácido ascórbico y sus análogos pueden tener grupos ionizables a fin de poder prepararse en forma de sales. En ese caso, cuando se haga referencia al compuesto, se entiende en la técnica que también se puede utilizar una sal farmacéuticamente aceptable. Estas sales pueden ser sales de adición de ácido que implican ácidos inorgánicos u orgánicos o, en el caso de las formas ácidas de los compuestos de la invención, las sales pueden prepararse a partir de bases inorgánicas u orgánicas. Con frecuencia, los compuestos se preparan o utilizan como sales farmacéuticamente aceptables preparadas como productos de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables. Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la técnica, tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, bromhídrico, acético, láctico, cítrico, o tartárico para formar sales de adición de ácido, y el hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, la cafeína, varias aminas, y similares para formar sales básicas. Los métodos para la preparación de las sales apropiadas están bien establecidos en la técnica. En algunos casos, los compuestos pueden contener tanto un ácido como un grupo funcional básico, en cuyo caso se pueden tener dos grupos ionizados y, sin embargo, no tener carga neta.

15 Los análogos del ácido ascórbico a menudo contienen uno o más centros quirales. La invención incluye cada una de las formas estereoisoméricas aisladas, así como mezclas de estereoisómeros en diversos grados de pureza quiral, incluyendo mezclas racémicas. También abarca los diversos diastereómeros y tautómeros que se pueden formar. También pueden existir los compuestos de la invención en más de una forma tautomérica; la representación en el presente documento de un tautómero es solo por conveniencia, y también se entiende que abarca otros tautómeros de la forma mostrada.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "alquilo", "alqueno" y "alquino" incluyen radicales hidrocarbilo monovalentes de cadena lineal, de cadena ramificada y cíclica, y combinaciones de estos, que contienen solo C y H cuando están sin sustituir. Los ejemplos incluyen metilo, etilo, isobutilo, ciclohexilo, ciclopentiletilo, 2-propenilo, 3-butenilo, y similares. El número total de átomos de carbono en cada uno de estos grupos a veces se describe en el presente documento, por ejemplo, cuando el grupo puede contener hasta diez átomos de carbono que pueden representarse por C₁₋₁₀ o como C_{1-C₁₀} o C₁₋₁₀. Cuando se permiten heteroátomos (normalmente N, O y S) para sustituir átomos de carbono, como en los grupos heteroalquilo, por ejemplo, los números que describen el grupo, aunque todavía escrito por ejemplo como C_{1-C₆}, representan la suma del número de átomos de carbono en el grupo más el número de dichos heteroátomos que se incluyen como sustitutos de los átomos de carbono en la cadena principal del anillo o de la cadena descritos.

25 Normalmente, los sustituyentes alquilo, alqueno y alquino de la invención contienen un 10C (alquilo) o dos 10C (alqueno o alquino). Preferentemente contienen un 8C (alquilo) o dos 8C (alqueno o alquino). A veces contienen un 4C (alquilo) o dos 4C (alqueno o alquino). Un solo grupo puede incluir más de un tipo de enlace múltiple, o más de un enlace múltiple; tales grupos se incluyen dentro de la definición del término "alqueno" cuando contienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y se incluyen dentro del término "alquino" cuando contienen al menos un triple enlace un carbono-carbono.

30 Los grupos alquilo, alqueno y alquino con frecuencia están opcionalmente sustituidos en la medida en que dicha sustitución tenga sentido químicamente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero no se limitan a, halo, =O, =N-CN, =N-OR, =NR, OR, NR₂, SR, SO₂R, SO₂NR₂, NRSO₂R NRCONR₂, NRCOOR, NRCOR, CN, COOR, CONR₂, OOCR, COR, y NO₂, en las que cada R es independientemente H, alquilo C_{1-C₈}, heteroalquilo C_{2-C₈}, acilo C_{1-C₈}, heteroacilo C_{2-C₈}, alqueno C_{2-C₈}, heteroalqueno C_{2-C₈}, alquino C_{2-C₈}, heteroalquino C_{2-C₈}, arilo C_{6-C₁₀} o heteroarilo C_{5-C₁₀}, y cada R está opcionalmente sustituido con halo, =O =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'SO₂R' NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR', y NO₂, en las que cada R' es independientemente H, alquilo C_{1-C₈}, heteroalquilo C_{2-C₈}, acilo C_{1-C₈}, heteroacilo C_{2-C₈}, arilo C_{6-C₁₀} o heteroarilo C_{5-C₁₀}. Los grupos alquilo, alqueno y alquino también pueden estar sustituidos con acilo C_{1-C₈}, heteroacilo C_{2-C₈}, arilo C_{6-C₁₀} o heteroarilo C_{5-C₁₀}, cada uno de los cuales puede estar sustituido con los sustituyentes que son apropiados para el grupo particular.

35 Los sustituyentes "acetileno" son grupos alquino C₂₋₁₀ que están opcionalmente sustituidos, y son de la fórmula -C=C-Ra, en el que Ra es H o alquilo C_{1-C₈}, heteroalquilo C_{2-C₈}, alqueno C_{2-C₈}, heteroalqueno C_{2-C₈}, alquino C_{2-C₈}, heteroalquino C_{2-C₈}, acilo C_{1-C₈}, heteroacilo C_{2-C₈}, arilo C_{6-C₁₀}, heteroarilo C_{5-C₁₀}, arilalquilo C_{7-C₁₂}, o heteroarilalquilo C_{6-C₁₂}, y cada grupo Ra está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halo, =O, =N-CN, =N-OR', =NR', OR', NR'₂, SR', SO₂R', SO₂NR'₂, NR'SO₂R', NR'CONR'₂, NR'COOR', NR'COR', CN, COOR', CONR'₂, OOCR', COR', y NO₂, en las que cada R' es independientemente H, alquilo C_{1-C₆}, heteroalquilo C_{2-C₆}, acilo C_{1-C₆}, heteroacilo C_{2-C₆}, arilo C_{6-C₁₀}, heteroarilo C_{5-C₁₀}, arilalquilo C₇₋₁₂, o heteroarilalquilo C₆₋₁₂, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados entre halo, alquilo C_{1-C₄}, heteroalquilo C_{1-C₄}, acilo C_{1-C₆}, heteroacilo C_{1-C₆}, hidroxilo, amino, y =O; y en el que dos R' pueden estar unidos para formar un anillo de 3-7 miembros que contiene opcionalmente hasta tres heteroátomos seleccionados entre N, O y S. En algunas realizaciones, Ra de -C=C-Ra es H o Me.

65

"Heteroalquilo", "heteroalquenilo", y "heteroalquinilo" y similares se definen de manera similar a los grupos hidrocarbilo correspondientes (alquilo, alquenilo y alquinilo), pero los términos "hetero" se refieren a grupos que contienen de uno a tres heteroátomos de O, S o N o combinaciones de los mismos dentro del resto de la cadena principal; por lo tanto al menos un átomo de carbono de un alquilo, alquenilo, o alquinilo correspondiente se sustituye con uno de los heteroátomos especificados para formar un grupo heteroalquilo, heteroalquenilo, o heteroalquinilo. Los tamaños típicos y preferidos para las heteroformas de los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo generalmente son las mismas que para los grupos hidrocarbilo correspondientes, y los sustituyentes que pueden estar presentes sobre las heteroformas son los mismos que los descritos anteriormente para los grupos hidrocarbilo. Por razones de estabilidad química, también se entiende que, a menos que se especifique lo contrario, tales grupos no incluyen más de dos heteroátomos contiguos, excepto cuando un grupo oxo está presente sobre N o S como en un grupo nitro o sulfonilo.

Aunque "alquilo" como se usa en el presente documento incluye grupos cicloalquilo y cicloalquilalquilo, el término "cicloalquilo" se puede usar tal como se usa en el presente documento para describir un grupo carbocíclico no aromático que está conectado a través de un átomo de carbono anular, y "cicloalquilalquilo" se puede utilizar para describir un grupo carbocíclico no aromático que está conectado a la molécula a través de un enlazador alquilo. Del mismo modo, "heterociclilo" se puede usar para describir un grupo cíclico no aromático que contiene al menos un heteroátomo como miembro del anillo y que está conectado a la molécula a través de un átomo del anillo, que puede ser C o N; y "heterociclilalquilo" se puede usar para describir un grupo tal que está conectado a otra molécula a través de un enlazador. Los tamaños y sustituyentes que son adecuados para el grupo cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo, y heterociclilalquilo son los mismos que los descritos anteriormente para los grupos alquilo. Tal como se usa en el presente documento, estos términos también incluyen anillos que contienen uno o dos dobles enlaces, siempre que el anillo no sea aromático.

Tal como se usa en el presente documento, "acilo" incluye grupos que comprenden un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o arilalquilo unido en una de las dos posiciones de valencia disponibles de un átomo de carbono carbonílico, y heteroacilo se refiere a los grupos correspondientes en los que al menos un carbono que no sea el carbono carbonílico se ha reemplazado por un heteroátomo seleccionado entre N, O y S. Por lo tanto heteroacilo incluye, por ejemplo, $-C(=O)OR$ y $-C(=O)NR_2$, así como $-C(=O)$ -heteroarilo.

Los grupos acilo y heteroacilo están unidos a cualquier grupo o molécula a la que se unen a través de la valencia abierta del átomo de carbono carbonílico. Normalmente, son grupos acilo C_1-C_8 , que incluyen formilo, acetilo, pivaloilo, y benzoilo, y grupos heteroacilo C_2-C_8 , que incluyen metoxiacetilo, etoxicarbonilo, y 4-piridinilo. Los grupos hidrocarbilo, grupos arilo, y heteroformas de tales grupos que comprenden un grupo acilo o heteroacilo pueden estar sustituidos con los sustituyentes descritos en el presente documento como sustituyentes adecuados en general para cada uno de los componentes correspondientes del grupo acilo o heteroacilo.

Resto "aromático" o resto "arilo" se refiere a un resto monocíclico o bicíclico condensado que tiene las características conocidas de aromaticidad; los ejemplos incluyen fenilo y naftilo. Del mismo modo, "heteroaromático" y "heteroarilo" se refieren a tales sistemas de anillos bicíclicos condensados que contienen como miembros del anillo monocíclico uno o más heteroátomos seleccionados entre O, S y N. La inclusión de un heteroátomo permite la aromaticidad en anillos de 5 miembros así como en anillos de 6 miembros. Los sistemas heteroaromáticos típicos incluyen grupos aromáticos C_5-C_6 monocíclicos tales como piridilo, pirimidilo, pirazinilo, tienilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, tiazolilo, oxazolilo, e imidazolilo y los restos bicíclicos condensados formados por la fusión de uno de estos grupos monocíclicos con un anillo de fenilo o con cualquiera de los grupos monocíclicos heteroaromáticos para formar un grupo bicíclico C_8-C_{10} tal como indolilo, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, isoquinolilo, quinolilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, pirazolopiridilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, cinolinilo, y similares. En esta definición está incluido cualquier sistema de anillo monocíclico o bicíclico condensado que tenga las características de aromaticidad en términos de distribución de electrones a lo largo del sistema de anillo. También incluye grupos bicíclicos en los que al menos el anillo que está unido directamente al resto de la molécula tiene las características de aromaticidad. Por lo general, los sistemas de anillos contienen anillos de 5-12 átomos. Preferentemente, los heteroarilos monocíclicos contienen de 5-6 miembros en el anillo, y los heteroarilos bicíclicos contienen de 8-10 miembros en el anillo.

Los restos arilo y heteroarilo pueden estar sustituidos con una variedad de sustituyentes que incluyen alquilo C_1-C_8 , alquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , arilo C_5-C_{12} , acilo C_1-C_8 , y heteroformas de los mismos, cada uno de los cuales puede estar a su vez adicionalmente sustituido; otros sustituyentes para restos arilo y heteroarilo incluyen halógeno, OR, NR_2 , SR, SO_2R , SO_2NR_2 , $NRSO_2R$, $NRCONR_2$, $NRCOOR$, $NRCOR$, CN, COOR, $CONR_2$, OOCR, COR, y NO_2 , en el que cada R es independientemente H, alquilo C_1-C_8 , heteroalquilo C_2-C_8 , alquenilo C_2-C_8 , heteroalquenilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , heteroalquinilo C_2-C_8 , arilo C_6-C_{10} , heteroarilo C_5-C_{10} , arilalquilo C_7-C_{12} , o heteroarilalquilo C_6-C_{12} , y cada R está opcionalmente sustituido como se ha descrito anteriormente para los grupos alquilo. Los grupos sustituyentes en un grupo arilo o heteroarilo, por supuesto, pueden estar sustituidos adicionalmente con los grupos descritos en el presente documento como adecuados para cada tipo de dichos sustituyentes o para cada componente del sustituyente. Así, por ejemplo, un sustituyente arilalquilo puede estar sustituido en la porción arilo con sustituyentes descritos en el presente documento como típicos para grupos arilo, y puede estar adicionalmente

sustituido en la porción alquilo con sustituyentes descritos en el presente documento como típicos o adecuados para los grupos alquilo.

Del mismo modo, "arilalquilo" y "heteroarilalquilo" se refieren a sistemas de anillos aromáticos y heteroaromáticos que están unidos a su punto de unión a través de un grupo de unión tal como un grupo alquileno, incluyendo enlazadores sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, cíclicos o acíclicos. Normalmente, el enlazador es alquilo C₁-C₈ o una forma hetero del mismo. Estos enlazadores también pueden incluir un grupo carbonilo, lo que los hace capaces de proporcionar los sustituyentes como un resto acilo o heteroacilo. Un anillo de arilo o heteroarilo en un grupo arilalquilo o heteroarilalquilo puede estar sustituido con los mismos sustituyentes descritos anteriormente para los grupos arilo. Preferentemente, un grupo arilalquilo incluye un anillo fenilo opcionalmente sustituido con los grupos definidos anteriormente para los grupos arilo y un alquileno C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con uno o dos grupos alquilo C₁-C₄ o grupos heteroalquilo, en los que los grupos alquilo o heteroalquilo opcionalmente se pueden ciclar para formar un anillo tal como ciclopropano, dioxolano, u oxaciclopentano. Del mismo modo, un grupo heteroarilalquilo incluye, preferentemente, un grupo heteroarilo monocíclico C₅-C₆ que está opcionalmente sustituido con los grupos descritos anteriormente como sustituyentes típicos en los grupos arilo y un alquileno C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con uno o dos grupos alquilo C₁-C₄ o grupos heteroalquilo, o incluye un anillo fenilo opcionalmente sustituido o un heteroarilo monocíclico C₅-C₆ y un heteroalquileno C₁-C₄ que no está sustituido o está sustituido con uno o dos grupos alquilo o heteroalquilo C₁-C₄, en los que los grupos alquilo o heteroalquilo opcionalmente se pueden ciclar para formar un anillo tal como ciclopropano, dioxolano, u oxaciclopentano.

Cuando un grupo arilalquilo o heteroarilalquilo se describe como opcionalmente sustituido, los sustituyentes pueden estar sobre la porción alquilo o heteroalquilo o sobre la porción arilo o heteroarilo del grupo. Los sustituyentes opcionalmente presentes sobre la porción alquilo o heteroalquilo son los mismos que los descritos anteriormente para grupos alquilo en general; los sustituyentes opcionalmente presentes sobre la porción arilo o heteroarilo son los mismos que los descritos anteriormente para los grupos arilo en general.

Grupos "arilalquilo" como se usa en el presente documento son grupos hidrocarbilo, si están sin sustituir, y se describen por el número total de átomos de carbono en el anillo y el enlazador alquileno o similar. Así, un grupo bencilo es un grupo arilalquilo C₇, y feniletilo es un arilalquilo C₈.

"Heteroarilalquilo", como se ha descrito anteriormente se refiere a un resto que comprende un grupo arilo que está unido a través de un grupo de unión, y se diferencia de "arilalquilo", en que al menos un átomo del anillo del resto arilo o un átomo en el grupo de unión es un heteroátomo seleccionado entre N, O y S. Los grupos heteroarilalquilo se describen en el presente documento de acuerdo con el número total de átomos en el anillo y el enlazador combinados, e incluyen grupos arilo unidos a través de un enlazador heteroalquilo; grupos heteroarilo unidos a través de un enlazador de hidrocarbilo tal como un grupo alquileno; y grupos heteroarilo unidos a través de un enlazador heteroalquilo. Así, por ejemplo, heteroarilalquilo C₇ incluiría piridilmetilo, fenoxi, y N-pirrolilmetoxi.

"Alquileno" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un grupo hidrocarbilo divalente; debido a que es divalente, puede unir otros dos grupos juntos. Normalmente se refiere a -(CH₂)_n- en la que n es 1-8 y preferentemente n es 1-4, aunque cuando se especifique, un alquileno también puede estar sustituido con otros grupos, y puede tener otras longitudes, y las valencias abiertas no tienen que estar en extremos opuestos de una cadena. De este modo -CH(Me)- y -C(Me)₂- también se pueden denominar alquilenos, al igual que un grupo cíclico tal como ciclopropano-1,1-diilo. Cuando se sustituye un grupo alquileno, los sustituyentes incluyen aquellos normalmente presentes en los grupos alquilo como se describe en el presente documento.

En general, cualquier grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo, o arilo o arilalquilo o cualquier heteroforma de uno de estos grupos que esté contenida en un sustituyente puede a su vez estar opcionalmente sustituida con sustituyentes adicionales. La naturaleza de estos sustituyentes es similar a los indicados en relación a los propios sustituyentes primarios si los sustituyentes no se describen de otra manera. Por lo tanto, cuando una forma de realización de, por ejemplo, R⁷ es alquilo, este alquilo puede estar opcionalmente sustituido con los sustituyentes restantes que figuran como realizaciones de R⁷, cuando esto tenga sentido químico, y siempre que ello no menoscabe el límite de tamaño proporcionado para el alquilo per se; por ejemplo, alquilo sustituido con alquilo o alquenilo simplemente ampliaría el límite superior de átomos de carbono para estas realizaciones, y no se incluye. Sin embargo, alquilo sustituido con arilo, amino, alcoxi, =O, y similares estarían incluidos dentro del alcance de la invención, y los átomos de estos grupos sustituyentes no se cuentan en el número que se utiliza para describir los grupos alquilo, alquenilo, etc. que se están describiendo. Cuando no se especifica ningún número de sustituyentes, cada uno de dichos grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo, o arilo puede estar sustituido con un número de sustituyentes de acuerdo con sus valencias disponibles; en particular, cualquiera de estos grupos puede estar sustituido con átomos de flúor en cualquiera o todas sus valencias disponibles, por ejemplo.

"Heteroforma" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un derivado de un grupo tal como un grupo alquilo, arilo o acilo, en el que al menos un átomo de carbono del grupo carbocíclico designado ha sido reemplazado por un heteroátomo seleccionado entre N, O y S. Por lo tanto las heteroformas de alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo, arilo, y arilalquilo son heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, heteroacilo, heteroarilo, y heteroarilalquilo,

respectivamente. Se entiende que ordinariamente no están conectados secuencialmente más de dos átomos de N, O o S, excepto cuando un grupo oxo está unido a N o S para formar un grupo nitro o sulfonilo.

"Halo", como se usa en el presente documento incluye flúor, cloro, bromo y yodo. A menudo se prefieren el flúor y el cloro. "Amino" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a NH₂, pero cuando un amino se describe como "sustituido" u "opcionalmente sustituido", el término incluye NR'R" en la que cada R' y R" es independientemente H, o es un grupo alquilo, (un grupo alquenilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo o una heteroforma de uno de estos grupos, y cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo, arilo, o arilalquilo o heteroformas de uno de estos grupos está opcionalmente sustituido con los sustituyentes descritos en el presente documento como adecuados para el grupo correspondiente). El término también incluye formas en las que R' y R" están unidas entre sí para formar un anillo de 3-8 miembros que puede estar saturado, insaturado o ser aromático y que contiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, o y S como miembros del anillo, y que está opcionalmente sustituido con los sustituyentes descritos como adecuados para los grupos alquilo o, si NR'R" es un grupo aromático, que está opcionalmente sustituido con los sustituyentes descritos como típicos para grupos heteroarilo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carbociclo" se refiere a un compuesto cíclico que contiene solamente átomos de carbono en el anillo, mientras que un "heterociclo" se refiere a un compuesto cíclico que comprende un heteroátomo. Las estructuras carbocíclicas y heterocíclicas comprenden compuestos que tienen sistemas de anillo monocíclico, bicíclico o múltiples. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroátomo" se refiere a cualquier átomo que no sea carbono o hidrógeno, tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. Los ejemplos ilustrativos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a tetrahidrofurano, 1,3-dioxolano, 2,3-dihidrofurano, pirano, tetrahidropirano, benzofurano, isobenzofurano, 1,3-dihidro isobenzofuran, isoxazol, 4,5-dihidroisoxazol, piperidina, pirrolidina, pirrolidin-2-ona, pirrol, piridina, pirimidina, octahidro pirrolo [3,4-b] piridina, piperazina, pirazina, morfolina, tiomorfolina, imidazol, imidazolidina-2,4-diona, 1,3-dihidrobenzimidazol-2-ona, indol, tiazol, benzotiazol, tiadiazol, tiofeno, dióxido de 1,1-tetrahidrotiofeno, diazepina, triazol, guanidina, diazabicyclo [2.2.1] heptano, 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano, 2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1H-beta-carbolina, oxirano, oxetano, tetrahidropirano, dioxano, lactonas, aziridina, azetidina, piperidina, lactamas, y también pueden abarcar heteroarilos. Otros ejemplos ilustrativos de heteroarilos incluyen, pero no están limitados a furano, pirrol, piridina, pirimidina, imidazol, bencimidazol y triazol.

Sustrato

Tal como se usa en el presente documento, "sustrato" se refiere a un soporte insoluble sobre el que se deposita y se analiza un analito. Los sustratos pueden incluir, pero no se limitan a, sílice, vidrio (por ejemplo vidrio, vidrio de poros controlados (CPG)), nailon, resina Wang, resina Merrifield, Sephadex, Sepharose, celulosa, perlas magnéticas, Dynabeads, una superficie metálica (por ejemplo, acero, oro, plata, aluminio, silicio y cobre), un material plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, poliamida, poliéster, difluoruro de polivinilideno (PVDF)), o pins (por ejemplo, matrices de pins adecuados para la síntesis combinatoria o el análisis de perlas en pozos de superficies planas tales como obleas (por ejemplo, obleas de silicio) con o sin placas. El soporte sólido puede estar en cualquier forma deseada, incluyendo, pero no limitado a: una perla, chip, capilar, placa, membrana, oblea, peine, alfiler, una oblea con pozos, una superficie esencialmente plana, una matriz de pozos o pocillos de nanolitros y otras geometrías y formas conocidas por los expertos en la técnica. Los soportes preferidos son superficies planas diseñadas para recibir o unir muestras en loci discretos. Las más preferidas son superficies planas con regiones hidrofóbicas que rodean loci hidrófilos para recibir, contener o unir una muestra. Los materiales de sustrato pueden ser inertes al funcionamiento del dispositivo o de los reactivos a utilizar en el procedimiento, incluyendo los materiales de matriz y los disolventes típicos de espectrometría de masas MALDI.

Sobre el sustrato, los puntos de la matriz o matriz/aditivo o matriz/analito/aditivo a menudo tienen ciertas características. Cada punto sobre un sustrato puede ser de aproximadamente 200 micrómetros a aproximadamente 1 mm de diámetro. El diámetro del punto a menudo es esencialmente uniforme y la variación de diámetro de punto a punto con frecuencia es mínima (por ejemplo, una variación de aproximadamente 20 micrómetros). Se puede utilizar cualquier distancia de centro a centro de los puntos sobre un sustrato útil para la espectrometría de masas, por ejemplo, distancias de centro a centro de 2,25 mm o de 1,125 mm, por ejemplo, y la distancia de centro a centro entre los puntos en un sustrato a menudo es esencialmente uniforme. Los puntos en el sustrato pueden tener un espesor que oscila entre aproximadamente 10 micrómetros y aproximadamente 100 micrómetros. El espesor de cada punto sobre un sustrato a menudo es esencialmente uniforme y la variación de espesor de punto a punto con frecuencia es mínima (por ejemplo, aproximadamente 30 micrómetros).

Sitio diana

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sitio diana" se refiere a un locus específico sobre un sustrato sobre el que se puede depositar y retener material, tal como material de la matriz, material de la matriz con aditivo, o analito. Un sustrato puede contener uno o más sitios diana, que se pueden disponer aleatoriamente o en matriz ordenada u otro patrón. Cuando se utiliza para los análisis por espectrometría de masas, tales como análisis de MALDI, un sitio diana o el sitio resultante con material depositado, preferentemente es igual o menor que el

tamaño del punto láser que se centrará sobre el sustrato para efectuar la desorción. Por lo tanto, un sitio diana puede ser, por ejemplo, un pocillo o pozo, un alfiler o una perla, o una barrera física que se coloca sobre una superficie del soporte sólido, o combinaciones de los mismos tales como granos en un chip, chips en pocillos, o similar. Un sitio diana se puede colocar físicamente sobre el sustrato, se puede atacar químicamente sobre una superficie del sustrato, puede ser una "torre" que queda después de atacar químicamente en torno a un locus, o puede estar definido por parámetros físico-químicos, tales como la hidrofilia relativa, la hidrofobicidad, o cualquier otra característica química de superficie que retiene un líquido en o sobre ellas.

Plataforma

Los métodos y composiciones de la presente invención se pueden usar junto con cualquier fuente de ionización, incluyendo la ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización química (CI), impacto electrónico (EI), ionización por electropulverización (ESI o ES), bombardeo atómico rápido (FAB), desorción de campo/ionización de campo (FD/FI), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y ionización por termopulverización (TSP). En ciertas realizaciones, la fuente de ionización es MALDI o ES.

Los métodos y composiciones de la invención se pueden usar junto con cualquier analizador de masas. Hay una serie de analizadores de masas disponibles en la actualidad, el más conocido de los cuales incluye analizadores cuadrupolares de tiempo de vuelo (TOF), sectores magnéticos, y trampas de iones tanto de transformada de Fourier como cuadrupolares. Además, los analizadores pueden usarse en tándem como espectrómetros de masas en tándem (MS-MS). El analizador de masas puede ser un analizador de TOF.

Los analitos se pueden analizar por análisis por espectrometría de masas y no analizarse por un método espectroscópico. Los analitos pueden no analizarse por espectroscopia de infrarrojos (por ejemplo, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier), que en general mide la frecuencia de vibración de ciertas moléculas, y generalmente no incluye la ionización de analitos y la medición de la masa de los analitos ionizados.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son no limitantes e ilustran ciertas realizaciones de la invención.

Ejemplo 1: Aditivo al analito

En el siguiente ejemplo, el analito de una reacción Sequenom IPLEX™ se mezcló bien con agua nanopura o con un aditivo de ácido ascórbico para determinar el efecto del aditivo sobre la formación de aductos. Las placas se procesaron en paralelo siguiendo el protocolo Sequenom IPLEX™ como se describe por Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol. Biotechnol.* 26, 147-164 (2004); y Oeth, P. et al., iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators. SEQUENOM Application Note (2005), ambos que se incorporan en el presente documento por referencia. Durante la etapa de dilución/acondicionado, 9 µl de la solución de analito se mezcló con 25 µl de agua nanopura como dicta el protocolo convencional, mientras que la otra placa también se mezcló con ácido ascórbico para dar una concentración final de ácido ascórbico de 20 mM.

Para eliminar cationes residuales del ácido ascórbico, y para excluir cualquier posible inferencia de la resina de intercambio catiónico amoniaco, se desalaron soluciones madre de ácido ascórbico con 1 g/ml de resina protonada. Dependiendo del flujo de trabajo, el aditivo se puede mezclar directamente con el analito o se diluye más y después se añade a la muestra. En este ejemplo particular, la etapa de dilución se completó en un manipulador de líquidos automatizado, con la solución de dilución almacenada en una bandeja de 50 ml a una relación de volumen de 1/25 antes de su adición a la solución de analito.

Después de las respectivas etapas de dilución/acondicionado, ambas placas se dispensaron a 10 nl/dominio en un SpectroCHIP™ (3-HPA 300 mM/MDAC 25m) pre-matrical convencional utilizando un Sequenom Nanodispenser, y se analizaron en un analizador compacto Sequenom MassARRAY®.

Resultados: el uso de ácido ascórbico dio lugar a un número de llamadas más alto del 8 % para las muestras tratadas con ácido ascórbico. Los aducto de sodio y amoniaco se suprimieron al límite de detección en las muestras tratadas con ácido ascórbico. Esto dio como resultado la ausencia de llamadas de falsos positivos debido a aductos de amoniaco y/o de sodio para las muestras tratadas con ácido ascórbico, mientras que los aductos de amoniaco en muestras acondicionadas en agua provocaron un ensayo que se debe asignar repetidamente a heterocigoto (una llamada de falsos positivos).

Ejemplo 2: Aditivo para la Matriz

En el siguiente ejemplo, se muestra una nueva composición de matriz que comprende ácido ascórbico (AA) para reducir la formación de aductos, mejorando así la calidad del espectro.

Soluciones de matriz

Se prepararon combinaciones de matriz a partir de las siguientes soluciones madre y agua nanopura (soluciones madre de los diferentes componentes de la matriz se trataron con resina de intercambio catiónico de acuerdo con el grupo funcional de los componentes - ácidos con resina de intercambio en forma H⁺, y de sales de amoníaco con la resina en forma NH₄⁺):

3-HPA: 350 mM en acetonitrilo acuoso al 30 %.

AA: 1 M en solución acuosa.

DAC: 226mg en solución acuosa 1 M.

La matriz convencional se preparó con 3HPA 300 mM y DAC 25 mM, mientras que la nueva matriz se prepara con 3HPA 300 mM, oxalato de NH₄ 20 mM y ácido ascórbico 20 mM. Véase Tabla 1. Las matrices finales se dispensaron en un SpectroCHIP en 15-20 nl, utilizando un Gesim Nanoplotter.

TABLA 1

Tipo de matriz	Composición de la matriz (concentraciones en [mM])
Convencional, sin resina	300 HPA/25 DAC
Convencional, con resina	300 HPA/25 DAC
Nueva matriz	300 HPA/20 AA/20 oxalato de NH ₄

Muestras de oligonucleótidos sintéticos

Se realizaron dos experimentos utilizando oligonucleótidos sintéticos puestos directamente sobre las matrices de la Tabla 1. En un primer experimento, un oligonucleótido sintético de 17 meros (GTG GTG GTG GTG GTG GT) se puso a prueba tanto en la matriz "vieja" tratada con resina como en la matriz "nueva" modificada con ácido ascórbico. En la Figura 1 (matriz vieja), hay claramente presente un aducto de amoníaco (la altura del pico es de aproximadamente el 12 % del pico principal a 5335 Da), mientras que el aducto de amoníaco no está presente en la Figura 2 (matriz nueva). La nueva matriz como alternativa se puede denominar "Matriz 63C".

En un segundo experimento, un oligonucleótido sintético de 17 meros de baja masa (5044 Da) y el oligonucleótido sintético de 28 meros de alta masa (8436 Da) se analizaron para la formación de aductos y la despurinación. En ambos experimentos, los analitos de oligonucleótidos sintéticos se dispensaron sobre las matrices de la Tabla 1 a 10 nl por punto, utilizando un nanoplotter Gesim. Los resultados para los oligonucleótidos de masas bajas y de masas altas se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

TABLA 2A: Aductos de 17 meros

Aductos de 17 meros, 5044 Da tamaño de la muestra: 48	Matriz convencional, resina no tratada	Matriz convencional, resina tratada	Nueva matriz
NH ₃ (+ 17 Da)	0,4*2,3 = 0,9 3 %	0	0
HPA (+ 138 Da)	0,17*1,8 = 0,3 3 %	0	0
HPA descarboxilado 1 (+ 94 Da)	0,48*2,4 = 1,2 4 %	0	0,13*1,6 = 0,2 2 %
HPA descarboxilado 2 (+ 188 Da)	0,98*5 = 4,9 7 %	1*10,2 = 10,2 9 %	1*8,9 = 8,9 11 %
Potasio (+ 38 Da)	0,46*2,5 = 1,2 4 %	0	0
Sodio (+ 22 Da)	0,52*3,4 = 1,8 5 %	0	0
Ácido carbónico (+ 62 Da)	0,08*1,4 = 0,1 2 %	0	0,06*1,3 = 0,08 2 %
Puntuación media de formación de aductos	1,5	1,5	1,3
Despurinación	0	0	0

TABLA 2B: Altura de la sonda de 17 meros y relación señal-ruido (RSR)

Sonda	Matriz convencional, resina no tratada	Matriz convencional, resina tratada	Nueva matriz
Altura de la sonda (med./D.T.)	69/19	110/24	79/26
RSR de la sonda (med./D.T.)	241/57	388/71	313/77

TABLA 3A: Aductos de 28 meros

Aductos de 28 meros, 8436 Da tamaño de la muestra: 48	Matriz convencional, resina no tratada	Matriz convencional, resina tratada	Nueva matriz
NH3 (+ 17 Da)	1*3,8 = 3,8 19 %	1*3,9 = 3,9 14 %	0,46*2,1 = 1 7 %
HPA (+ 138 Da)	0,35*1,2 = 0,42 6 %	0,6*1,6 = 1 6 %	0,67*1,1 = 0,74 4 %
HPA descarboxilado 1 (+ 94 Da)	0,35*1,3 = 0,46 7 %	0,6*1,7 = 1 6 %	0,46*1,7 = 0,78 6 %
HPA descarboxilado 2 (+ 188 Da)	0,35*1,3 = 0,46 7 %	0,65*2,6 = 1,7 9 %	1*3,5 = 3,5 11 %
Potasio (+ 38 Da)	0,39*1,3 = 0,5 7 %	0,58*0,58 = 1 4 %	0,4*0,9 = 0,36 3 %
Sodio (+ 22 Da)	0,46*2,4 = 1,1 12 %	0,6*1,8 = 1,1 6 %	0,46*1,1 = 0,51 4 %
Ácido carbónico (+ 62 Da)	0,31*0,8 = 0,2 4 %	0,31*0,8 = 0,2 3 %	0,17*0,8 = 0,14 3 %
Puntuación media de formación de aductos	1	1,4	1
Despurinación			
sustitución G: -133 Da	0,29*0,6 = 0,2	0,46*0,8 = 0,4	0,46*1,2 = 0,6
eliminación G: -150 Da	0	0	0
Una sustitución: -117 Da	0	0	0

TABLA 3B: Altura de la sonda de 28 meros y relación señal-ruido (RSR)

Sonda			
Altura de la sonda (med./D.T.)	20/5	28/7	31/7
RSR de la sonda (med./D.T.)	93/19	134/27	164/31

- 5 Las comparaciones de la matriz se basan en las alturas relativas de los picos del aducto y de despurinación, y en las alturas de la sonda y las RSR. Se introdujo una puntuación de la formación de aductos para tener en cuenta la frecuencia relativa de rellenos que superen el valor umbral de puntuación de pico en el análisis:

10
$$\text{Puntuación de formación de aducto} = (\text{frecuencia relativa de rellenos que superan el valor umbral}) * (\text{altura promedio del pico de aducto})$$

El término "rellenos" y "puntos" en un sustrato son intercambiables. Las desviaciones típicas para las alturas promedio de los picos de aducto eran bajas y comparables para todas las matrices y no se presentan en las tablas.

- 15 Para el oligómero sintético de 17 meros, la puntuación media de formación de aducto fue del 13 % más baja en la nueva matriz (Tabla 2A), y para el oligómero sintético de 28 meros, la puntuación media de formación de aducto fue del 29 % más baja en la nueva matriz (Tabla 3A) en comparación con la matriz convencional tratada con resina.

Muestras de extensión del cebador

- 20 Se realizaron experimentos adicionales usando ensayos de genotipado Sequenom validados dirigidos a polimorfismos en los genes RHD y AMG. Estos ensayos se realizaron utilizando el ensayo de IPLEX™ y la tecnología MassARRAY® (Jurinke, C., Oeth, P., van den Boom, D., MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. Mol. Biotechnol. 26, 147-164 (2004); y Oeth, P. et al., IPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY® System through single base primer extension with mass-modified Terminators. SEQUENOM Application Note (2005), ambos de los cuales se incorporan en el presente documento como referencia). En resumen, la región diana que rodea el SNP se amplifica primero mediante PCR. Posteriormente un cebador de oligonucleótido se hibrida con el producto de PCR y se extiende específicamente para el alelo por un único nucleótido utilizando una mezcla de 4 nucleótidos terminadores y una ADN polimerasa. Los productos de extensión se transfieren a una matriz de chip miniaturizado y se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. La determinación de la masa molecular de los productos de extensión permite la identificación
- 25
- 30

inequívoca del alelo SNP presente en la muestra. La relación de área del pico de las señales de masas permite la estimación de la abundancia relativa de los alelos en una muestra dada.

5 En este experimento, se utilizó una energía del láser un 20 % más alta (en comparación con los experimentos de oligonucleótidos sintéticos anteriores) en productos de extensión del cebador AMG de 7316 Da puestos sobre las matrices de la Tabla 1. Como se muestra en las Tablas 4 y 5, hay una puntuación media de formación de aducto reducida para los productos de extensión dispensados en la nueva matriz en comparación con la matriz convencional (40-50 % de disminución), y el aumento de energía del láser no tuvo ningún efecto negativo sobre la formación de aductos.

10

TABLA 4A: Ensayo AMG de aductos (7316 Da) - Energía láser convencional

Aductos cuantificadores fetales de sonda a 7316 Da tamaño de la muestra: 96	Matriz convencional, resina no tratada	Matriz convencional, resina tratada	Nueva matriz
NH3 (+ 17 Da)	1*2,5 = 2,5 16 %	1*2,1 = 2,1 11 %	0,94*0,94 = 1 6 %
Sodio (+ 22 Da)	0,91*1,7 = 1,5 11 %	0,98*0,9 = 0,9 5 %	0,25*0,5 = 0,13 3 %
Potasio (+ 38 Da)	0,9*1,2 = 1,1 8 %	0,96*1,1 = 1,1 6 %	0,89*0,8 = 0,7 4 %
Ácido carbónico (+ 62 Da)	0,9*1,2 = 1,1 8 %	0,98*1,3 = 1,3 7 %	0,98*1,4 = 1,4 8 %
Puntuación media de formación de aductos	1,6	1,4	0,8

TABLA 4B: Ensayo de altura de AMG (7316 Da) y relación de señal a ruido (RSR)

Sonda			
Altura de la sonda (med./D.T.)	16/4	19/5	18/6
RSR de la sonda (med./D.T.)	54/11	65/14	66/19

15

TABLA 5: Ensayo de aductos de AMG (7316 Da) - Aumento de la energía del láser

Aductos cuantificadores fetales de sonda a 7316 Da tamaño de la muestra: 96	Matriz convencional, resina tratada 20 % más de energía láser	nueva matriz energética aumentado láser 20 %
NH3 (+ 17 Da)	1*1,7 = 1,7 11 %	0,55*0,85 = 0,47 5 %
Sodio (+ 22 Da)	0,98*1,1 = 1,1 7 %	0,06*0,51 = 0,03 3 %
Potasio (+ 38 Da)	0,1*0,4 = 0,04 0,3 %	0,41*0,75 = 0,31 3 %
Ácido carbónico (+ 62 Da)	0,98*1,5 = 1,5 9 %	0,97*1,6 = 1,6 8 %
Puntuación media de formación de aductos	1,1	0,6
Sonda		
Altura de la sonda (med./D.T.)	16/4	19/4
RSR de la sonda (med./D.T.)	65/14	69/13

20

Para analizar la eficacia de la nueva matriz en presencia de cantidades más altas de analito, se analizaron cantidades crecientes (10, 15 y 20 nl) de productos de extensión del cebador AMG de 7528 Da sobre las matrices de la Tabla 1. Véase Tabla 6 a continuación. Las puntuaciones medias de formación de aductos de la nueva matriz son más bajas en el volumen de analito de 10 y 15 nl; mientras que a 20 nl, se observó la misma puntuación (0,6) tanto ambas matrices.

TABLA 6: Ensayo de aductos de AMG (7528 Da) - Aumento de la muestra de analito en la matriz

Aductos cuantificadores fetales de sonda a 7316 Da tamaño de la muestra: 24	Matriz convencional, resina tratada			Nueva matriz		
	10	15	20	10	15	20
Volumen de la sonda [nl]	10	15	20	10	15	20
NH ₃ (+ 17 Da)	0,92*1,3 = 1,2 8 %	0,92*0,8 = 0,7 3 8 %	0,92*0,6 = 0,5 5 10 %	0,96*0,9 = 0,86 4 %	0,88*0,6 = 0,5 3 4 %	0,88*0,3 = 0,2 6 4 %
Sodio (+ 22 Da)	0,92*0,92 = 1 6 %	0,92*0,7 = 0,6 4 7 %	0,92*0,6 = 0,5 5 10 %	0	0,21*0,3 = 0,0 6 2 %	0,5*0,3 = 0,15 4 %
Potasio (+ 38 Da)	0,67*0,8 = 0,5 5 %	0,92*0,7 = 0,6 4 7 %	0,92*0,7 = 0,6 4 12 %	0,83*1,2 = 1 6 %	1*1,1 = 1,1 7 %	1*1,2 = 1,2 15 %
Ácido carbónico (+ 62 Da)	1*1,6 = 1,6 10 %	1*1,2 = 1,2 12 %	0,92*0,7 = 0,6 4 12 %	1*1,9 = 1,9 9 %	0,96*1,3 = 1,2 5 9 %	1*0,8 = 0,8 10 %
Puntuación media de la formación de aductos	1,1	0,8	0,6	0,9	0,7	0,6
Sonda						
Altura de la sonda (med./D.T.)	16/4	10/3	6/3	21/5	15/5	8/3
RSR de la sonda (med./D.T.)	85/19	56/17	30/14	103/21	68/22	37/10
Reducción relativa de la RSR	34 %	46 %		34 %	46 %	

Mejora de los espectros de masas

5 La importancia de la formación reducida de aductos para eliminar llamadas de falsos positivos se ilustra claramente en las Figuras 3 y 4, que muestran los resultados para el ensayo de genotipado RHD-4-psi 3-i. El pico a 7626 Da no es una inserción como la indicada para la matriz convencional (Figura 3), sino un aducto de 55 Da (NH₃ + K) para el producto de extensión a 7571 Da. Este aducto se elimina claramente en la nueva matriz (Figura 4).

10 Ejemplo 3: Aditivo para la matriz y el analito

15 La nueva matriz modificada con ácido ascórbico también se analizó en combinación con ácido ascórbico añadido a una solución de analito (producto de extensión del cebador AMG a 8289 Da). Como se ve en el Ejemplo 1 y las Tablas 2-6 del Ejemplo 2, el ácido ascórbico añadido al analito o en combinación con la matriz convencional redujo enormemente los aductos de amoniaco y de sodio. Véase la Tabla 7 a continuación. Hubo una disminución del 43 % para el analito tratado con ácido ascórbico sobre la matriz convencional, y una disminución del 57 % para el analito tratado con ácido ascórbico dispensado en la nueva matriz (en comparación con el analito sin tratamiento dispensado en matriz sin tratar).

20 TABLA 7: Ácido ascórbico añadido al analito y a la matriz

Aductos cuantificadores fetales de sonda a 7316 Da tamaño de la muestra: 24	Matriz convencional, resina tratada		Nueva matriz	
	0	20 mM	0	20 mM
NH ₃ (+ 17 Da)	1*1.4 = 1.4 18 %	1*0.6 = 0.6 10 %	1*0.6 = 0.6 8 %	0,92*0,5 = 0,46 8 %
Sodio (+ 22 Da)	0,96*0,7 = 0,67 9 %	0,63*0,3 = 0,19 5 %	0,17*0,3 = 0,05 4 %	0,29*0,1 = 0,03 2 %
Potasio (+ 38 Da)	0,21*0,3 = 0,06 4 %	0,13*0,1 = 0,01 2 %	0,17*0,2 = 0,03 3 %	0,17*0,2 = 0,03 3 %
Ácido carbónico (+ 62 Da)	0,96*0,8 = 0,77 10 %	1*0.7 = 0.7 12 %	1*0.9 = 0.9 11 %	0,96*0,8 = 0,77 13 %

Aductos cuantificadores fetales de sonda a 7316 Da tamaño de la muestra: 24	Matriz convencional, resina tratada		Nueva matriz	
	Puntuación media de la formación de aductos	0,7	0,4 (43 %)	0,4
Sonda				
Altura de la sonda (med./D.T.)	8/2.3	6/3	8/3	6/2
RSR de la sonda (med./D.T.)	35/8	32/11	36/12	30/7

Ejemplo 4: Ensayos de estabilidad

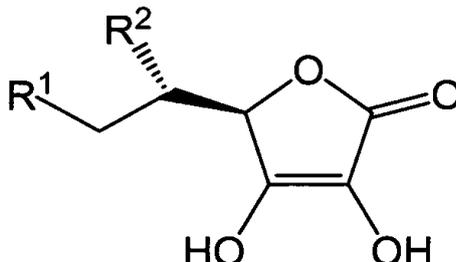
- 5 Durante un período de seis meses, se realizaron cuatro ensayos de estabilidad para determinar las propiedades de reducción de aducto del ácido ascórbico en el tiempo. No había indicación de que las matrices analizadas disminuyen su rendimiento durante el transcurso del tiempo. En cambio, las relaciones RSR obtenidas y unas puntuaciones de formación de aductos consistentes para aductos de amoniaco y alcalinos confirmaron la estabilidad del 3-HPA y sus aditivos DAC, oxalato de NH₄ en combinación con el ácido ascórbico.
- 10 La citación de las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones y documentos anteriores no es una admisión de que cualquiera de los anteriores sea una técnica anterior pertinente, ni constituye admisión alguna en cuanto al contenido o fecha de estas publicaciones o documentos.
- 15 El término "un" o "una" puede referirse a uno o una pluralidad de los elementos que modifica (por ejemplo, "un dispositivo" puede significar uno o más dispositivos) a menos que sea contextualmente claro que se describe uno de los elementos o más de uno de los elementos. El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos el 10 %), y el uso del término "aproximadamente" al principio de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir, "aproximadamente 1, 2 y 3" es aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir pesos entre 90 gramos y 110 gramos.
- 20

Las realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones que siguen.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el análisis de un ácido nucleico por espectrometría de masas, que comprende:

- 5 (a) introducir una muestra en un espectrómetro de masas, en el que la muestra comprende un ácido nucleico y ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo; y
 (b) analizar el ácido nucleico por espectrometría de masas, en el que el análogo del ácido ascórbico es de acuerdo a la siguiente fórmula:



10 en la que:

15 R^1 y R^2 son independientemente OH, halógeno, R^3 , OR^3 , azido, ciano, CH_2R^3 , CHR^3R^4 , SR^3 , NR^3R^4 ; y
 R^3 y R^4 son independientemente H, alquilo, acetileno o ciano, o un anillo carbocíclico de arilo, anillo heterocíclico de arilo, anillo carbocíclico no arilo o anillo heterocíclico no arilo opcionalmente sustituidos.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende ácido ascórbico.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra comprende, además, oxalato de amonio.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico es ácido ribonucleico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la espectrometría de masas se selecciona del grupo que consiste en: espectrometría de masas desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), espectrometría de masas por desorción láser (LDMS), espectrometría de masas por electropulverización (ES), espectrometría de masas de resonancia ciclotrón de iones (ICR) y espectrometría de masas por transformada de Fourier.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra comprende una matriz para la espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

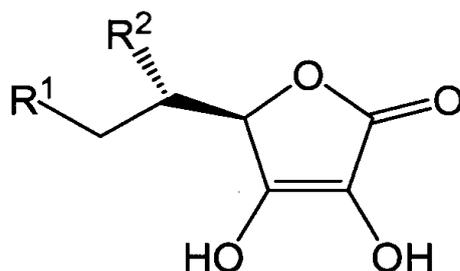
8. El método de la reivindicación 7, en el que la matriz comprende ácido 3-hidroxi-picolínico (3-HPA).

9. El método de la reivindicación 7, en el que la matriz comprende citrato de diamonio (DAC).

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de ácido ascórbico.

12. Un sustrato, que comprende una matriz de puntos, en la que cada punto comprende (i) una matriz para espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), en el que la matriz se selecciona entre ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA), citrato de diamonio (DAC), una mezcla de 3-HPA y DAC, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), T-2-(3-(4-t-butil-fenil)-2-metil-2-propenilideno) malononitrilo (DCTB), trans-2-(3-(4-t-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno) malononitrilo (DCTB), ditranol (DIT), ácido sinápico (SA), ácido trans-3-indolacrílico (IAA), ácido 2-(4-hidroxifenilazo) benzoico (HABA), ácido antranílico, ácido nicotínico, salicilamida, 1-isoquinolinol, 3-aminoquinolina, ácido succínico, 2,6-dihidroxiacetofenona, ácido ferúlico, ácido cafeico, glicerol y nitroanilina; y (ii) ácido ascórbico, o una sal, tautómero o análogo del mismo, en el que el análogo del ácido ascórbico es de acuerdo a la siguiente fórmula:



en la que:

- 5 R^1 y R^2 son independientemente OH, halógeno, R^3 , OR^3 , azido, ciano, CH_2R^3 , CHR^3R^4 , SR^3 , NR^3R^4 ; y R^3 y R^4 son independientemente H, alquilo, acetileno o ciano, o un anillo carbocíclico de arilo, anillo heterocíclico de arilo, anillo carbocíclico no arilo o anillo heterocíclico no arilo opcionalmente sustituidos
- 10 13. El sustrato de la reivindicación 12, en el que cada punto tiene de 200 micrómetros a 1 milímetro de diámetro.
14. El sustrato de la reivindicación 12 o 13, en el que una distancia de centro a centro entre los puntos es de 2,25 milímetros.
- 15 15. El sustrato de la reivindicación 12 o 13, en el que una distancia de centro a centro entre los puntos es 1,125 milímetros.
16. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que cada punto tiene un espesor de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros.
- 20 17. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que uno o más de los puntos incluye un analito de ácido nucleico.
18. El sustrato de la reivindicación 17, en el que el ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico.
- 25 19. El sustrato de la reivindicación 17, en el que el ácido nucleico es ácido ribonucleico.
20. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que cada punto comprende de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM de ácido ascórbico.
- 30 21. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en el que la matriz comprende ácido 3-hidroxipicolínico (3-HPA).
22. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en el que la matriz comprende citrato de diamonio (DAC).
- 35 23. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en el que el sustrato comprende un soporte sólido seleccionado del grupo que consiste en una perla, un chip, un capilar, una placa, una membrana, una oblea, un peine, un alfiler, una oblea con pozos, una serie de pozos o pocillos de nanolitros, y una superficie esencialmente plana.
- 40 24. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23, en el que el soporte es una oblea de silicio.
25. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 24, en el que el soporte es una superficie esencialmente plana con regiones hidrófobas que rodean loci hidrófilos, conteniendo todos los loci un punto.
- 45 26. El uso de un sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 25 junto con cualquier analizador de masas.
27. El sustrato de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 25, en el que cada punto comprende además oxalato de amonio.
- 50

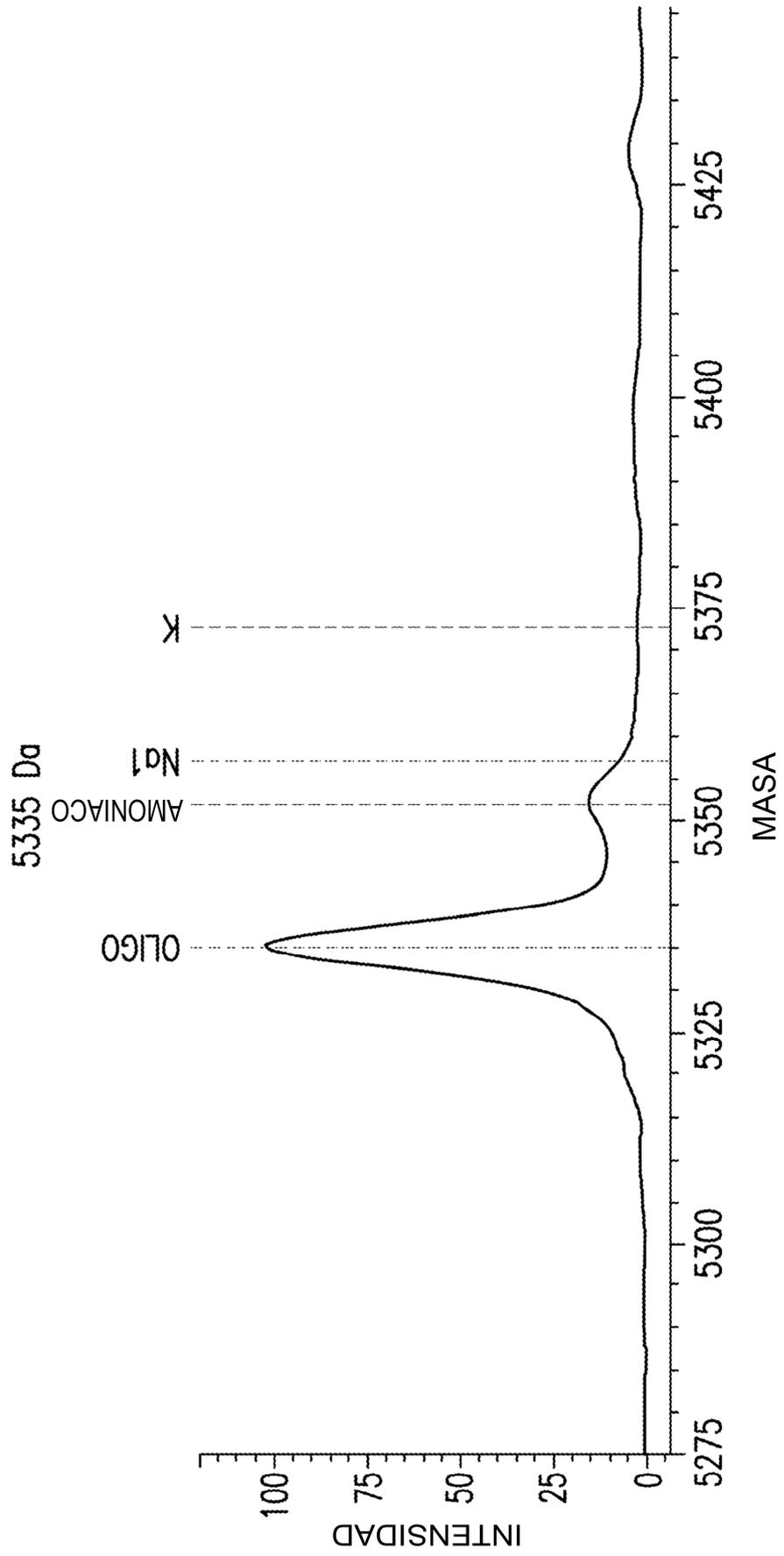


FIG.1

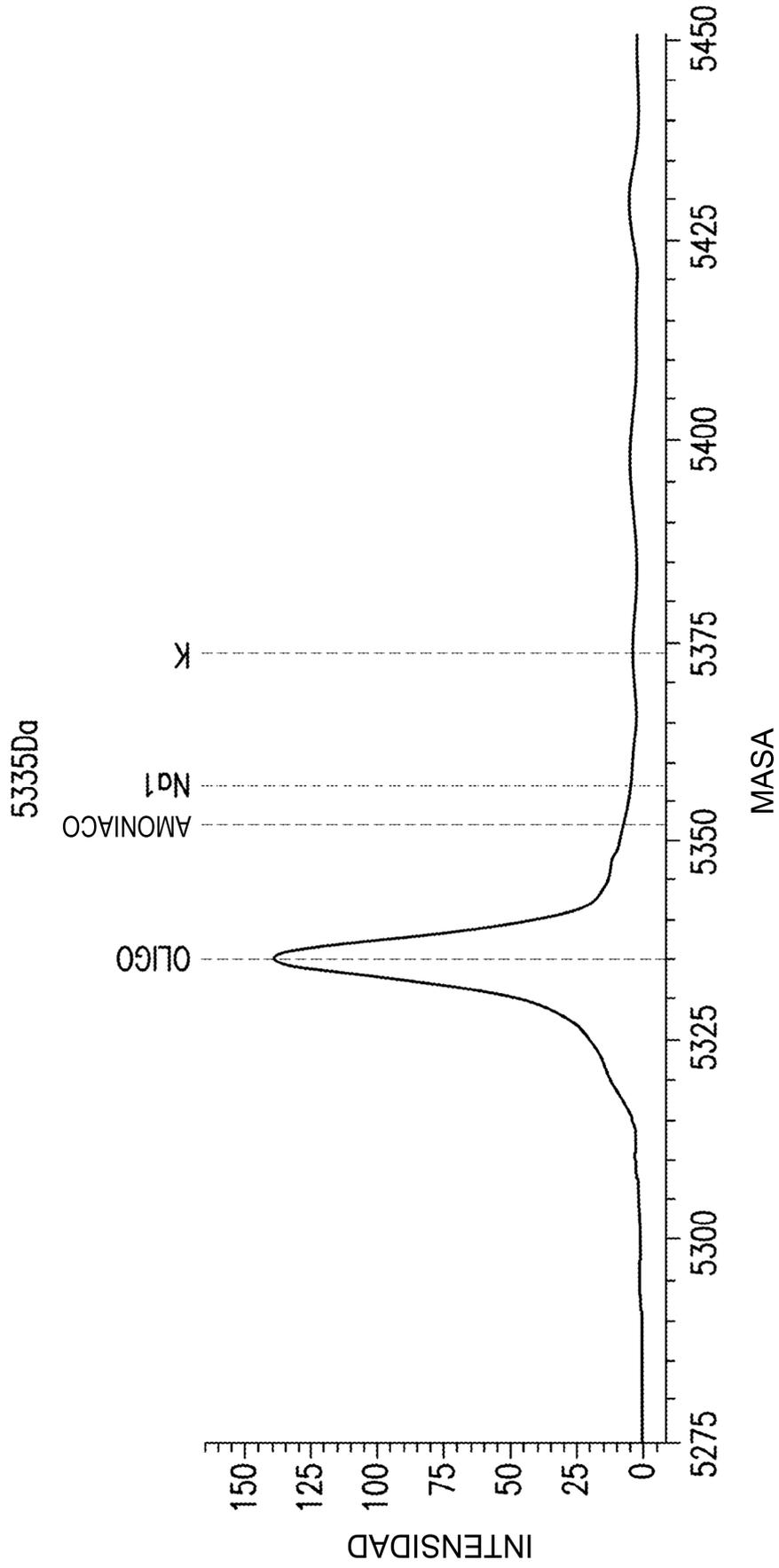


FIG.2

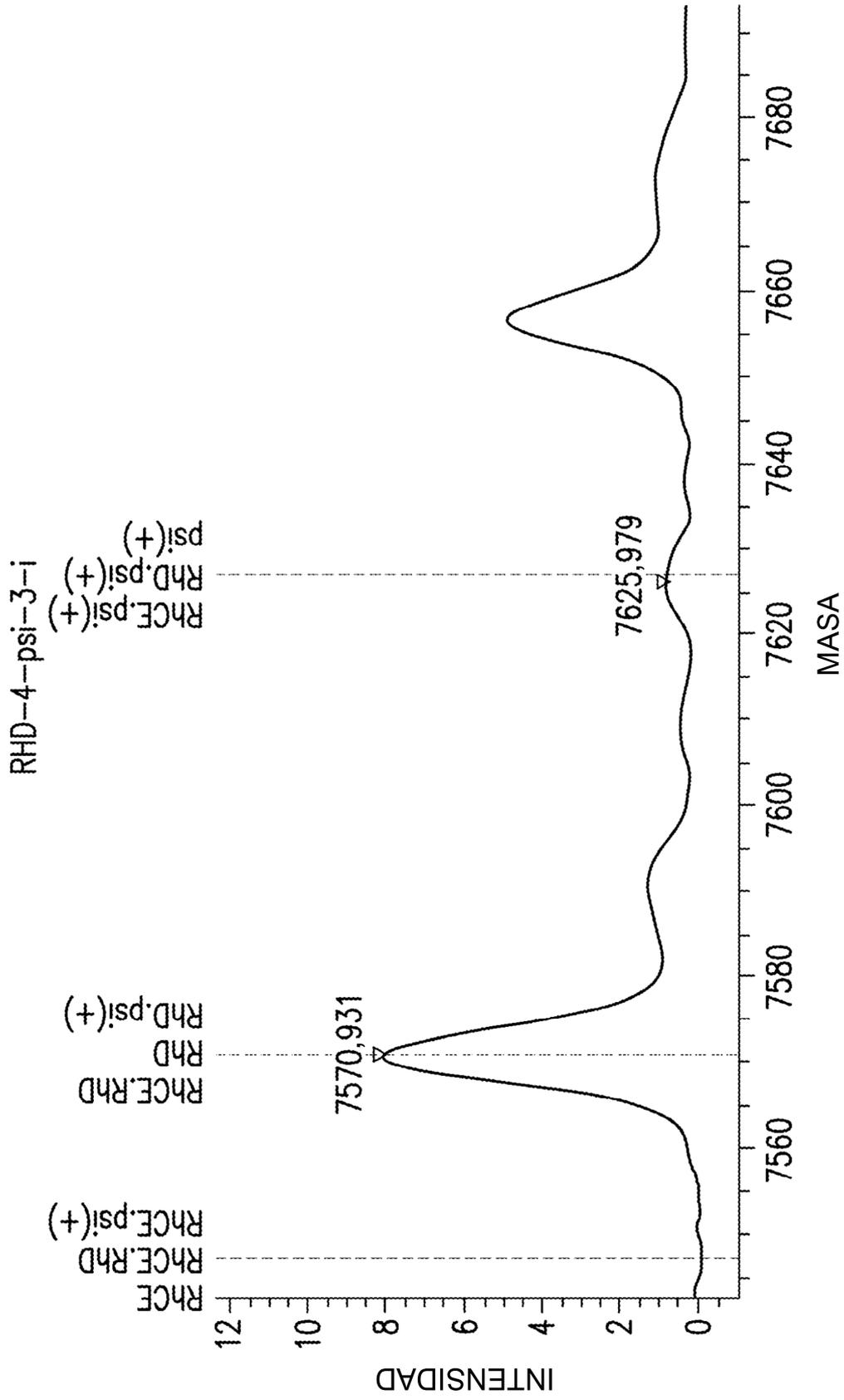


FIG.3

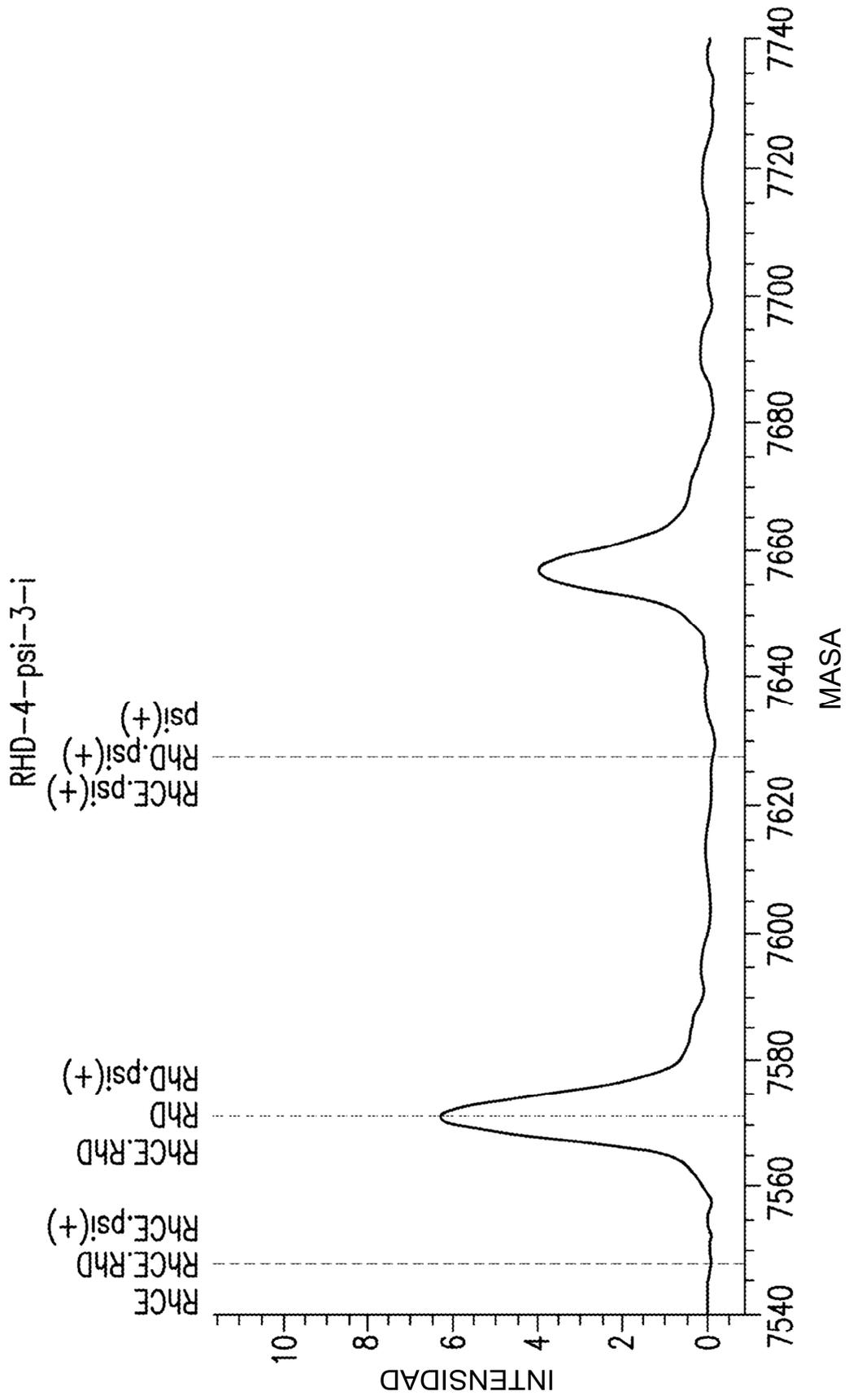


FIG.4