

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 832**

51 Int. Cl.:

H01J 49/00 (2006.01)
H01J 49/02 (2006.01)
H01J 49/42 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
H01J 49/26 (2006.01)
H01J 49/16 (2006.01)
H01J 49/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2005** **E 11196144 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2458619**

54 Título: **Espectrometría de masas con filtración de iones selectiva por establecimiento de umbrales digitales**

30 Prioridad:

24.05.2004 US 574042 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2017

73 Titular/es:

IBIS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
2251 Faraday Avenue
Carlsbad CA 92128, US

72 Inventor/es:

HOFSTADLER, STEVEN, A.;
HALL, THOMAS, A.;
SCHINK, AMY, L. y
DRADER, JARED, J.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 641 832 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).

Espectrometría de masas con filtración de iones selectiva por establecimiento de umbrales digitales**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al campo de la detección y caracterización de analitos grandes, como biomoléculas, por análisis de masas molecular

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La espectrometría de masas se usado durante muchas décadas en la caracterización de moléculas orgánicas pequeñas. La técnica implica típicamente la ionización de moléculas en la muestra para formas iones moleculares sometiendo la muestra a un haz de electrones a una presión muy baja. Los iones moleculares se enfocan y aceleran por un campo eléctrico en un campo magnético o cuadrupolo. Los iones se separan en el campo magnético o cuadrupolo de acuerdo con la proporción de la masa del ion m a la carga en el ion z (m/z). Después de pasar a través del campo, los iones inciden en un detector que determina la intensidad del haz de iones y la proporción m/z , y estos datos se usan para crear el espectro de masas de la muestra.

20 Con el interés creciente en moléculas más grandes, especialmente biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas, se están desarrollando continuamente nuevas técnicas en el campo de la espectrometría de masas para caracterizar estas moléculas.

25 En años recientes el rendimiento de espectrómetros de masas comercialmente disponibles ha visto una mejora significativa debido, en parte, a la capacidad de componentes principales mejorados incluyendo suministros de potencia más estables, digitalizadores más rápidos y métodos de fabricación más sofisticados para elementos ópticos de iones. Particularmente dignos de mención son la nueva generación de espectrómetros de masa ESI-TOF que, de varios vendedores en una variedad de configuraciones, están ahora produciendo rutinariamente los tipos de precisión de medición de masas y resolución de masas anteriormente obtenibles solo en el sector final alto o 30 plataformas basadas en resonancia de ciclotrón de iones por transformación de Fourier (FTICR). Como tal, el uso de tales instrumentos de alta gama por la comunidad analítica continua expandiéndose a medida que estos instrumentos se hacen más disponibles a científicos y técnicos con un amplio rango de necesidades analíticas. Por consiguientes, están emergiendo un número de esquemas de automatización crecientemente sofisticados, muchos incorporando alguna forma de cromatografía líquida (KC como un paso de purificación de muestras on-line para apoyar QC de alto rendimiento o actividades de selección de fármacos. Aunque hay un número de aplicaciones en las que alguna forma de LC es un paso requisito que facilita el análisis de mezclas muy complejas, también se usa frecuentemente como un protocolo de desalación/purificación genérico para preparar fracciones de analito relativamente puras para análisis MS.

40 El ruido químico de bajo peso molecular es a menudo el factor limitativo en el rendimiento de MS general ya que la presencia de niveles altos de componentes de bajo peso molecular, como polímeros o constituyentes de tampones, puede limitar drásticamente el intervalo dinámico espectral y afectar adversamente a la precisión de masa. Aunque la LC se usa a menudo para reducir los efectos adversos de tales antecedentes deben considerarse 45 restricciones en el rendimiento de la muestra y problemas asociados con el uso/eliminación de solventes como parte del flujo de trabajo de laboratorio. Adicionalmente, la LC se usa a menudo como un paso de purificación (en oposición a un paso de separación) para dar analitos sensibles a análisis MS. Consecuentemente, hay una necesidad creciente de métodos simples para reducir el suelo de ruido químico y dar muestras menos que "prístinas" sensibles al análisis espectrométrico de masas.

50 La presente invención satisface esta necesidad, así como otras, proporcionando sistemas y métodos para la filtración digital de señales espectrales de masas que surgen de componente de bajo peso molecular con carga única como aditivos de solución y modificadores de matriz sin alterar significativamente las señales espectrales de masas de analitos más grandes como biomoléculas.

55 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a métodos para identificar un ión con carga múltiple. Se proporciona un espectro de masas que comprende los siguientes componentes: (i) un detector de iones, (ii) un digitalizador que convierte una señal analógica a una señal digital, (iii) medios de transferencia de señal analógica para transferir una 60 señal analógica desde el detector al digitalizador, y (iv) un filtro de umbral digital que está en comunicación de datos digital con el digitalizador. El umbral de señal digital puede establecerse en el filtro de umbral digital y, en respuesta a una entrada de señal digital desde el digitalizador, el filtro de umbral digital produce independientemente una señal digital a un archivo de datos sólo si la entrada de señal digital es mayor que el umbral de señal digital especificado. El paso siguiente del método se efectúa después especificando un umbral de señal digital de tal manera, que tras 65 una medición del espectrómetro de masas del ión con carga múltiple, la salida de señal digital filtrada al archivo de

datos se origina a partir de la detección del ion con carga múltiple y excluye la salida de señal digital de las señales análogas que surgen de iones con carga única.

5 La presente invención está también dirigida a métodos para determinar la masa molecular de una pluralidad de analitos en una mezcla. Se proporciona un espectrómetro de masas que comprende los siguientes componentes: (i) un detector de iones, (ii) un digitalizador que convierte una señal analógica en una señal digital, (iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador, y (iv) una pluralidad de filtros de umbral digital, cada uno en comunicación de datos digital con el digitalizador. Puede establecerse independientemente un umbral de señal digital en cualquiera de la pluralidad de filtros de umbral digital, cada uno de los cuales está en comunicación de datos digital con el digitalizador y, en respuesta a una entrada de señal digital desde el digitalizador, produce independientemente una señal digital a un archivo de datos correspondiente si la entrada de señal digital es mayor que el umbral de señal digital especificado. Los pasos siguientes del método se efectúan después especificando un umbral de señal digital único en algunos miembros de la pluralidad de filtros de umbral digital, haciendo una medición de espectrómetro de masas de la mezcla, en donde cada umbral de señal digital único filtra diferencialmente las señales digitales que surgen de la pluralidad de analitos y produce una salida de señal digital única a cada archivo de datos correspondiente. La medición resulta en el almacenamiento de una pluralidad de archivos de datos. En el paso final, cada uno de la pluralidad de archivos de datos se analiza y la masa molecular de al menos un miembro de la pluralidad de analitos se contiene en cada uno de la pluralidad de archivos de datos.

10 La presente invención también está dirigida a métodos para calibrar un espectro de masas de un analito. Se proporciona un espectrómetro de masas que comprende los siguientes componentes: (i) un detector de iones, (ii) un digitalizador que convierte una señal analógica en una señal digital, (iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador, y (iv) una pluralidad de filtros de umbral digital, cada uno en comunicación de datos digital con el digitalizador. Puede establecerse independientemente un umbral de señal digital en cualquiera de la pluralidad de filtros de umbral digital, cada uno de los cuales está en comunicación de datos digital con el digitalizador y, en respuesta a una entrada de señal digital desde el digitalizador, produce independientemente una señal digital a un archivo de datos correspondiente si la entrada de señal digital es mayor que el umbral de señal digital especificado. Los pasos siguientes del método se efectúan después especificando un umbral de señal digital único en un filtro de umbral digital de tal manera que la salida de señal digital a un primer archivo de datos tiene señales de tanto el analito como un ion calibrador y después especificar un segundo umbral de señal digital único en otro filtro de umbral digital de tal manera que la salida de señal digital a un segundo archivo de datos tiene señales del analito pero no del calibrador. El segundo archivo de datos se sustrae del primer archivo de datos para obtener un archivo de calibración que se usa después para calibrar el espectro de masas.

20 La presente invención está también dirigida a un sistema comprendido de un espectrómetro de masas que comprende los siguientes componentes: (i) un detector de iones, (ii) un digitalizador que convierte una señal analógica en una señal digital, (iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador, y (iv) una pluralidad de filtros de umbral digital para establecer un umbral de señal digital que está cada uno en comunicación de datos digital con el digitalizador y en respuesta a una entrada de señal digital del digitalizador enviando independientemente una señal digital a un archivo de datos correspondiente sólo si la entrada de señal digital es mayor que el umbral de señal digital especificado. El sistema tiene una pluralidad de archivos de datos y una pluralidad de medios de transferencia de salida de señal digital paralela, cada una de las cuales está en comunicación de datos digital con uno de la pluralidad de filtros de umbral digital y un archivo de datos correspondiente de la pluralidad de archivos de datos.

BREVE ANALISIS DE LOS DIBUJOS

50 La Figura 1 muestra la intensidad de respuesta del detector como una función del valor del umbral de señal digital (en este caso indicada por el voltaje de corte) de los iones del analito que tienen proporciones m/z similares pero difieren en pesos moleculares. Círculos: oligonucleótido 140-mer ($m/z = 1232.9$), cuadrados oligonucleótidos 70-mer ($m/z = 1199$), diamantes: oligonucleótidos 38-mer ($m/z = 1174.7$), cruces oligonucleótido 12-mer ($m/z = 1233$) y triángulos: propilenglicol (PPG - $m/z = 1236$).

55 La Figura 2 es una representación esquemática de los efectos de especificar umbrales de señal digital en espectro de masas. La Figura 2a representa la salida de digitalizador bruto (ADC, convertidor digital analógico) desde un escaneo teóricamente individual que contiene un ion con carga única (ion1) que golpea el detector en T1 y un ion con carga múltiple grande (ion2) que golpea el detector en T2. Las Figuras 2b y 2c indican un espectro con un umbral de señal digital alto y bajo respectivamente. La Figura 2d indica un espectro sin un umbral de señal digital y el detector "ruido blanco" es visible en el espectro.

60 La Figura 3 muestra espectro de masas de un producto de PCR. La Figura 3a es un espectro de masas ESI-TOF de un producto de PCT 140-mer adquirido a un ajuste de umbral digital normal (3 mV). La muestra contiene una cantidad contaminante de niveles relativamente altos de polipropilenglicol (PPG) de péptidos

con carga única (que sirven como estándares de masa internos). Los picos etiquetados con "x" indican señales del PPG y "c" representa señales de los estándares de masa de péptidos. La Figura 3b es un espectro ESI-TOF de la misma muestra del producto de PCR obtenida en un ajuste de umbral digital de 15 mV. Los contaminantes y los estándares de masas se han filtrado fuera del espectro.

La Figura 4 es una región expandida de los espectros ESI-TOF de la Figura 3 en las que se detectan los estados de carga alta de relativamente baja abundancia del amplicón de PCR. La señal efectiva al ruido del espectro en la Figura 4a se define por la señal a la proporción de ruido químico, mientras que la señal efectiva al ruido del espectro en la Figura 4b se define por la señal a la proporción de ruido electrónico.

La Figura 5 muestra los espectros ESI-TOF de una solución que contiene aproximadamente .5 nm de producto de PCR en presencia de 500 nM de PPG se caracterizó a ajustes de umbral bajo (Figura 5a) y alto (Figura 5b) como se muestra en el recuadro, el espectro superior está también inundado con otros componentes de ruido químico y el pico en cada fondo de masa imposibilita la detección de los productos de PCR de bajo nivel. Cuando el umbral de señal digital se establece de tal manera que las señales de especies con carga única no se detectan, se detecta una firma distinta para el amplicón de nivel bajo.

La Figura 6 indica dos picos superpuestos de un oligonucleótido 140-mer y de un oligonucleótido 12-mer que pueden resolverse a través de la adquisición de datos con diferentes umbrales de señal digital. El espectro superior se obtuvo con un ajuste de umbral de señal digital de 7 mV. El espectro medio se obtuvo con un ajuste de umbral de señal digital de 11 mV. El espectro inferior se obtuvo por la sustracción del espectro medio del espectro superior para obtener un espectro isotópicamente resuelto limpio del oligonucleótido 12-mer.

La Figura 7 muestra la configuración de digitalizador típica (Figura 7a) con un ajuste de umbral individual en comparación con un digitalizador que permite ajustes de umbral múltiple a ser aplicados simultáneamente al flujo de datos que vienen del digitalizador TOF (Figura 7b).

La Figura 8 muestra los espectros de masas de anhídrido carbónico en presencia de 0,001% de SDS y tampón P/I. Las señales derivadas de proteínas del espectro obtenido con un ajuste de umbral de señal digital de 1 mV (Figura 8a) están sometidas a interferencia considerable de los componentes de detergente y tampón. Por el contrario, la Figura 8b indica que los componentes interferentes se vuelven "invisibles" especificando un ajuste de umbral digital de 11 mV.

En algunas realizaciones de la presente invención, el sistema de espectrómetro de masas comprende los siguientes componentes: (i) un detector de iones, (ii) un digitalizador que convierte una señal analógica en una señal digital, (iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador, y (iv) una pluralidad de filtros de umbral digital para establecer un umbral de señal digital que está cada uno en comunicación de datos digital con el digitalizador y en respuesta a una entrada de señal digital del digitalizador produce independientemente una señal digital a un archivo de datos correspondiente sólo si la entrada de señal digital es mayor que el umbral de señal digital especificado. En algunas realizaciones, las señales analógica y digital son señales de voltaje y el convertidor de analógico a digital (ADC) convierte la señal de voltaje analógica a una señal de voltaje digital. En algunas realizaciones, se hacen una pluralidad de mediciones de espectrómetro de masas y se co-añaden la pluralidad de archivos de datos resultantes.

En algunas realizaciones, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo, un espectrómetro de masas con cuadrupolo lineal, un espectrómetro de masas de trampa lineal, un espectrómetro de masas de sector eléctrico/magnético o un espectrómetro de masas de trampa de iones con cuadrupolo. En algunas realizaciones, los iones se producen por ionización por electrospray (ESI).

En algunas realizaciones, el analito con carga múltiple es una biomolécula como, por ejemplo, un ácido nucleico, una proteína, un carbohidrato o un lípido. Ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, pero no están limitados a, constructos de ARN usados para seleccionar moléculas pequeñas para descubrimiento de fármacos y productos de amplificación como productos de PCR que pueden usarse para análisis genéticos. En algunas realizaciones, el analito con carga múltiple es de un peso molecular de 5-500 kDa, 25-250 kDa, o 50-10 kDa.

En algunas realizaciones, el método permite la caracterización ESI-TOF de biomoléculas en presencia de agentes estabilizadores de biomoléculas o modificadores de matriz usados en técnicas de separación online. Los agentes estabilizadores incluyen, pero no están limitados a, sales tampón como fosfatos por ejemplo, anfólitos, glicerol, polietilenglicol, polipropilenglicol, agentes reductores, detergentes, y similares. Los modificadores de matriz pueden ser cualquier tipo de aditivo usado para efectuar una propiedad de matriz de solución ventajosa para una separación analítica y pueden incluir, pero no están limitados a, anfólitos, detergentes y sales tampón como fosfatos por ejemplo.

En algunas realizaciones, los agentes estabilizadores de biomoléculas o modificadores de matriz tienen carga única cuando se detectan por el espectrómetro de masas. En otras realizaciones, los agentes estabilizadores de biomoléculas o modificadores de matriz tienen una o dos cargas.

5 En algunas realizaciones, cuando se emplean una pluralidad de filtros de umbral de señal digital en el sistema de espectrómetro de masas, se especifican una pluralidad de umbrales de señal digital únicos para obtener flujos de datos diferencialmente filtrados paralelos que se almacenan en los archivos de datos correspondientes. En algunas realizaciones, cualquier miembro de los archivos de datos puede sustraerse de cualquiera de los otros archivos de datos para obtener una representación más precisa de una señal de analito dada. Estas realizaciones
10 pueden usarse para obtener un espectro de masas más preciso de un ion de calibración, o cualquier otro peso molecular más bajo que contamina el ion sustrayendo una señal superpuesta de un ion que tiene un m/z similar pero con una masa molecular más grande.

15 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente que emplean flujos de datos con umbrales establecidos diferencialmente múltiples pueden usarse en adquisición de datos multiplexada de una pluralidad de iones como los obtenidos de productos químicos, proteasa o digestión por restricción de proteínas o ácidos nucleicos.

20 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden usarse para reducir la carga del nivel de purificación de analitos de peso molecular grande o con carga múltiple como biomoléculas, por ejemplo, de agentes estabilizadores o modificadores de matriz.

EJEMPLOS

25 Ejemplo 1: Condiciones de Espectrometría de Masas ESI-TOF

En este trabajo se usó un espectrómetro de masas Bruker Daltonics (Billerica, MA) MicroTOF ESI time-of-flight (TOF). Los iones de la fuente ESI se someten a extracción de iones ortogonal y se enfocan en reflector antes de la detección. Los iones se forman en la fuente MicroTOF ESI estándar que está equipada con un pulverizador fuera de eje y capilaridad vítrea. Para el funcionamiento en el modo de iones negativo, el extremo de presión atmosférica de la capilaridad vítrea se desplaza a 6000 V en relación a la aguja ESI durante la adquisición de datos. Se emplea un flujo contracorriente de N_2 seco para ayudar en el proceso de desolvatación. Se emplea acumulación de iones externos para mejorar el ciclo de trabajo de ionización durante la adquisición de datos. Cada espectro ESI-TOF está comprendido de 75.000 puntos de datos digitalizados sobre 75 μs . Todos los aspectos de la adquisición de datos se controlaron por el paquete de datos Bruker MicroTOF. El procesamiento posterior de datos también se realizó usando el software Bruker estándar.

Ejemplo 2: Condiciones de PCR y Purificación de Productos de Amplificación

40 Todas las reacciones de PCR se ensamblaron en volúmenes de reacción de 50 μL en un formato de placa de microtitulación de 96 pocillos usando una plataforma robótica de manejo de líquidos Packard MP11 y termocicladores M.J. Dyad (MJ research, Waltham, MA). La mezcla de la reacción de PCR consistía de 4 unidades de tampón Amplitaq Gold, 1x (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.4M de betaina, 800 μM de mezcla de dNTP y 250 nM de cebador. Se usaron las siguientes condiciones de PCR: 95° C durante 10 min seguido por 50 ciclos de 95° C durante 30 segundos, 50° C durante 30 segundos, y 72° C durante 30 segundos.

Los productos de PCR se purificaron usando los protocolos divulgados y reivindicados en la Solicitud de Patente U.S. N° de Serie: 10/943.344 de propiedad común e incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

50 Ejemplo 3: Investigación de la Eficiencia de Detección de Iones de Oligonucleótidos Grandes

En un intento de optimizar la eficiencia de detección de iones de oligonucleótidos grandes, y para comprender mejor la relación entre las estadísticas de llegada de iones y la precisión de masas, se diseñó un estudio sistemático detallado para investigar la respuesta del detector como una función del peso molecular, m/z , y estado de carga en el nivel de iones individuales.

60 En la espectrometría de masas de tiempo de vuelo los iones se separan en base a las diferencias en su velocidad a medida que atraviesan el tubo de vuelo. A medida que los iones golpean el detector, se registran sus tiempos de llegada y se convierten posteriormente a m/z en base a la configuración específica del espectrómetro (longitud de la trayectoria de vuelo, voltaje de aceleración, geometría, etc.) Se acepta generalmente que para especies con carga única, la respuesta del detector es inversamente proporcional al peso molecular (velocidad) y, por ejemplo en el caso de MALDI, las especies de peso molecular más alto inducen una señal de detección más pequeña que las especies de peso molecular más bajo. Se sospechaba que los estados de carga más bajos (es decir especies de velocidad menor) inducen una señal más pequeña que la de los estados de carga más alto (es

decir especies de velocidad alta) bajo los mismos voltajes de aceleración. La respuesta reducida de los iones "lentos" de peso molecular alto puede mejorarse parcialmente por el uso de métodos post-aceleración en los que los iones se aceleran a energías cinéticas muy altas inmediatamente antes de la detección.

5 Durante el curso de esta investigación, fue inmediatamente aparente que los iones del mismo m/z nominal pero diferentes pesos moleculares indujeron respuestas del detector significativamente diferentes. Los iones más altamente cargados, más pesados produjeron consistentemente respuestas del detector varias veces las de sus contrapartidas con carga única en la misma m/z . Así, mientras en el analizador de masas TOF los iones de la misma m/z tienen la misma velocidad, los iones de diferente peso molecular no tienen el mismo momento o energía cinética y no inducen la misma señal en el detector.

Este fenómeno se ilustra fácilmente examinando la respuesta espectral como una función del umbral digital empleado para adquirir espectros de masas de especies que cubren un intervalo de pesos moleculares.

15 A diferencia del MALDI de biomoléculas grandes, el fenómeno de carga múltiple inherente al proceso ESI produce generalmente espectros de masas en los que la mayoría de las señales están en el mismo intervalo de m/z . Los iones moleculares de biomoléculas moderadas a grandes (1 kDa a 100 k-Da) se detectan generalmente en el intervalo de 500 - 2000 m/z y no es por lo tanto raro para mezclas complejas para producir espectros en los que se detectan los picos de muchas masas diferentes en el mismo m/z . Para caracterizar la respuesta del detector como una función de peso molecular (carga), se analizaron soluciones que contienen analitos con proporciones de peso molecular de 1,0, 3,7, 11,8, 21, 5, y 43 a un intervalo de umbrales digitales. Para cada serie, se usó una carga única en o cerca de m/z 1233 para calibrar la respuesta del detector. Las isopletras de peso molecular resultantes se están trazadas en la Figura 1. De manera importante, en umbrales de señal digital bajos establecidos de acuerdo con el Ejemplo 4 (*vide infra*), los iones de PPC de carga única caen en intensidad a voltajes de corte significativamente más bajos que las de especies de peso molecular (carga) más alto. Por ejemplo, en un voltaje de corte de umbral de señal digital de 9 mV, la señal de los iones de PPG a m/z 1233 se atenúa a niveles no detectables mientras que el producto de PCR de 43 kDa a m/z 1233 se detecta todavía a aproximadamente el 90% de la respuesta inicial. Hay una tendencia definida en los voltajes de corte como una función del peso molecular (estado de carga) que sugiere que se puede seleccionar un umbral de señal digital para detectar (o no detectar) selectivamente especies de interés.

Ejemplo 4: Base Lógica del Umbral de Señal Digital

35 Bajo las condiciones de adquisición empleadas rutinariamente para caracterizar productos de PCR, se adquieren escaneos individuales y se co-añaden a una tasa de 75 kHz. Así para una adquisición típica de 45 segundos, cada espectro está comprendido de 660.000 escaneos individuales co-añadidos. Para reducir el ruido disparado/blanco en el espectro co-añadido, las electrónicas Micro TOF permiten establecer un umbral de filtro digital (corte de voltaje) de tal manera que el ruido blanco del detector a un recuento de ADC único o de bits bajos se establece en cero de cada escaneo y sólo las respuestas del detector consistentes con los eventos de detección de iones se pasan al sistema de datos del digitalizador de suma transiente a ser co-añadidos. Este concepto se muestra esquemáticamente en la Figura 2. La Figura 2a representa la salida de ADC bruta de un escaneo individual teórico en el que un ión con carga única (ion1) golpea el detector en T1 y un ion con carga múltiple grande (ion2) que golpea el detector en el momento T2. Durante los intervalos temporales en los que no el ion1 ni el ion2 están golpeando el detector el ADC está recogiendo y digitalizando el ruido del detector correspondiente generalmente a 1-5 bits. 40 Debido a la tasa de adquisición rápida del TOF y la capacidad de iones finita de la fuente, cada escaneo está comprendido típicamente de relativamente pocos eventos de detección de iones y para cualquier canal de iones dado, es muy improbable que un ion se detecte en cada escaneo. Así, co-añadir gran número de escaneos no filtrados como los representados en la Figura 2d resultaría en un suelo de ruido que aumentaría linealmente con el número de escaneos y un espectro de masas en el que el intervalo dinámico último estaría limitado por el suelo de ruido electrónico relativamente alto.

Para minimizar los efectos perjudiciales de co-añadir ruido del detector de bits bajos, las electrónicas de MicroTOF permiten al usuario establecer un voltaje de corte que tiene el efecto neto de establecer a cero señales de nivel bajo que se atribuyen sólo al ruido del detector. Como se ilustra en la Figura 2c, este enfoque, idealmente, no afecta a los recuentos de ADC para señales consistentes con un ion con carga única pero filtra digitalmente cada escaneo antes de la co-adición, de tal manera que el ruido blanco del detector no se co-añade con la misma eficiencia como respuesta iónica del detector. Como se ilustra en la Figura 2b, este concepto puede llevarse a un paso adelante estableciendo un umbral de filtro digital de tal manera que los recuentos de ADC derivados del ruido del detector e iones con carga única que golpean el detector se establecen a cero antes de la co-adición. Así, con el umbral digital establecido al nivel representado en la Figura 2b, un ion con carga única que golpea el detector es "invisible" en la salida de ADC post-filtrada y el resultado neto es un filtro de peso molecular (carga) de "paso alto" en el que las especies de peso molecular (carga) bajo no se detectan pero las especies de peso molecular (carga) alto, que tienden a ser de carga múltiple todavía se detectan.

65 Ejemplo 5: Eliminación del Ruido Químico por Filtrado de Umbral Digital de Paso Alto

Un desafío principal en el análisis de biopolímeros grandes por ESI-MS es la purificación de las muestras. Los contaminantes de bajo peso molecular en soluciones de biopolímeros pueden tener efectos perjudiciales en la calidad de espectros ESI-MS y pueden limitar significativamente el intervalo dinámico y la precisión de la medición.

5 En algunos casos estos "contaminantes" de bajo peso molecular son aditivos realmente requeridos como componentes de separaciones en línea. Tales aditivos incluyen anfólitos usados en enfoque isoeléctrico capilar, fosfatos usados comúnmente como componentes de tampones usados en electroforesis de zona capilar, y modificadores de matriz de la solución usados para promover la formación de micelas en cromatografía electrocinética micelar. De manera similar, aditivos incompatibles con electrospray como glicerol y polímeros

10 (polietilenglicol, PPG) se usan a menudo para estabilizar enzimas a ser usado en procesos bioquímicos. Estos compuestos a menudo hacen su camino a través de un proceso bioquímico completo y terminan en el espectrómetro de masas. Un ejemplo clave del último tipo de "contaminante" es la presencia de niveles altos de polímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol en la polimerasa Taq usada para PCR. Aunque típicamente sólo 1-2 μL de Taq usados en cada 50 μL de reacción de PCR, la concentración relativamente alta de polímero en presencia de la concentración relativamente baja de productos de PCR (típicamente 10-100 nM), acoplada con el hecho de que tales

15 polímeros se ionizan con eficiencia alta, puede provocar un problema de supresión de ruido químico significativa.

La Figura 3a ilustra un ejemplo de un espectro ESI-TOF de un producto de PCR 140-mer en el que una cantidad contaminante de PPG clavo junto con niveles relativamente altos de péptidos con carga única (que sirven como estándares de masa interna). La señal del envoltorio del estado de carga de las hebras con carga múltiple de los amplicones de PCR se confunde por la presencia de la señal intensa que surge de las especies de bajo peso molecular. Este espectro se adquirió usando un ajuste de umbral digital "normal" en el que la salida de ruido blanco del detector del digitalizador se filtra pero el umbral está establecido lo suficientemente bajo para asegurar que se capturen las señales de iones con carga única. El espectro es ejemplar de una situación común en la que un biopolímero grande se analiza en presencia de un fondo de ruido químico significativo que surge de contaminantes de bajo peso molecular. Como se muestra, tales interferencias pueden afectar adversamente a la precisión de la masa de la medición y resultar en un intervalo dinámico espectral reducido.

Por el contrario, el espectro ESI-TOF en la Figura 3b se adquirió en el mismo espectrómetro de la solución idéntica usando los parámetros de la fuente ESI idénticos condiciones de adquisiciones con la importante excepción de que el espectro en la Figura 3b se adquirió en un voltaje de corte de 15 mV mientras que el espectro en 3a se adquirió momentos antes en un voltaje de corte de 3 mV. Resulta claro de estos espectros, y los datos presentados en la Figura 2 que el ajuste de corte de 15 mV impide la detección de las especies con carga única en la solución aunque facilita la detección de los amplicones de PCR con carga más alta, más grandes. Es evidente de los espectros en la Figura 3 y los perfiles de corte en la Figura 2 que la intensidad de los picos del amplicón se reducen alrededor de un 30%; de manera importante los picos del polímero con carga única y los calibradores no están presentes en el espectro adquirido en el voltaje de corte más alto y el espectro en la Figura 3b tiene características de ruido señal a químico significativamente mejoradas. Merece la pena enfatizar que no se cambiaron otros instrumentos, solución o parámetros de procesamiento de datos entre la recolección de espectros en las Figuras 3a y 3b, la única diferencia fue el ajuste del umbral de señal digital.

Indicando la aplicabilidad del método para biomoléculas distintas de ácidos nucleicos, la Figura 8 muestra espectros de masas de anhidrasa carbónica en presencia de 0,001% de SDS y 25 mM de tampón de piperidina/imidazol. Las señales derivadas de proteínas del espectro obtenido con un ajuste de umbral de señal digital de 1 mV están sometidas a interferencia considerable de los componentes de detergente y tampón. Por el contrario, la Figura 8b indica que los componentes interferentes se vuelven "invisibles" especificando un ajuste de umbral digital de 11 mV.

Estos datos indican que en algunas aplicaciones de selección de alto rendimiento y QC puede emplearse un protocolo de purificación de muestras menos riguroso y el ruido químico puede eliminarse a través del enfoque de filtrado digital descrito anteriormente. De manera importante, este enfoque permite el análisis ESI-MS de biomoléculas grandes (o complejos no covalentes) de soluciones que podrían contener de otra manera demasiado ruido químico para producir espectros impenetrables.

55 **Ejemplo 6: Potenciamiento del Intervalo Dinámico por Filtrado de Umbral Digital**

Reduciendo o eliminado el suelo de ruido químico además de reduciendo el suelo de ruido electrónico, se pueden obtener mejoras significativas en el intervalo dinámico y calidad espectral. Este concepto se demuestra en la Figuras 4 y 5. En la Figura 4 se muestra una región expandida de los espectros ESI-TOF de la Figura 3 en los que se detecta la relativamente baja abundancia de estados de carga alta del amplicón de PCR. Tener en cuenta que las señales de los estados de carga de $(M-43H+)^{43-}$, $(M-42H+)^{42-}$, y $(M-41H+)^{41-}$ son apenas visibles en el espectro no filtrado (Figura 4a) pero claramente visibles en el espectro filtrado (Figura 4b). La señal efectiva a ruido del espectro en la Figura 4a se define por la señal a proporción de ruido químico, mientras que la señal efectiva a ruido del espectro en la Figura 4b se define por la señal a proporción ruido electrónico. Por ejemplo, para el estado de carga $(M-41H+)^{41-}$ del amplicón de la señal a ruido (químico) en el espectro adquirido en el umbral de corte bajo es

aproximadamente 2 mientras que la señal a ruido (electrónico) del espectro adquirido en umbral de corte más alto es aproximadamente 12. Adicionalmente, las señales de los estados de carga (M-40H⁺)⁴⁰⁻ y (M-39H⁺)³⁹⁻ no son fácilmente discernibles del ruido químico en la Figura 4a pero claramente visibles en la Figura 4b.

5 La mejora en el intervalo dinámico efectivo proporcionado por la presente invención se ilustra adicionalmente en la Figura 5 en la que una solución que contiene aproximadamente 0.5 nm de producto de PCR en presencia de 500 nM de PPg se caracterizó en ajustes de umbral alto y bajo. En el ajuste de umbral normal el espectro está dominado por iones de polímero de carga única altamente abundantes y no se observan productos de PCR de bajo nivel. Como se muestra en el recuadro, el espectro superior está también inundado con otros
10 componentes de ruido químico y el fondo de pico en cada masa impide la detección de los productos de PCR de bajo nivel. Cuando el umbral de señal digital está establecido de tal manera que las señales de especies con carga única no se detectan, se detecta una firma distinta para el amplicón de bajo nivel. Este atributo tiene el potencial de mejorar significativamente la detección de biomoléculas de concentración baja en solución como lo es
15 frecuentemente la presencia de contaminantes ubicuos, de bajo nivel introducidos de impurezas de tampones, artículos de plástico, y manejo de muestras que definen el suelo de ruido químico de los espectros de masas y limitan la aplicabilidad del ESI-MS para sistemas biológicos complejos.

Además de reducir el intervalo dinámico útil de un espectro de masas, el ruido químico y los contaminantes de bajo peso molecular pueden tener efectos adversos en las mediciones de masas precisas. Como se ha descrito
20 anteriormente, los espectros ESI-MS a menudo tienen picos superpuestos que resultan de especies de diferentes pesos moleculares pero el mismo m/z. Esto es particularmente problemático para iones de biopolímeros grandes que producen generalmente espectros algo congestionados en los que se observan estados de carga múltiple en el intervalo de 500 a 2000 m/z. Como las especies de bajo peso molecular se resuelven isotópicamente y las especies por encima de alrededor de 10 kDa generalmente no lo hacen, es bastante común ver un pico contaminante de peso
25 molecular bajo superponerse con y distorsionar un pico de analitos de otra manera analíticamente útil. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 6 en la que la señal del estado de carga (M-3H⁺)³⁻ de un oligonucleótido 12-mer se observa en el mismo m/z que el estado de carga (M-35H⁺)³⁵⁻ de un producto de PCR 140-mer mucho mayor. En este caso se pretende que el oligonucleótido más pequeño sirva como un estándar de masa interna pero, como se ilustra en la Figura 6 y en los datos de precisión de masas en la Tabla 1, la co-localización de estas señales es perjudicial para ambas señales. Primero, en el umbral de 7 mV no es inmediatamente aparente que hay dos especies en m/z 1233 ya que los picos 12-mer isotópicamente resueltos enmascaran la presencia del pico del amplicón no resuelto más grande. Adicionalmente, la presencia del pico del amplicón no resuelto distorsiona las formas y centroides del pico de los picos 12-mer isotópicamente resueltos de tal manera que se compromete la
30 precisión de masa. Cuando el umbral digital se establece a 11 mV, la contribución al pico del 12-mer con carga triple se reduce sustancialmente y la presencia de un pico no resuelto de alto peso molecular es aparente. De manera importante, debido a que la señal agregada (es decir, 12-mer y 140-mer) se captura en el nivel de umbral digital 7 mV, y la contribución a la señal del 140-mer puede medirse en un nivel de umbral digital más alto (11 mV en este ejemplo), la señal del 12-mer puede derivarse sustrayendo el espectro adquirido en 11 mV del espectro adquirido en 7 mV. El espectro resultante muestra una distribución notablemente mejorada (que contiene 5 picos) y, quizás con más importancia, los picos centroides producen un error de medición de masas reducido a lo largo de la distribución. En este ejemplo, el error de medición de masas medio para los cinco picos se redujo de 5,9 a 1,5 ppm siguiendo la sustracción espectral.

45 **Tabla 1: Error Calculado en Mediciones de m/z para Umbral de Señal Digital de 7 mV frente a Umbrales de Señal Digital (7 mV) - (11 mV)**

Umbral de Señal Digital (mV)	Número de Pico	Teórico (m/z)	Medido (m/z)	Error (ppm)
7	1	1232.5408	1232.5596	-15.2512
7-11	1	1232.5408	1232.5449	-3.3246
7	2	1232.8752	1232.8809	-4.6266
7-11	2	1232.8752	1232.8753	-0.0844
7	3	1233.2095	1233.2005	7.2811
7-11	3	1233.2095	1233.2071	1.9292
7	4	1233.5437	1233.5452	-1.1898
7-11	4	1233.5437	1233.5428	0.7558
7	5	1233.8780	1233.8764	1.2781
7-11	5	1233.8780	1233.8799	-1.5585

En la Tabla 1, 7-11 indica que un espectro obtenido con un umbral de señal digital de 11 mV se sustrajo de un espectro obtenido con un umbral de señal digital de 7 mV.

Ejemplo 7: Sustracción Espectral y Particionamiento de Iones: Obtener "Cortes de Iones"

De acuerdo con la presente invención, los experimentos ilustrados en las Figuras 3-5 ilustran que el método de establecimiento de umbral digital descrito anteriormente permite la detección de iones biomoleculares con carga múltiple grandes de tal manera que las especies de peso molecular bajo se vuelven "invisibles" (en base al establecimiento de umbrales digitales) aunque los datos presentados en la Figura 6 ilustran un método por el que las especies de bajo peso molecular pueden analizarse de tal manera que los iones biomoleculares con carga múltiple grandes se hacen "invisibles" (por establecimiento de umbral digital y sustracción espectral). Los resultados de la sustracción relativamente simple descrita en el Ejemplo 6 sientan la base para esquemas de establecimiento de umbrales digitales más sofisticados en los que "cortes" múltiples de una población de iones complejos puede analizarse simultáneamente con el resultado efectivo siendo una configuración de detección multidimensional en la que los iones se miden simultáneamente.

En este trabajo todas las comparaciones del umbral alto/umbral bajo se hicieron por mediciones múltiples de la misma solución de analito adquirida bajo idénticas condiciones instrumentales excepto que se varió el umbral digital. Esto se hizo por necesidad ya que, como se ilustra en la Figura 7a, la arquitectura del sistema básica del Bruker MicroTOF consiste de un único flujo de datos del detector al digitalizador para el que se aplica un único nivel de umbral al flujo de datos antes de co-añadir los escaneos. Como el rendimiento de la muestra es un impulsor principal en muchos laboratorios, requerir que cada muestra se analice dos (o más) veces en diferentes umbrales digitales puede no ser factible.

De acuerdo con al presente invención y como un medio para sortear este problema, el esquema de digitalización alternativo ilustrado en la Figura 7b indica que la salida del ADC puede dividirse en múltiples flujos de datos paralelos, cada uno de los cuales se somete a un umbral digital diferente. Sustrayendo los espectros adquiridos en diferentes umbrales digitales, se puede obtener un espectro de masas para cualquier "corte" de la población de iones. Esto permitiría realizar establecimientos de umbrales digitales en un espectro de masas muy complejo y evaluar un intervalo de pesos moleculares (Cargas) independientes de otras poblaciones de iones, potencialmente interferentes como por ejemplo, una digestión de restricción de un ácido nucleico o digestión de proteasa de una proteína. Otro ejemplo podría ser una biomolécula como un ácido nucleico o una proteína que tenga una molécula pequeña enlazada no covalentemente.

Tener múltiples espectros de masas con umbral establecido variablemente derivados del idéntico evento de digitalización garantizaría la sustracción perfecta de características espectrales y eliminaría artefactos potenciales que puedan surgir de la deriva espectral durante el curso de la adquisición de múltiples espectros. De manera importante, esto también significa que se podría introducir estándares (calibradores) de masas internas de bajo peso molecular para calibrar con mucha precisión el eje m/z (por ejemplo, la serie PPG en la Figura 3a) pero mediciones de masas precisas derivadas de analitos biomoleculares de picos que no han sido nunca "pisados" por especies de bajo peso molecular (por ejemplo, el espectro con umbral establecido digitalmente en la Figura 3b).

Serán aparentes varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente a los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones también se pretende que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones añadidas.

Reivindicaciones

1. Un método para determinar la masa molecular de una pluralidad de analitos en una mezcla que comprende:

- 5 a) hacer una medición de espectrómetro de masas de la mezcla usando un espectrómetro de masas, en donde el espectrómetro de masas comprende:
- 10 (i) un detector de iones que produce una señal de voltaje analógica;
(ii) un digitalizador para convertir una señal de voltaje analógica en una señal de voltaje digital;
(iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador; y
(iv) una pluralidad de filtros de umbral digital para establecer una pluralidad de umbrales de señal digital únicos, cada uno en comunicación de datos digital con el digitalizador,
- 15 b) especificar una pluralidad de voltajes de umbral de señal digital únicos para al menos un primer miembro y un segundo miembro de la pluralidad de filtros de umbral digital;
c) en respuesta a una entrada de señal digital del digitalizador:
- 20 (1) generar una primera salida de señal digital filtrada enviando independientemente una señal digital a un primer archivo de datos sólo si la entrada de señal digital es mayor que el voltaje del umbral de la señal digital especificado en un primer filtro de umbral digital en el primer miembro de la pluralidad de filtros de umbral digital; y
(2) generar una segunda salida de señal digital filtrada enviando independientemente una señal digital a un segundo archivo de datos sólo si la entrada de señal digital es mayor que el voltaje del umbral de la señal digital especificado en un segundo filtro de umbral digital único en el segundo miembro de la pluralidad de filtros de umbral digital, en donde cada voltaje de umbral de señal digital único filtra diferencialmente señales que surgen de la pluralidad de analitos y produce una salida de señal digital única, de tal manera que la medición del espectrómetro de masas de la mezcla proporciona flujos de datos diferencialmente filtrados paralelos que se almacenan en una pluralidad de archivos de datos correspondientes; y
- 25 d) analizar cada miembro de la pluralidad de archivos de datos correspondientes en donde la masa molecular de al menos un miembro de la pluralidad de analitos está contenida en el mismo,
- 30 en donde el análisis comprende la sustracción matemática de al menos un miembro de la pluralidad de archivos de datos correspondientes de al menos un otro miembro correspondiente de la pluralidad de archivos de datos correspondientes para obtener un archivo de datos que proporciona una representación más precisa de una señal de analito dado.
- 35 2. El método de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de analitos comprende iones con carga única e iones con carga múltiple.
- 40 3. El método de la reivindicación 2, en el que la pluralidad de filtros de umbral digital se establece para excluir salida de señal digital de las señales analógicas que surgen de iones con carga única y/o poblaciones de iones interferentes.
- 45 4. El método de la reivindicación 2, en el que los iones con carga múltiple son biomoléculas.
- 50 5. El método de la reivindicación 4, en el que las biomoléculas comprenden moléculas pequeñas enlazadas no covalentemente, por ejemplo, las biomoléculas son ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, lípidos o carbohidratos.
- 55 6. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que los iones con carga única son aditivos estabilizadores de biomoléculas o modificadores de matriz.
- 60 7. El método de la reivindicación 6, en el que los aditivos estabilizadores son uno o más de: polietilenglicol, glicerol, agentes reductores, detergentes, o sales tampón, o cualquier combinación de los mismos.
8. El método de la reivindicación 6, en el que los aditivos modificadores de matriz son uno o más de: anfólitos, detergentes, o sales tampón, o cualquier combinación de los mismos.
9. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además hacer una pluralidad de mediciones de espectrómetro de masas de acuerdo con el paso b) y co-añadir la pluralidad resultante de archivos de datos obtenidos de la pluralidad de mediciones de espectrómetro de masas.
- 65 10. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el espectrómetro de masas es un espectrómetro de

masas de tiempo de vuelo, un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con cuadrupolo, un espectrómetro de masas con cuadrupolo lineal, un espectrómetro de masas de trampa lineal, un espectrómetro de masas de sector eléctrico/magnético o un espectrómetro de masas de trampa de iones con cuadrupolo.

5 **11.** El método de la reivindicación 1, que es un método para calibrar un espectro de masas de un analito, en el que:

(1) el primer voltaje de umbral de señal digital se especifica de tal manera que la salida de señal digital a un primer archivo de datos comprende señales del analito y un ion de calibración; y

10 (2) el segundo voltaje de umbral de señal digital se especifica de tal manera que la salida de señal digital a un segundo archivo de datos comprende señales del analito pero no del ion de calibración,

y en el que el método comprende sustraer el segundo archivo de datos del primer archivo de datos para obtener un archivo de datos de calibración que comprende una señal del ion de calibración pero no del analito y usar dichos datos de calibración para calibrar el espectro de masas del analito.

15 **12.** Un espectrómetro de masas que comprende:

(i) un detector de iones que produce una señal de voltaje analógica;

20 (ii) un digitalizador para convertir una señal de voltaje analógica en una señal de voltaje digital;

(iii) un medio de transferencia de señal analógica para transferir una señal analógica desde el detector al digitalizador;

(iv) una pluralidad de filtros de umbral digital para establecer una pluralidad de voltajes de umbral de señal digital independientes, cada filtro de umbral digital en comunicación electrónica paralela con el digitalizador;

25 (v) una pluralidad de medios de transferencia de salida de señal digital paralelos, para generar una pluralidad de archivos de datos de espectro de masas digitales, cada uno de los cuales está en comunicación de datos digital con uno de los filtros de umbral digital y medios para el almacenamiento digital de la pluralidad de archivos de datos de espectro de masas digitales; y

30 (vi) medios para la sustracción matemática de al menos un miembro de la pluralidad de archivos de datos de al menos un otro miembro de la pluralidad de archivos de datos para obtener una representación más precisa de una señal de analito dada.

35 **13.** El método de la reivindicación 11 o el espectrómetro de masas de la reivindicación 12, en el que la pluralidad de filtros de umbral digital se establece para excluir la salida de señal digital de señales analógicas que surgen de iones con carga única y/o poblaciones de iones interferentes.

35

40

45

50

55

60

65

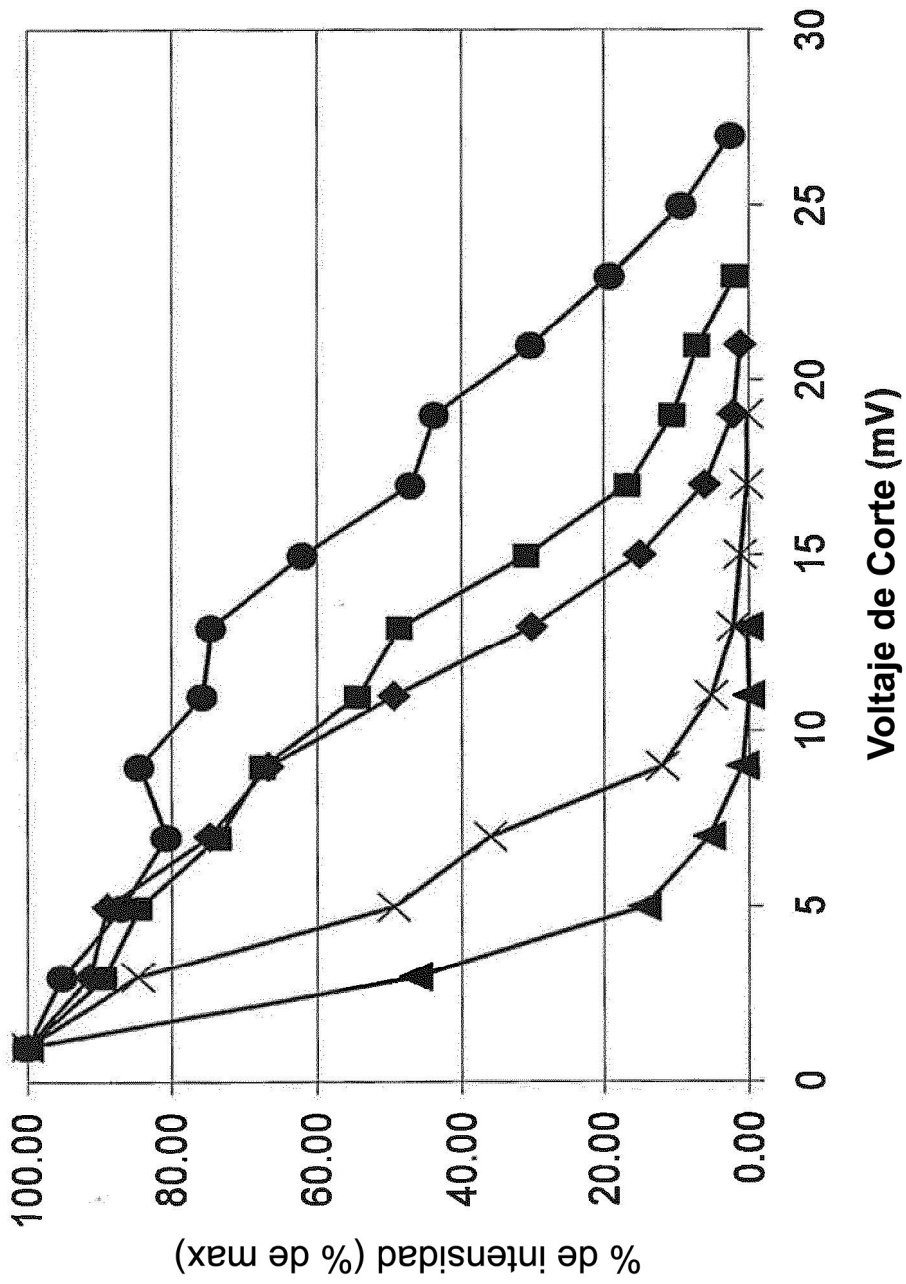


Figura 1

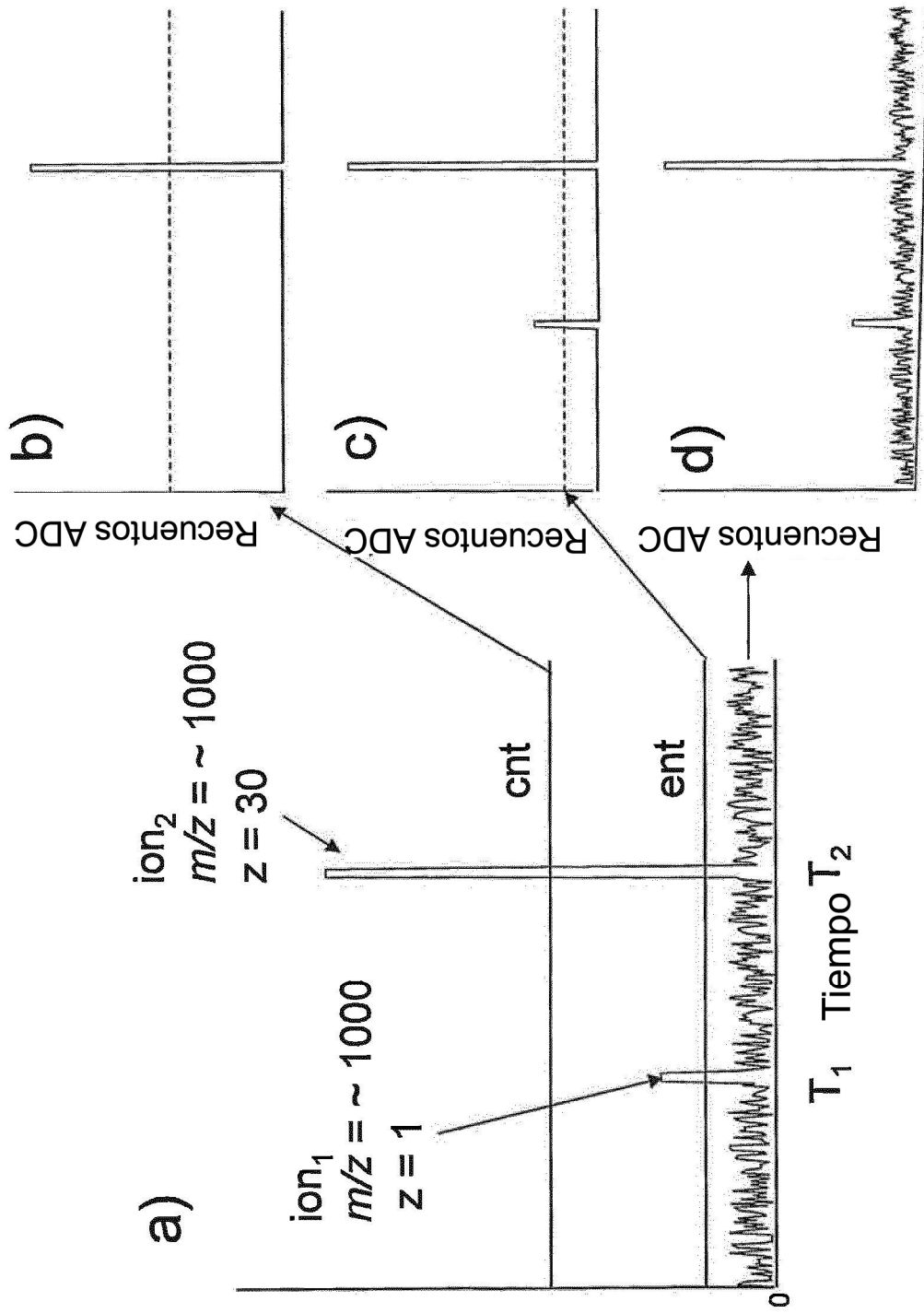


Figura 2

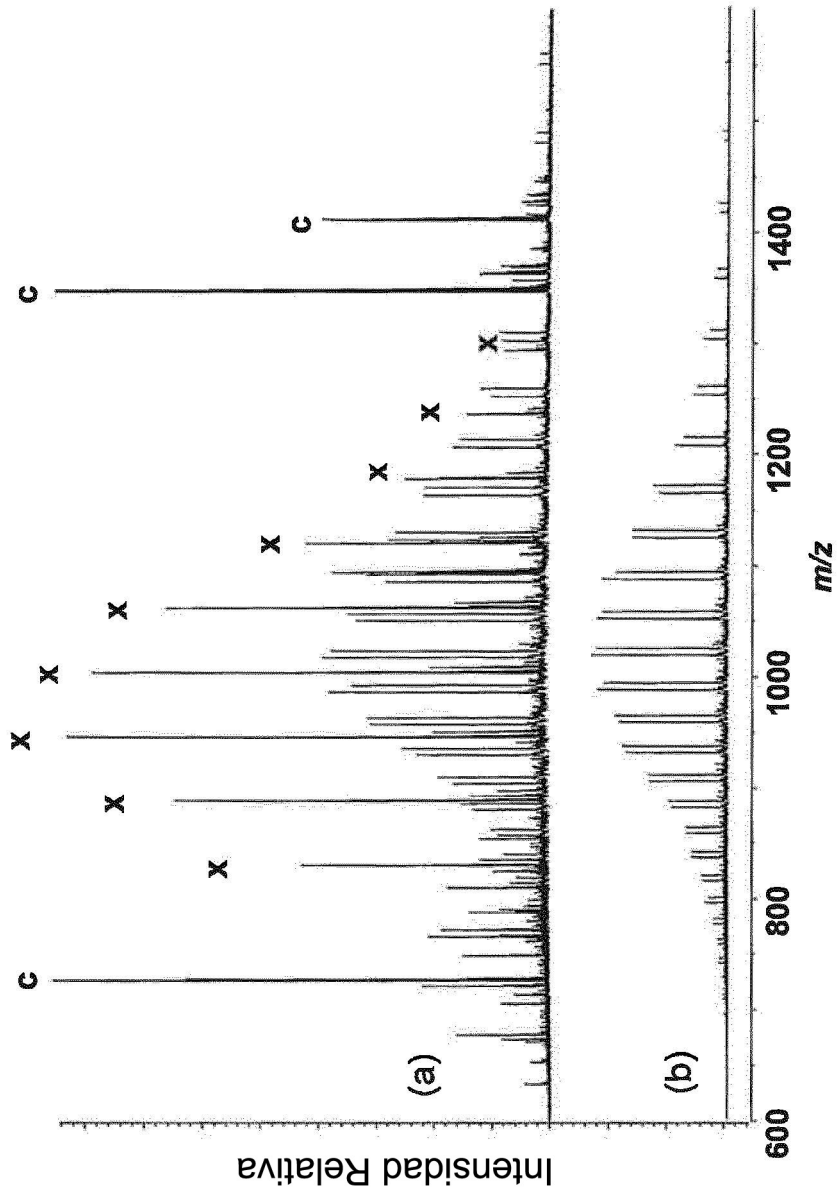


Figura 3

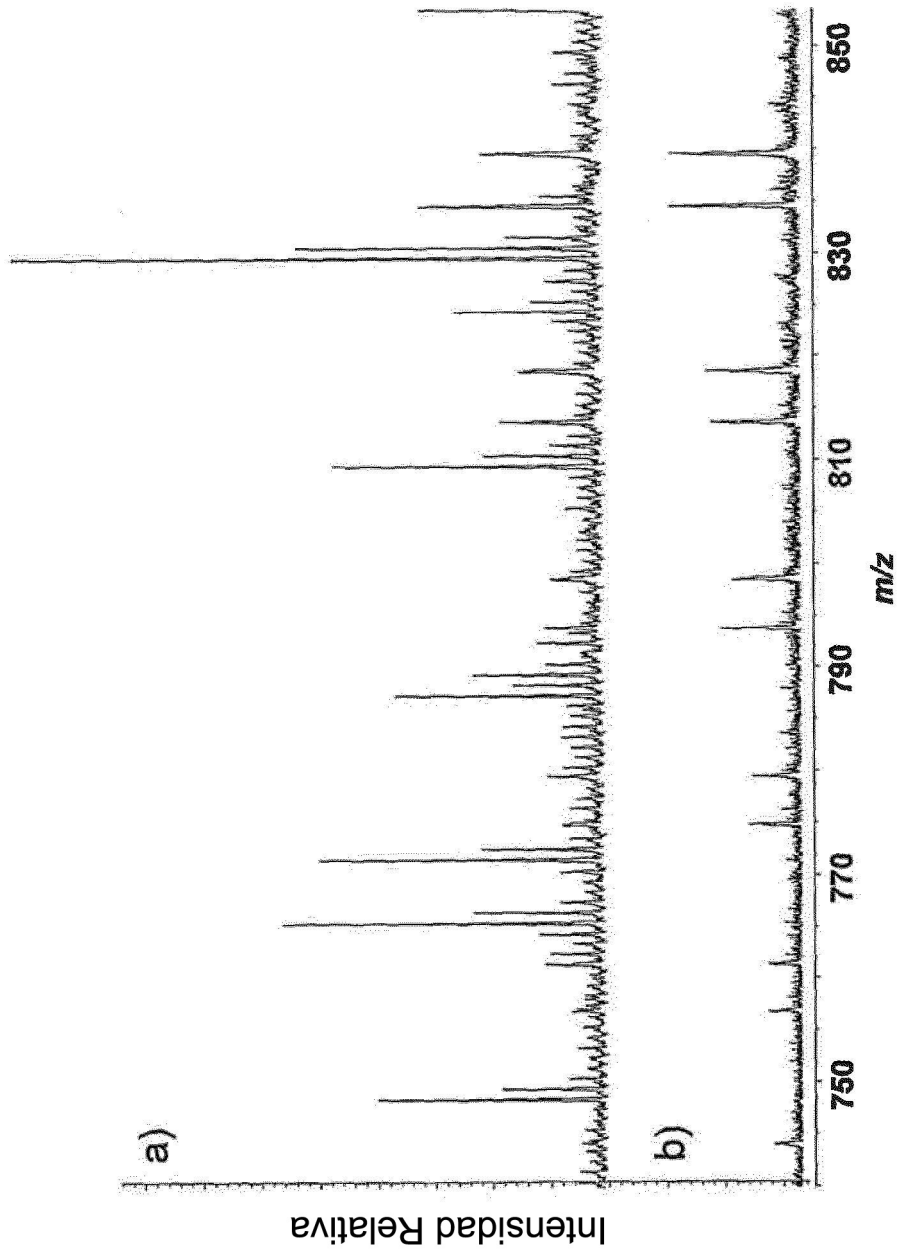


Figura 4

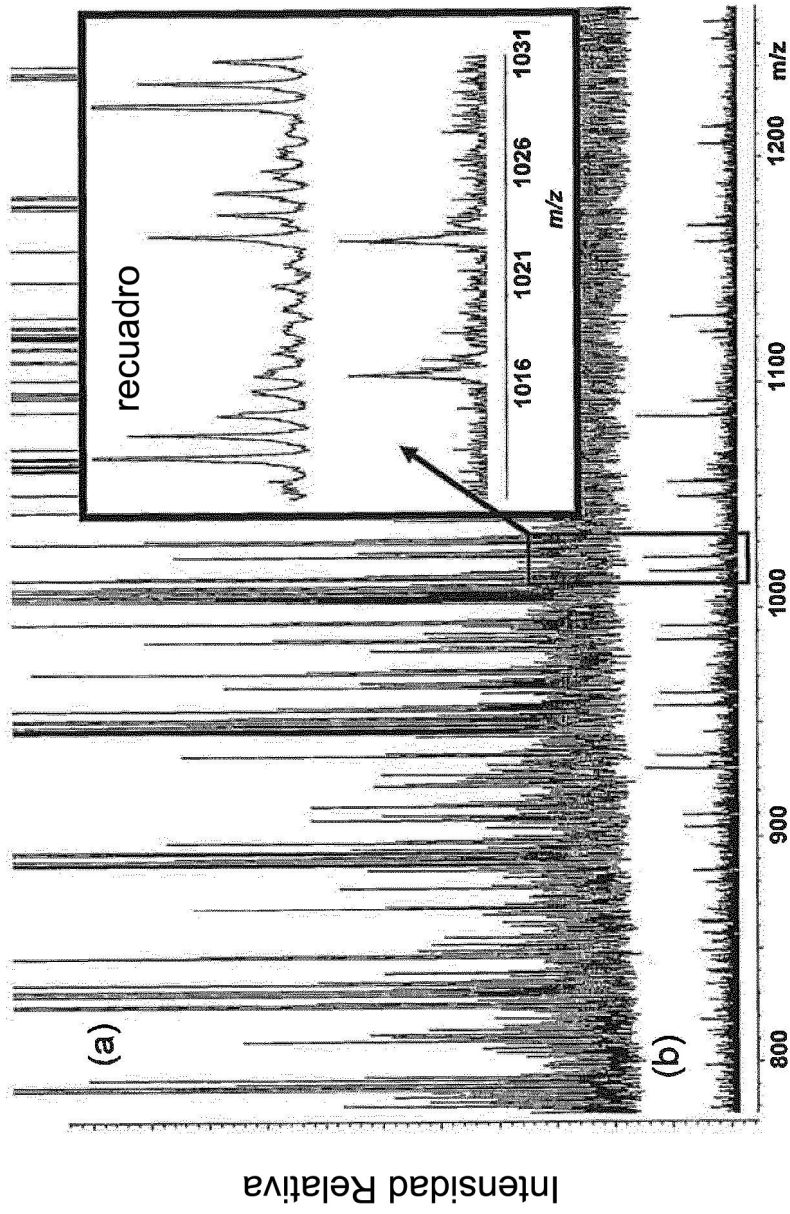


Figura 5

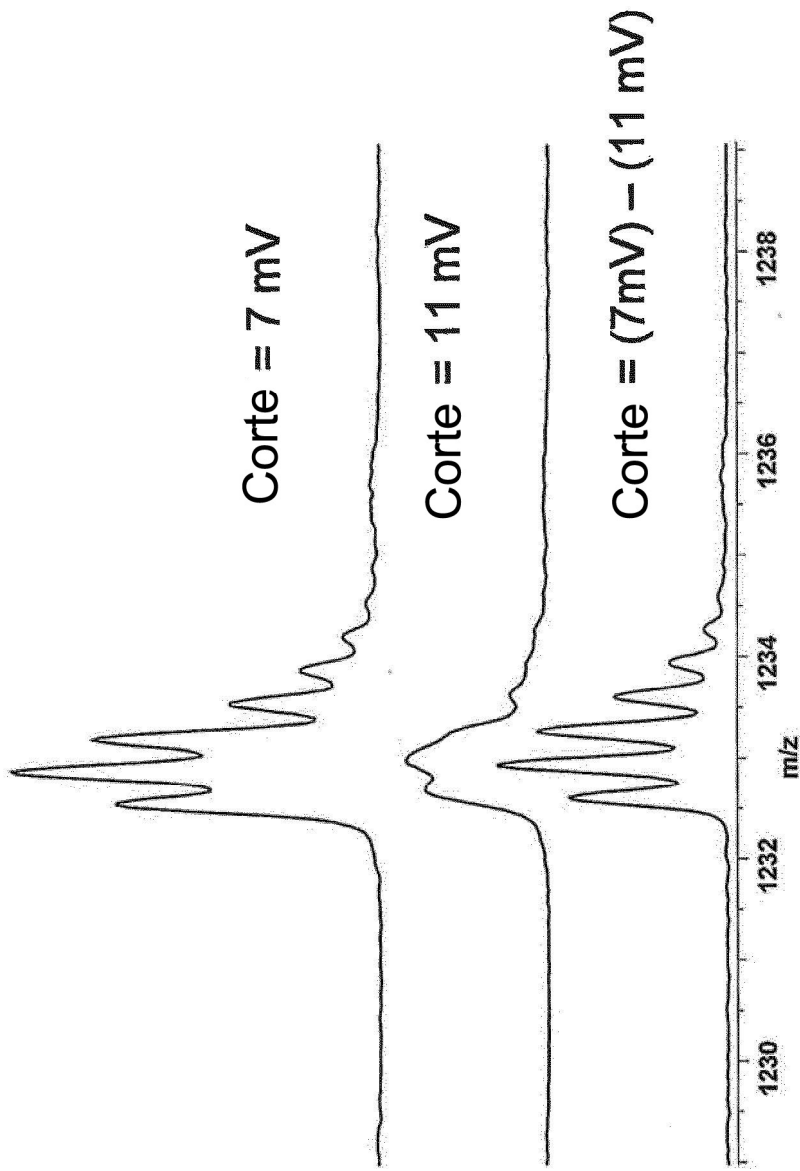


Figura 6

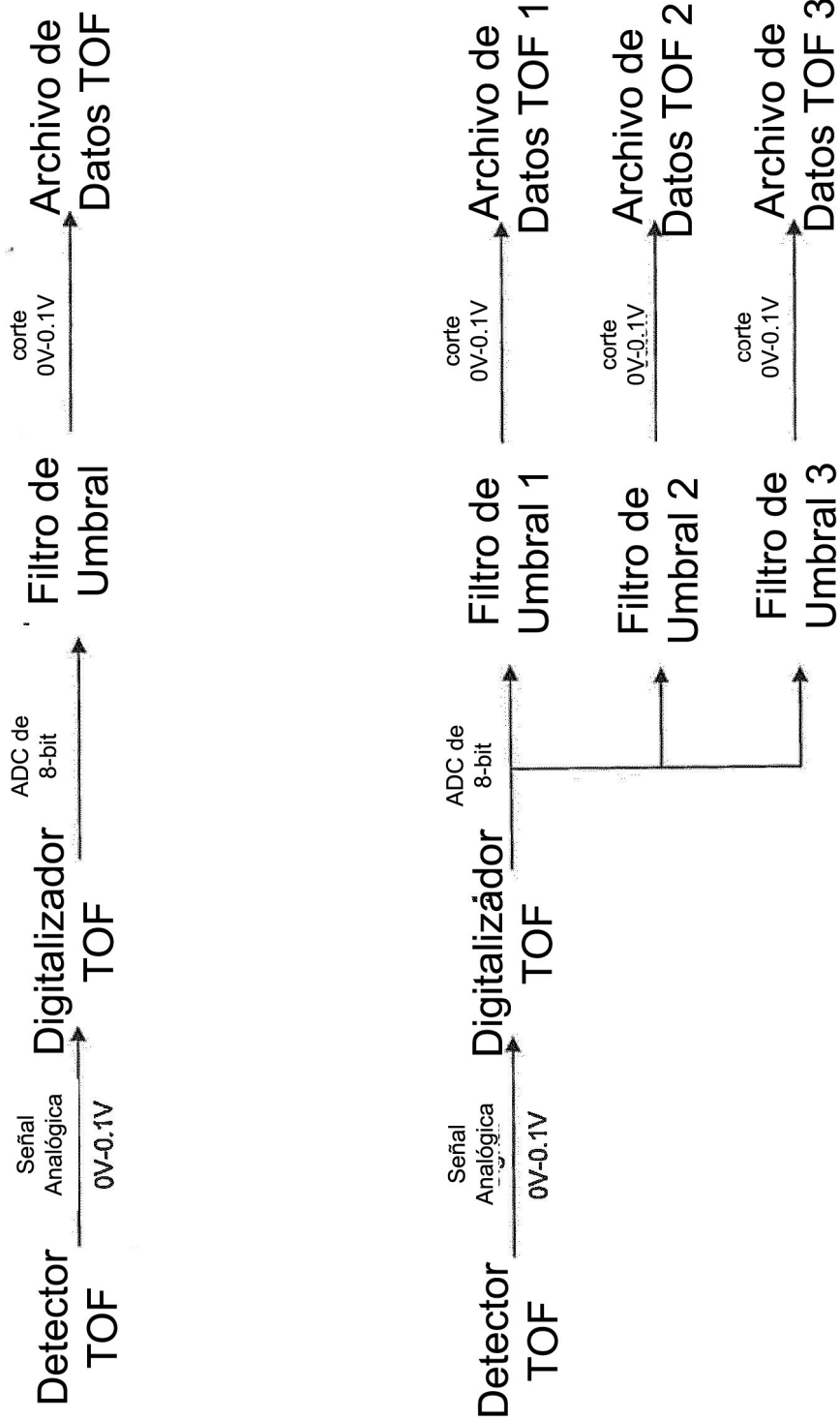


Figura 7

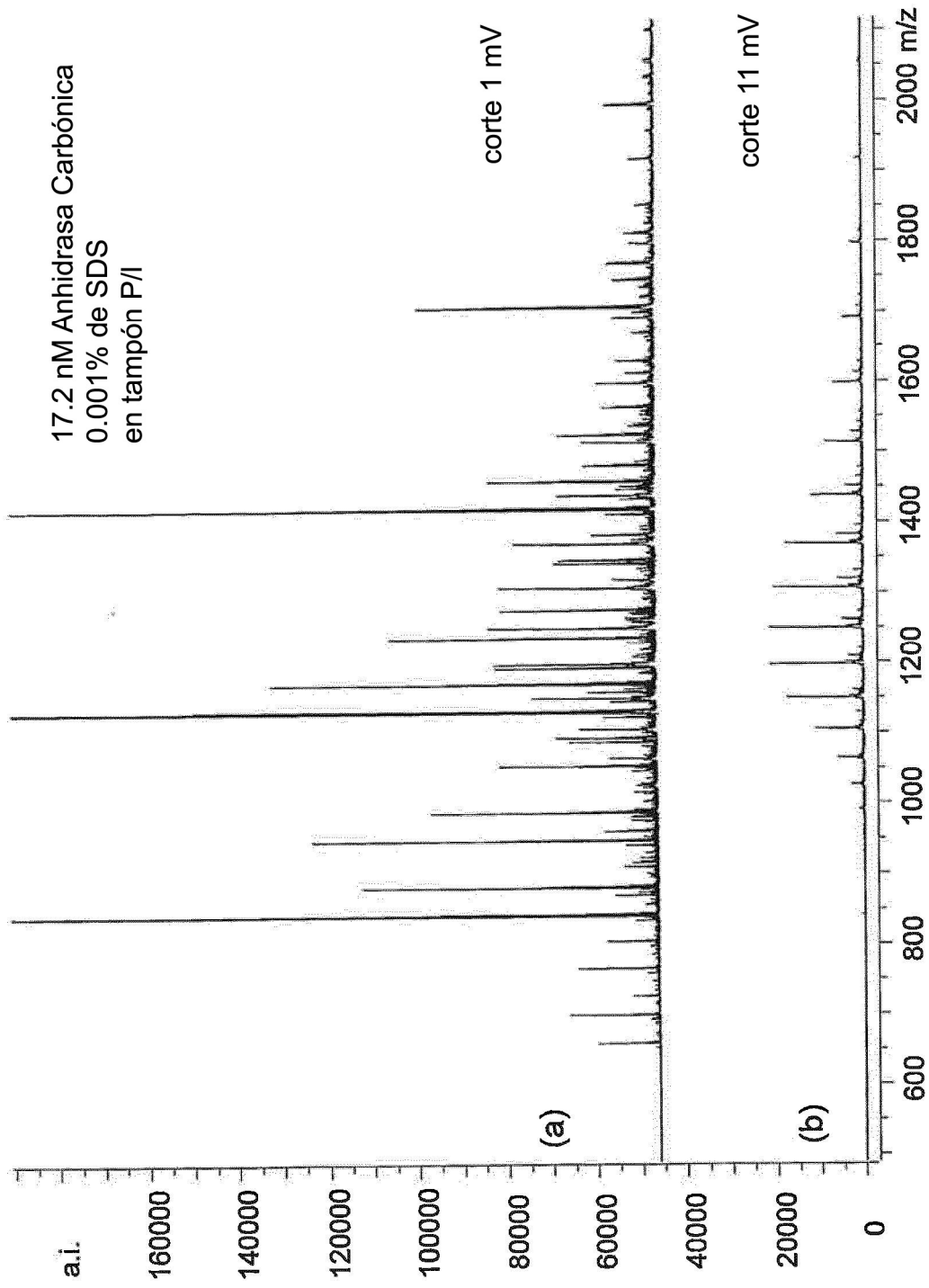


Figura 8