

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 793**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2013 PCT/EP2013/059192**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164427**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2013 E 13723042 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2844753**

54 Título: **Procedimiento de obtención de péptidos**

30 Prioridad:

03.05.2012 FR 1254090

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2019

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
69280 Marcy-l'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**CHARLES, MARIE-HÉLÈNE;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE;
CUBIZOLLES, MYRIAM-LAURE;
DUPONT-FILLIARD, AGNÈS;
LANET, VÉRONIQUE;
RIVERA, FLORENCE;
VERON, LAURENT;
BAUJARD-LAMOTTE, LUCIE y
PEPONNET, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 725 793 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

Procedimiento de obtención de péptidos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de péptidos a partir de células procariotas y/o eucariotas con vistas a su análisis posterior.

El análisis de estos péptidos puede en efecto resultar útil en un gran número de aplicaciones, especialmente en la búsqueda de biomarcadores o en el análisis peptídico bacteriano, por ejemplo en el marco de aplicaciones de identificación, tipificación, detección de marcadores de resistencia y de virulencia, y en el campo médico, farmacéutico y agroalimentario.

10 **Estado de la técnica**

Los protocolos de extracción y de purificación de péptidos según la técnica anterior son generalmente muy largos. Por añadidura estos métodos son, en general, manuales y complejos de realizar.

15 La solicitud internacional WO 2006/031063 describe composiciones que tienen como fin hidrolizar los polipéptidos, obteniéndose esta reacción de hidrólisis de manera química mediante la utilización de una solución denominada « PCA », que comprende un ácido (tal como el ácido acético puro), un disolvente orgánico miscible con agua (tal como el acetonitrilo) y un agente reductor (tal como la tris(2-carboxietil)fosfina). Esta digestión química se realiza a 99,9 °C durante dos horas. Sin embargo, el documento WO 2006/031063 prevé, de forma facultativa, acoplar esta etapa de digestión química a una etapa de digestión enzimática previa, posiblemente con el fin de aumentar la eficacia de la proteólisis. La etapa de digestión enzimática se realiza a 37 °C durante 12 horas utilizando una tripsina modificada, posteriormente en una etapa de desnaturalización térmica (90 °C durante 20 minutos). La etapa de digestión química mencionada antes se realiza a continuación de esta etapa de digestión enzimática (99,9 °C durante 2 horas). El tiempo total de tratamiento de la muestra proteica es por lo tanto superior a 14 horas, lo que representa un inconveniente importante indiscutible. Además, el documento WO 2006/031063 da a conocer la utilización de una tripsina modificada, más costosa que una tripsina convencional.

25 La solicitud internacional WO 2008/128029 divulga, por su parte, un procedimiento de fragmentación proteica o peptídica en solución, comprendiendo dicho procedimiento, posteriormente a la etapa de digestión enzimática o química inicial, una serie de etapas adicionales de separación y de fraccionamiento. Estas últimas contribuyen por una parte a aumentar el tiempo del procedimiento de fraccionamiento en su conjunto y, por otra parte, requieren diversas manipulaciones, haciendo así extremadamente difícil la automatización de este procedimiento.

30 La patente US 7,622,273 describe un protocolo destinado a alterar los polipéptidos o proteínas modificados post-traducción, estando estos péptidos y proteínas directamente ligados a un chip de proteínas y comprendiendo dicho protocolo las etapas de tratamiento químico, digestión enzimática o química y de identificación subsiguiente de proteínas sobre dichos chips de proteínas. La etapa de tratamiento químico comprende la desnaturalización, la reducción y la alquilación de dichas proteínas mientras que la de digestión enzimática incluye la desglucosilación y/o la desfosforilación de dichas proteínas y la digestión de estas últimas por proteólisis química o enzimática. Todas las reacciones se realizan de forma secuencial sobre chips de proteínas. La etapa de tratamiento químico dura un mínimo de 3 horas y 15 minutos y la de digestión enzimática dos horas (véase el Ejemplo 1), es decir una duración mínima de 5 horas y 15 minutos. Ésta, aunque inferior a la duración de los métodos tradicionales- aproximadamente 24 horas - sin embargo sigue siendo insatisfactoria, especialmente con respecto a las exigencias inherentes a los campos clínico o farmacéutico. Y lo que es más, las muestras complejas (plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) pueden exigir estrategias de fraccionamiento o de agotamiento para aislar las proteínas objetivos previamente a la realización del protocolo divulgado en esta patente, lo que aumenta por lo tanto la duración total de tratamiento de dichas muestras.

45 La solicitud internacional WO 2011/130521 describe un método de digestión proteolítica, el cual utiliza una serie de ciclos de presión (por ejemplo de 5 a 35 kpsi, a saber aproximadamente de 344,74 bares a 2413,16 bares) con el fin de reducir la duración de este método. Aunque esta duración parece disminuir con respecto a los métodos de la técnica anterior, no resulta ser menos que el tiempo acumulado que corresponde a las etapas de reducción (DTT 10 mM a 37 °C durante 1 hora) y de alquilación (yodoacetamida 50 mM a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 45 minutos) no puede ser inferior a 1 hora y 45 minutos. Si se añade a esto el tiempo de lisis de los microorganismos (3 minutos a 4500 rpm), el tiempo de manipulación del lisado antes de la etapa de reducción (no precisado) y el inherente a la dilución de la solución antes de la etapa de digestión enzimática bajo presión (igualmente no precisado), está claro que la duración total del protocolo objeto del documento WO 2011/130521 no puede ser inferior a 2 horas, lo que sigue siendo insatisfactorio. A causa de las fuertes presiones utilizadas, este método requiere un equipo complejo, capaz de resistir estas fuertes presiones, delicado para poner en práctica y costoso. Y lo que es más, dicho método necesita etapas suplementarias de filtración con el fin de reducir las concentraciones muy importantes de agente caotrópico (urea 8 M), previamente a la etapa de digestión enzimática con el fin de no arriesgar la inactivación de la enzima utilizada. En efecto, cuando se utilizan con fuerte concentración (a partir de 1 M), los agentes caotrópicos empleados durante la etapa de desnaturalización de las

proteínas - tales como la urea - desnaturalizarán igualmente la estructura proteica de la enzima o enzimas utilizadas durante la etapa de proteólisis enzimática y en consecuencia inactivarán total o parcialmente esta enzima. A fin de evitar esto, es necesario, antes de la etapa de proteólisis enzimática (digestión enzimática), efectuar etapas adicionales de dilución y/o filtración, lo que necesita un lapso de tiempo adicional y hace más compleja la automatización del procedimiento en su conjunto. Una alternativa consiste en utilizar enzimas genéticamente modificadas (por ejemplo tripsinas modificadas) capaces de efectuar una digestión proteica en presencia de concentraciones importantes de agente o agentes caotrópicos. Sin embargo, estas enzimas modificadas poseen cinéticas de acción menos rápidas que las de las enzimas nativas y tienen un coste de compra muy superior al de estas últimas.

Al igual que el documento WO 2011/130521, Santos H. M. et al. [26] requieren un equipo complejo, capaz de resistir a las fuertes presiones, delicado para poner en práctica y costoso. En efecto, esta publicación divulga un procedimiento que comprende la digestión de proteínas escindidas del citocromo c de *D. desulfuricans* ATCC27774 y la identificación de estas proteínas por huellas proteicas (« peptide mass fingerprint », en inglés), comprendiendo dicho procedimiento una etapa de lisis bajo « prensa francesa » con una presión de 9000 psi (esto es aproximadamente 620,26 bares).

Existe por tanto la necesidad de poner a punto un protocolo que permita la obtención de péptidos a partir de células procarionas y/o eucariotas que resuelva todo o parte de los problemas mencionados, esto es un protocolo eficaz, rápido, fácilmente automatizable y que no necesite etapas superfluas de dilución.

Exposición de la invención

Así un objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de péptidos a partir de células procarionas y/o eucariotas, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) lisis de las células procarionas y/o eucariotas y recuperación de las proteínas así obtenidas,

b) desnaturalización de dichas proteínas utilizando al menos un agente desnaturalizante,

c) alquilación de las proteínas desnaturalizadas utilizando al menos un agente alquilante,

d) proteólisis enzimática de las proteínas obtenidas al final de la etapa c) utilizando al menos una enzima proteolítica,

e) recuperación de los péptidos obtenidos al final de la etapa de proteólisis enzimática d),

en el cual la lisis de las células procarionas y/o eucariotas en la etapa a) es una lisis con débil concentración de agente o agentes caotrópicos,

y en el cual al menos las etapas a) y b) se llevan a cabo conjuntamente;

siendo realizada dicha lisis con débil concentración de agente o agentes caotrópicos a una concentración en agente o agentes caotrópicos inferior o igual a 1 M, con preferencia inferior o igual a 100 mM, y

siendo puesto en práctica dicho procedimiento bajo una presión inferior a 100 bares, con preferencia inferior a 50 bares, ventajosamente inferior a 10 bares.

Este procedimiento (protocolo) de obtención de péptidos es aplicable a las células procarionas (por ejemplo a las bacterias), a las células eucariotas (células humanas, animales, levaduras, etc.) o a una mezcla de células procarionas y eucariotas.

Según un modo de realización preferido, se utilizará el procedimiento según la presente invención con el fin de obtener péptidos a partir de células procarionas, con preferencia a partir de bacterias (Gram+ o Gram-).

Por « agente desnaturalizante », se entiende un agente - físico o químico - capaz de inducir un fenómeno de desnaturalización de las proteínas y polipéptidos; abandonando estos últimos su estado nativo y perdiendo poco a poco su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. La desnaturalización puede ser a veces reversible, siendo posible entonces la vuelta al estado nativo y siendo restaurada la actividad de la proteína.

La desnaturalización de las proteínas es debida a la sensibilidad de estas últimas en función de su entorno físico-químico. Las proteínas se desnaturalizan cuando las interacciones entre los residuos son perturbadas por un agente desnaturalizante. Las uniones covalentes entre aminoácidos adyacentes de la cadena polipeptídica no se rompen. En cambio, ciertas condiciones de desnaturalización pueden causar la ruptura de uniones disulfuro entre residuos de cisteína no adyacentes de la cadena polipeptídica y que aseguran la estabilidad global de la estructura cuaternaria de la proteína.

A título de agente desnaturalizante, se distingue principalmente:

a) los agentes físicos, tales como la temperatura; el aumento de la temperatura engendra en efecto una agitación térmica de los átomos de la molécula; esto provoca una ruptura de las interacciones débiles, como las uniones hidrógeno, que estabilizan la estructura espacial;

b) los agentes químicos, tales como:

5 - los ácidos y las bases; al modificar el pH del entorno inducen una modificación de las cargas llevadas por los grupos ionizables y alteran por tanto las uniones iónicas y de hidrógeno que estabilizan la estructura espacial de la proteína;

10 - los agentes caotrópicos como la urea, las sales de guanidina (por ejemplo el hidrocloreto de guanidina o el perclorato de litio); utilizados a fuertes concentraciones, estos compuestos fragilizan fuertemente las uniones de hidrógeno de las proteínas (principales uniones de débil energía responsables del mantenimiento de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas);

- los agentes reductores de tioles como el 2-mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT); ellos permiten la escisión de los puentes disulfuros y contribuyen así a fragilizar la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas;

15 - los detergentes, que actúan por modificación de la interacción con el disolvente acuoso (por ejemplo el dodecilsulfato de sodio - más conocido por el acrónimo « SDS »).

Ciertos agentes desnaturalizantes pueden resultar no reversibles, tales como los metales pesados (Pb, Hg, etc.) y ciertos ácidos (por ejemplo HNO₃, ácido tricloroacético, etc.).

20 Entre los agentes caotrópicos, se hace una distinción, para los fines de la presente invención, entre los agentes caotrópicos denominados « salinos », tales como las sales de guanidina (o de guanidinio) y los agentes caotrópicos denominados « no salinos », tales como la urea.

Por « lisis con débil concentración en « agente o agentes caotrópicos », se entiende una lisis realizada a una concentración en agente o agentes caotrópicos inferior o igual a 1 M, con preferencia inferior o igual a 100 mM.

En efecto, a tales concentraciones, los agentes denominados « caotrópicos » no ejercen ya ninguna actividad desnaturalizante sobre las proteínas y polipéptidos, perdiendo así su propiedad caotrópica.

25 Esta solución técnica se opone a las soluciones tradicionales presentadas en la técnica anterior, las cuales emplean generalmente agentes caotrópicos y más particularmente sales de guanidina (tales como el hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, etc.) - a concentraciones generalmente muy elevadas, del orden de 6 M. Tales concentraciones en agentes caotrópicos - y especialmente en sales (por ejemplo en sales de guanidina) - perturban fuertemente la etapa de proteólisis enzimática, en particular cuando esta última se efectúa utilizando una proteasa de serina tal como la tripsina. El hecho de efectuar, en el marco del procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención, una lisis con débil concentración de agente o agentes caotrópicos permite no solamente mejorar la eficacia de la etapa de proteólisis d) sino también evitar el tener que recurrir a etapas de filtración/dilución adicionales antes de la mencionada etapa de proteólisis. El ahorro de tiempo así realizado permite obtener un protocolo significativamente más rápido que los descritos en los últimos adelantos de la técnica y también más fácilmente automatizable.

Además, esta débil concentración en agente o agentes caotrópicos permite el empleo de enzimas proteolíticas nativas y no necesita recurrir a enzimas proteolíticas modificadas genéticamente, las cuales poseen cinéticas de acción menos rápidas que las de las enzimas nativas y presentan un coste de compra muy superior al coste de compra de estas últimas.

40 Según un modo de realización preferido, se efectúa una lisis con débil concentración en sal o sales, lo que significa que la lisis se realiza a una concentración salina inferior o igual a 50 mM, con preferencia inferior o igual a 30 mM.

Ventajosamente, la lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos se realiza en la ausencia de agente o agentes caotrópicos no salinos tales como la urea. En efecto, el procedimiento según la presente invención no requiere el empleo de tales agentes caotrópicos no salinos.

45 A título de lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos, se utiliza preferiblemente el protocolo universal de lisis celular de procariotas y/o de eucariotas descrito en la solicitud internacional WO 02/10333. Este protocolo universal consiste en un procedimiento de lisis celular de procariotas y/o de eucariotas o de lisis celular simultánea de procariotas y de eucariotas que consiste en adaptar al menos tres de los siguientes parámetros:

50 - un porcentaje en masa de bolas activas (bolas lisantes) de pequeño diámetro en relación con las bolas activas (bolas lisantes) de gran diámetro inferior o igual a 50 %, y/o

- una masa total de bolas lisantes (activas), que comprende una mezcla o no de bolas de pequeño diámetro y/o de bolas de gran diámetro, comprendida entre 50 y 100 % con respecto a la masa total de la muestra biológica tratada, y/o

- una duración de lisis comprendida entre 10 y 20 min, y/o
- un número de bolas de vidrio no lisantes pero de arrastre de las bolas lisantes (activas) inferior a siete (7), y/o
- un número de bolas de hierro no lisantes pero de arrastre de las bolas lisantes (activas) comprendido entre cinco (5) y quince (15), en función de la técnica utilizada:

- 5
- sonicación,
 - vórtice mecánico, o
 - vórtice magnético.

Con preferencia, las bolas lisantes (activas) de pequeño diámetro son de un diámetro comprendido entre 90 y 150 μm y preferiblemente de aproximadamente 100 μm , y las bolas lisantes (activas) de gran diámetro son de un diámetro comprendido entre 400 y 600 μm y preferiblemente de aproximadamente 500 μm .

Siempre de manera preferible, las bolas lisantes (activas) son de vidrio.

Según un modo de realización preferido, siempre como se indica en la solicitud WO 02/10333, si se utiliza la técnica de vórtice mecánico, el procedimiento consiste en efectuar la lisis según los siguientes parámetros:

- una duración de la lisis de 11 a 20 min, preferiblemente de 15 a 20 min y aún más preferiblemente de 20 min,
- 15 - un porcentaje de bolas de 100 μm de diámetro inferior a 50 %, preferiblemente inferior a 30 %, y aún más preferiblemente de 20 %,
 - una masa total de bolas lisantes (activas) superior a 60 %, preferiblemente superior a 80 %, y aún más preferiblemente de 100 % de la masa total de la muestra biológica tratada, y
 - un número de bolas de vidrio inferior a siete (7) preferiblemente igual a uno (1).
- 20 Si se utiliza la técnica de vórtice magnético, el procedimiento consiste, con preferencia, en efectuar una lisis según los siguientes parámetros:
 - una duración de la lisis de 12 a 20 min, preferiblemente de 15 a 20 min y aún más preferiblemente de 20 min,
 - una masa total de bolas lisantes (activas) de 100 μm superior a 80 % y preferiblemente de 100 % de la masa total de la muestra biológica tratada, y
- 25 - un número de bolas de hierro comprendido entre cinco (5) a quince (15) bolas, preferiblemente de diez (10) bolas de hierro.

De una manera general, se utilizan, para los fines de la presente invención, todas las técnicas de lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos sin necesitar recurrir a presiones elevadas del orden de varias centenas incluso miles de bares. En efecto, uno de los objetivos de la presente invención es la puesta a punto de un protocolo de obtención de péptidos eficaz, rápido y que se puede llevar a cabo con la ayuda de un equipo estándar, sin necesitar la utilización de un equipo específicamente adaptado para resistir las fuertes o incluso muy fuertes presiones, equipo complejo para poner en práctica y extremadamente costoso.

El procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención se lleva a cabo con una presión inferior a 100 bares, con preferencia inferior a 50 bares, ventajosamente inferior a 10 bares. Según un modo de realización preferido, el procedimiento según la presente invención se realiza a presión atmosférica.

Según un modo de realización preferido de la presente invención, la lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos es una lisis por sonicación efectuada por medio de una sonda de ultrasonidos. Con preferencia, esta lisis por sonicación se efectúa por medio de dicha sonda de ultrasonidos en presencia de una mezcla de bolas de vidrio de 1000 μm y de bolas de zirconio de 100 μm .

En el marco de una lisis por sonicación, se aplica, con preferencia, el protocolo de lisis por sonicación tal como se describe en la solicitud internacional WO 02/10333 (p. 3, 1. 18-26), esto es utilizando los siguientes parámetros:

- una duración de la lisis de 9 a 20 min, preferiblemente de 12 a 18 min y aún más preferiblemente de 15 min,
- un porcentaje de bolas de 100 μm de diámetro comprendido entre 10 a 50 % preferiblemente entre 20 y 30 % y aún más preferiblemente de 20 %, y
- 45 - una masa total de bolas lisantes (activas) comprendida entre 50 a 100 % de la masa total de la muestra biológica tratada, preferiblemente comprendida entre 75 y 90 % y preferiblemente entre 80 y 85 %.

Con respecto al equipo y la metodología del protocolo de lisis por sonicación *per se*, se utiliza, de manera ventajosa, un sonotrodo externo tal como el sonotrodo VialTweeter comercializado por la compañía Hielscher. Esta sonda consiste en un bloque vibrante taladrado de agujeros en los cuales se pueden insertar tubos tales como los tubos Eppendorf de volumen 1,5 mL en los cuales se introducen las células a lisar en suspensión en un tampón de borato 3 mM a pH 8 así como las bolas de vidrio de 1 mm y de zirconio de 100 µm (50 mg de cada una). El tubo se cierra y después el sonotrodo se activa durante 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos, a una amplitud comprendida entre 50 % y 100 % de la amplitud nominal (entre 5 y 10 vatios para cada tubo según su posición sobre el bloque), preferiblemente 100 % y una relación cíclica de 40 % a 60 %, preferiblemente de 50 %.

La selección de un protocolo de lisis por sonicación no se trata en ningún caso de una elección arbitraria. Muy al contrario, el solicitante ha descubierto, de manera sorprendente, que el rendimiento del procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención era mejor cuando la etapa de lisis a) era una etapa de lisis por sonicación.

Además, el solicitante ha descubierto que la omisión de la etapa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos (activación de la sonda durante 1 h, lo que hace subir la temperatura del conjunto del sistema vibrante a 95 °C) no afectaba a la eficacia de dicho procedimiento. Esto parece ser una característica muy interesante en la medida en que esta etapa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos disminuye la duración de la vida de esta última y necesita un aporte de energía suplementaria.

Como resultado, de manera preferida, la sonda de ultrasonidos no sufre la etapa de precalentamiento previa a la lisis por sonicación.

En lo que concierne a la etapa de proteólisis enzimática d), esta última se realiza por acción de una enzima proteolítica, con preferencia una proteasa de serina, ventajosamente seleccionada del grupo que consiste en la tripsina, la quimotripsina y la elastasa. Con preferencia, dicha enzima proteolítica es la tripsina.

Esta proteólisis enzimática es particularmente preferida con respecto a los tratamientos físico-químicos (tratamientos con peróxido de hidrógeno, bromuro de cianógeno, ácido trifluoroacético, etc.) ya que preserva mejor la estructura de las proteínas, parece más fácil de controlar y escinde las cadenas peptídicas sobre sitios específicos (en C-terminal de los residuos de lisina y arginina en el caso de la tripsina). Por « proteólisis enzimática », se entiende la acción simple o combinada de una o varias enzimas en las condiciones de reacción apropiadas. Las enzimas que efectúan la proteólisis, denominadas proteasas, escinden las proteínas de forma específica del sitio. En efecto, cada proteasa reconoce generalmente una secuencia específica de aminoácidos en cuyo seno esta proteasa efectúa siempre la misma escisión. Ciertas proteasas reconocen un solo aminoácido o una secuencia de dos aminoácidos entre los cuales realizan una escisión, otras proteasas reconocen secuencias de aminoácidos más largas. Estas proteasas pueden ser endoproteasas o exoproteasas. Entre las proteasas conocidas se pueden citar, como se describe en el documento WO 2005/098071:

- las enzimas específicas como la tripsina que escinde la unión peptídica a nivel del grupo carboxílico de los residuos Arg y Lys, la endolisina que escinde la unión peptídica del grupo -CO de las lisinas, la quimotripsina que hidroliza la unión peptídica a nivel del grupo carboxílico de los residuos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), la pepsina que corta a nivel del grupo NH₂ de los residuos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), la proteasa V8 de la cepa V8 de *Staphylococcus aureus* que escinde la unión peptídica a nivel del grupo carboxílico del residuo Glu;

- las enzimas no específicas como la termolisina que proviene de la bacteria *Bacillus thermoproteolyticus* que hidroliza la unión peptídica del grupo NH₂ de los aminoácidos hidrófobos (Xaa-Leu, Xaa-Ile, Xaa-Phe), la subtilisina y la pronasa que son proteasas bacterianas que hidrolizan prácticamente todas las uniones y pueden transformar las proteínas en oligopéptidos en condiciones de reacción controladas (concentración de enzima y duración de la reacción).

Varias proteasas pueden ser utilizadas de forma simultánea, si sus modos de acción son compatibles, o pueden ser utilizadas de forma sucesiva. En el marco de la invención, la digestión de la muestra se realiza, con preferencia, por acción de una enzima proteasa que tiene una buena selectividad de sitios de escisión, por ejemplo la tripsina.

La obtención de péptidos con ayuda de un reactivo químico o de una proteasa, se puede obtener por simple reacción en solución. También se puede llevar a cabo con un horno de microondas [1], o a presión [16], o incluso con un dispositivo de ultrasonidos [17]. En estos tres últimos casos, el protocolo puede ser mucho más rápido.

Entre los péptidos obtenidos por digestión enzimática (proteólisis enzimática), los péptidos específicos de la proteína se denominan péptidos proteotípicos. Estos últimos se detectan fácilmente por espectrometría de masas u otras técnicas analíticas apropiadas y adaptadas a la detección de tales péptidos proteotípicos. Esto representa una ventaja adicional con respecto a una proteólisis química, obtenida por medio de tratamientos físico-químicos.

Con preferencia, el agente desnaturizante es un agente reductor de tioles, con preferencia seleccionado entre el 2-mercaptoetanol, la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), el ditioeritritol (DTE), la tributilfosfina y el ditiotretol (DTT), ventajosamente dicho agente reductor de tioles es la tris(2-carboxietil)fosfina o el ditioeritritol.

Con preferencia, el agente alquilante se selecciona del grupo constituido por la N-etilmaleimida, la yodoacetamida y

la M-biotina, preferiblemente dicho agente alquilante es la yodoacetamida (IAA).

Utilizando los parámetros del procedimiento según la presente invención, se logra disminuir de manera drástica la duración mínima de la etapa de proteólisis enzimática d), hasta ahora un factor limitante. En efecto, la duración mínima de esta etapa de proteólisis enzimática en el marco del procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención es de aproximadamente 15 minutos (con preferencia esta duración mínima es de 5 minutos). La reducción de la duración mínima necesaria para obtener los péptidos al final de la etapa de proteólisis enzimática permite disminuir, de manera muy significativa, la duración total del procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención, puesto que este último puede ser realizado en apenas una media hora aproximadamente.

De una manera general, la duración total del procedimiento de obtención de péptidos según la invención es inferior a 1 hora y 45 minutos, con preferencia inferior a 1 hora, ventajosamente inferior a 45 minutos y, de manera óptima, de aproximadamente 30 minutos.

El ahorro de tiempo significativo así obtenido es absolutamente importante especialmente con vistas a las exigencias inherentes a los campos clínico y/o farmacéutico. Y lo que es más, el procedimiento de obtención de péptidos según la presente invención es perfectamente adecuado para las muestras complejas (plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) que pueden necesitar estrategias de fraccionamiento o de agotamiento adicionales para aislar las proteínas objetivos previamente a la puesta en práctica del procedimiento de obtención de péptidos. Así, y aun incluyendo el tiempo necesario para la realización de tales estrategias adicionales de fraccionamiento o de agotamiento, el tiempo de tratamiento de tales muestras complejas aplicando el procedimiento según la invención continúa siendo muy ventajoso en comparación con los procedimientos de la técnica anterior.

El tratamiento previo de purificación de la muestra de células procariotas y/o eucariotas, antes de la etapa de lisis a) es conocido por los expertos en la técnica y podrán especialmente poner en práctica técnicas de centrifugación, de filtración, de electroforesis o de cromatografía. Estas técnicas de separación se pueden utilizar solas o combinadas entre ellas para obtener una separación multidimensional. Por ejemplo, se puede utilizar una cromatografía multidimensional asociando una separación por cromatografía de intercambio iónico con una cromatografía en fase inversa, como está descrito por T. Fortin et al. [2], o H. Keshishian et al. [3]. En estas publicaciones el medio cromatográfico puede estar en columna o en cartucho (extracción en fase sólida). La fracción electroforética o cromatográfica (o el tiempo de retención en cromatografía mono o multidimensional) de los péptidos proteotípicos es característica de cada péptido y la implementación de estas técnicas permite por lo tanto seleccionar el péptido o los péptidos proteotípicos a cuantificar. Tal fraccionamiento de los péptidos generados permite aumentar la especificidad de la cuantificación posterior por espectrometría de masas.

Una alternativa a las técnicas de electroforesis o de cromatografía, para el fraccionamiento de los péptidos, consiste en purificar específicamente los N-glucopéptidos ([1] y solicitud de patente WO 2008/066629). Sin embargo, tal purificación no permite más que la cuantificación de los péptidos que han sufrido una modificación post-traduccional de tipo N-glucosilación. Ahora bien no todas las proteínas son glucosiladas, lo que limita por tanto su utilización.

En términos de tratamiento previo de purificación de la muestra de células procariotas y/o eucariotas, el procedimiento según la invención comprende, con preferencia, antes de la etapa a), las siguientes etapas adicionales:

a') centrifugación de los microorganismos a una velocidad de rotación comprendida entre 3500 y 4500 rpm, con preferencia del orden de 4000 rpm, durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 minutos y 6 minutos, ventajosamente de 6 minutos, a una temperatura comprendida entre 15 °C y 25 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 °C,

a") eliminación del sobrenadante y recuperación del sedimento que contiene los microorganismos,

a''') recogida de dicho sedimento en un disolvente.

Ventajosamente, el disolvente utilizado en el marco de la presente invención se selecciona entre una solución de acetonitrilo y una solución acuosa que comprende un tampón de pH tal como de iones carbonatos, ventajosamente dicho disolvente es una solución acuosa que comprende iones carbonato, tal como una solución de bicarbonato de amonio.

Como para la etapa de tratamiento previo de purificación de la muestra mencionada antes, el procedimiento puede comprender, llegado el caso, posteriormente a la etapa de recuperación de los péptidos e), etapas de concentración de dichos péptidos. A título de ejemplo, la etapa de recuperación de los péptidos e) puede ir seguida de las siguientes etapas:

e1) Centrifugación con una fuerza centrífuga relativa comprendida entre 13000 g y 15000 g, ventajosamente de aproximadamente 14000 g, con una duración comprendida entre 25 minutos y 35 minutos, ventajosamente de aproximadamente 30 minutos, a una temperatura comprendida entre 2 °C y 6 °C, ventajosamente de aproximadamente 4 °C,

e2) recuperación de todo o parte del sobrenadante que contiene los péptidos.

Según la presente invención, al menos las etapas de lisis a) y desnaturalización b) se efectúan conjuntamente/simultáneamente.

5 Según un primer aspecto de la invención, las etapas a) y b) se efectúan conjuntamente/simultáneamente. Así, y contrariamente a los procedimientos de la técnica anterior, el tiempo de lisis es aprovechado para desnaturalizar las proteínas. Esto permite acortar la duración del procedimiento en su conjunto y facilitar la automatización.

En el marco de este primer aspecto de la invención, la etapa de alquilación de las proteínas desnaturalizadas c) se efectúa a una temperatura conocida por los expertos en la técnica para ser adecuada y también permitir la realización del tratamiento de alquilación de dichas proteínas. Esta etapa de alquilación de las proteínas c) se realiza

10 preferiblemente al abrigo de la luz y a una temperatura comprendida entre 10 °C y 60 °C, preferiblemente entre 15 °C y 25 °C, ventajosamente a temperatura ambiente.

15 Siempre en este primer aspecto de la invención, la etapa de proteólisis enzimática d), por su parte, se efectúa a una temperatura apropiada, a saber igualmente conocida por los expertos en la técnica para permitir la digestión enzimática de las proteínas (proteólisis enzimática). Ventajosamente, esta etapa de proteólisis d) se efectúa a una temperatura comprendida entre 30 °C y 60 °C, con preferencia entre 37 °C y 55 °C, ventajosamente de aproximadamente 50 °C.

En este primer aspecto de la invención, la duración de las etapas conjuntas (simultáneas) de lisis a) y de desnaturalización b) está comprendida entre 3 minutos y 7 minutos, con preferencia entre 4 minutos y 6 minutos, ventajosamente dicha duración es de aproximadamente 5 minutos.

20 Además, y siempre en este primer aspecto de la invención, la duración de la etapa de alquilación de las proteínas desnaturalizadas c) está igualmente comprendida entre 3 minutos y 7 minutos, con preferencia entre 4 minutos y 6 minutos, ventajosamente dicha duración es de aproximadamente 5 minutos.

Siempre según este primer aspecto de la invención, el procedimiento comprende, después de la etapa de alquilación de las proteínas desnaturalizadas c), la siguiente etapa:

25 c1) cuantificación de las proteínas obtenidas en dicha etapa c),

y en el cual la enzima proteolítica se añade durante la etapa de digestión enzimática d) en una relación en peso (p/p) con respecto al peso de las proteínas cuantificadas en la etapa c1) comprendida entre 1/5 y 1/15, con preferencia entre 1/8 y 1/12, ventajosamente de aproximadamente 1/10.

30 Según un segundo aspecto de la invención, al menos las etapas a) - c) del procedimiento según la invención se efectúan conjuntamente (a) + b) + c)).

Según un modo de realización particular de este segundo aspecto de la invención, las etapas a) - c) (lisis, desnaturalización y alquilación) se efectúan conjuntamente (simultáneamente).

Según un tercer aspecto de la presente invención - particularmente preferido - las etapas a) - d) se efectúan conjuntamente (simultáneamente).

35 Según este tercer aspecto de la presente invención - particularmente preferido - las etapas a) - d) del procedimiento según la presente invención se efectúan conjuntamente (a) + b) + c) + d)).

40 Más precisamente, todas las etapas a) - d) se efectúan en un mismo recipiente (por ejemplo un tubo eppendorf) sin necesitar la ayuda de reactivos ni de manipulación entre dichas etapas. Este procedimiento es por tanto fácilmente automatizable, lo que representa una ventaja importante en una óptica de reducción de los costes, de limitación de los riesgos ligados a una manipulación errónea, así como de reducción de los volúmenes a utilizar (lista no limitativa).

45 En el marco de los procedimientos según los aspectos segundo y tercero de la presente invención, es necesario asegurarse de la compatibilidad de los agentes utilizados en las diferentes etapas b), c) y d), y más particularmente en lo que concierne a la compatibilidad del agente desnaturalizante y del agente alquilante, teniendo este último una tendencia natural a alquilar al agente desnaturalizante introducido en la etapa b).

Con preferencia, según estos aspectos segundo y tercero de la invención:

- el agente desnaturalizante es un agente reductor de tioles seleccionado entre la tris(2-carboxietil)fosfina y el ditiotreitól, ventajosamente dicho agente reductor de tioles es la tris(2-carboxietil)fosfina, y
- el agente alquilante es la yodoacetamida.

50 En efecto, el solicitante ha descubierto, de forma sorprendente, que la utilización del par TCEP/yodoacetamida (IAA)

permite obtener muy buenos rendimientos en lo que se refiere al procedimiento según la presente invención.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento de análisis de péptidos de células procariotas y/o eucariotas que comprende las siguientes etapas:

- 5 i) Obtención de los péptidos a partir de dichas células procariotas y/o eucariotas utilizando el procedimiento según la invención,
- ii) Análisis de los péptidos así obtenidos, siendo efectuado dicho análisis con ayuda de un medio de análisis de tipo espectrometría de masas.

10 A título de ejemplo, este procedimiento de análisis de péptidos puede ser, en el campo de la microbiología, un procedimiento de caracterización de al menos un microorganismo procedente de una muestra, que comprende, por ejemplo, la identificación de dicho microorganismo y la determinación de las propiedades de tipificación, resistencia potencial a por lo menos un antimicrobiano y factor de virulencia que concierne a dicho microorganismo.

Otro ejemplo se refiere a la búsqueda de biomarcadores, especialmente a partir de muestras biológicas complejas tales como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, etc.

15 La presente invención se refiere también a un kit de obtención de péptidos a partir de células procariotas y/o eucariotas, siendo dicho kit específicamente adecuado para la puesta en práctica del procedimiento según la presente invención, comprendiendo dicho kit:

20 - un neceser de lisis que permite efectuar la lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos de las células procariotas y/o eucariotas, con preferencia un neceser de lisis por sonicación, permitiendo además dicho neceser de lisis efectuar la lisis bajo una presión inferior a 100 bares, con preferencia inferior a 50 bares, ventajosamente inferior a 10 bares, y de manera particularmente preferida a presión atmosférica,

- una primera solución que comprende al menos un agente desnaturalizante, con preferencia seleccionado entre el 2-mercaptoetanol, la tris(2-carboxietil)fosfina, el ditioeritritol, la tributilfosfina y el ditiotreitrol, ventajosamente dicho agente desnaturalizante es la tris(2-carboxietil)fosfina o el ditiotreitrol,

25 - una segunda solución que comprende al menos un agente alquilante, con preferencia seleccionado del grupo constituido por la N-etilmaleimida, la yodoacetamida y la M-biotina, preferiblemente dicho agente alquilante es la yodoacetamida,

- una tercera solución que comprende al menos una enzima proteolítica, tal como una proteasa de serina, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en la tripsina, la quimotripsina y la elastasa, ventajosamente dicha enzima proteolítica es la tripsina.

30 Este kit comprende, de manera opcional, instrucciones de utilización que definen sus modalidades de utilización.

Según un modo de realización preferido, dicho kit comprende:

- un neceser de lisis por sonicación,
- una primera solución que comprende un agente desnaturalizante seleccionado entre el 2-mercaptoetanol, la tris(2-carboxietil)fosfina, el ditioeritritol, la tributilfosfina y el ditiotreitrol, ventajosamente dicho agente desnaturalizante es la tris(2-carboxietil)fosfina o el ditiotreitrol,
- 35 - una segunda solución que comprende un agente alquilante que consiste en la yodoacetamida,
- una tercera solución que comprende una enzima proteolítica que consiste en la tripsina.

40 Con preferencia, el neceser de lisis y las soluciones primera, segunda y tercera son adecuados y destinados a ser utilizados conjuntamente (simultáneamente), especialmente en el marco del procedimiento según el tercer aspecto de la presente invención, tal como se ha indicado precedentemente

Todavía otro objetivo de la presente invención se refiere a la utilización de un kit según la invención para la puesta en práctica del procedimiento de obtención de péptidos mencionado y/o del procedimiento de análisis de péptidos también mencionado antes.

Breve descripción de los dibujos

45 La invención, su funcionalidad, sus aplicaciones así como sus ventajas se comprenderán mejor con la lectura de la presente descripción, hecha en referencia a las siguientes figuras, en las cuales:

- La figura 1 representa de forma esquemática, un procedimiento de preparación de una muestra de microorganismos según la técnica anterior (P0), comprendiendo este procedimiento especialmente una etapa de lisis a fuerte concentración salina (guanidina 6 M - agente caotrópico) y una larga etapa de digestión tripsina,

- La figura 2 es un esquema que muestra las diferentes etapas de un procedimiento según un primer aspecto de la presente invención (P1),
- La figura 3 representa los datos relativos al establecimiento de un intervalo de calibración de seroalbúmina bovina (BSA), que permite obtener así una correspondencia entre la densidad óptica (DO) medida a 595 nm y la concentración en proteínas (mg/ml), en el marco del mencionado primer aspecto de la presente invención (P1)
- Las figuras 4, 5 y 6 presentan los resultados obtenidos después de la puesta en práctica del procedimiento P1, respectivamente sobre cada uno de los tres microorganismos ensayados, a saber *Escherichia coli* EC5, *Staphylococcus epidermidis* SE9 y *Candida albicans* CA16,
- La figura 7 se refiere a la evaluación de las consecuencias eventuales de la ausencia de la etapa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos en el marco del mencionado procedimiento P1,
- La figura 8 es un esquema que muestra las diferentes etapas de un procedimiento según un tercer aspecto de la presente invención (P2), particularmente ventajoso, en el cual el agente desnaturizante utilizado es la TCEP (« P2-TCEP »),
- La figura 9 es un gráfico que representa los resultados de los análisis de LC-ESI-MS efectuados al final del protocolo P2-TCEP sobre cada uno de los tres microorganismos mencionados, a saber *Escherichia coli* EC5, *Staphylococcus epidermidis* SE9 y *Candida albicans* CA16,
- La figura 10 es un esquema que muestra las diferentes etapas del procedimiento según el tercer aspecto de la presente invención (P2), particularmente ventajoso, en el cual el agente desnaturizante utilizado es el DTT (P2-DTT),
- La figura 11 es un gráfico que representa los resultados de los análisis de LC-ESI-MS efectuados al final del protocolo P2-DTT sobre cada uno de los tres microorganismos mencionados, a saber *Escherichia coli* EC5, *Staphylococcus epidermidis* SE9 y *Candida albicans* CA16.

Descripción detallada de la invención

- Los ejemplos presentados a continuación permiten ilustrar mejor la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos no se deben considerar en ningún caso como limitantes del alcance de dicha invención de cualquier manera que sea.

Ejemplo 1: Protocolo P0

- El protocolo P0 es un protocolo de preparación de muestra tradicionalmente utilizado en la técnica anterior para obtener péptidos a partir de microorganismos. Este procedimiento P0 comprende especialmente una etapa de lisis a fuerte concentración de sal (guanidina 6 M: agente caotrópico) así como una larga etapa de digestión tripsica. Se utiliza P0 a continuación como referencia para evaluar la calidad/la eficacia de los protocolos de obtención de péptidos según un primer aspecto de la invención (protocolo P1). El mencionado protocolo P0 - descrito a continuación en referencia a la figura 1 - dura aproximadamente 24 horas y comprende las siguientes etapas:
- poner en suspensión una a tres colonias de un microorganismo 101 (tal como una bacteria de tipo *E. coli*) cultivado en una placa de Petri 100 en un tubo que comprende una solución 111 compuesta de 100 µL de hidrócloruro de guanidina 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8, y dejar que se produzca la reacción de lisis 110 durante un periodo de 10 minutos aproximadamente;
 - introducir, durante la etapa de desnaturización/reducción 120, una solución 121 que comprende 3,5 µL de DTT a una concentración 150 mM, para obtener una solución final de DTT 5 mM; siendo realizada esta etapa de desnaturización/reducción en 30 minutos aproximadamente;
 - efectuar a continuación la etapa de alquilación 130 introduciendo una solución 131 de IAA a una concentración 150 mM y dejar que se produzca la reacción de alquilación 130 durante 45 minutos aproximadamente, con el fin de realizar un bloqueo (protección) de las funciones tioles sobre las proteínas desnaturizadas;
 - previamente a la etapa de digestión tripsica 150, efectuar una etapa de dilución 140 añadiendo 500 µL de una solución 141 que comprende NH_4HCO_3 50 mM, con el fin de disminuir la fuerte concentración en agente caotrópico (guanidina 6 M) para no perjudicar la actividad enzimática de la tripsina durante la etapa posterior de digestión tripsica 150;
 - realizar esta etapa de digestión tripsica 150 introduciendo 0,5 a 3 µL de una solución 151 de tripsina dosificada a 1 µg/µL; dejar que se produzca la digestión enzimática durante 6 a 20 horas (duración que permite obtener los péptidos 153);
 - detener en la etapa 160 la mencionada digestión tripsica 150 añadiendo 2 µL de ácido fórmico 161; y después

- separar los péptidos 171 así obtenidos, por ejemplo por centrifugación para eliminar las especies no solubles que podrían estorbar a las etapas analíticas posteriores y extraer estas últimas con vistas a realizar, según el caso, las etapas posteriores de análisis.

Ejemplo 2: Protocolo P1

- 5 A continuación se describe un procedimiento según un primer aspecto de la invención - denominado « protocolo P1 » o « procedimiento P1 » - en referencia a la figura 2.

Este protocolo P1 permite una preparación muy rápida de la muestra previamente a las etapas de análisis posteriores, realizadas, por ejemplo, por espectrometría de masas. La duración del conjunto de las etapas del protocolo P1 es de aproximadamente 30 minutos. Comprende especialmente las siguientes etapas esenciales:

- 10 - lisis y reducción 208 (efectuadas conjuntamente/simultáneamente), en presencia de DTT, 5 min bajo ultrasonidos,
 - alquilación 212: en presencia de IAA, 5 min a temperatura ambiente y sin agitación, y
 - proteólisis enzimática (también denominada digestión enzimática) 214: en presencia de tripsina, 15 min a 50 °C.

- 15 Como se ha indicado precedentemente, el protocolo P1 se efectúa aproximadamente en 30 minutos y da resultados semejantes (análisis MRM) a los obtenidos por el protocolo P0 (véase el Ejemplo 1 - duración de tratamiento: 24 h), sobre cada uno de los tres microorganismos ensayados, a saber: *Escherichia coli* EC5 (Gram-; denominado en lo sucesivo « EC5 »), *Staphylococcus epidermidis* SE9 (Gram+; denominado en lo sucesivo « SE9 ») y *Candida albicans* CA16 (levadura; denominado en lo sucesivo « CA16 »).

Materiales y métodos

2.1. Productos utilizados

- 20 • BSA / Sigma/referencia A9085-5G/n° lote: 097K1513
 • Reactivo de Bradford: "Quick Start Bradford Dye Reagent 1X"/Bio-Rad/referencia 500-0205/control 210006065
 • Ácido fórmico /Fluka/referencia: 06450
 • Yodoacetamida, (IAA)/Sigma/I6125-5G/lote 099K5300/MM=184,96
 • DL-1,4-Ditiotreitol 99 %, (DTT)/Acros/165680010/lotA0269816/MM=154,24
 25 • Bicarbonato de amonio/Sigma/A6141-500g/lote n°117K0039/MM=79,06
 • Hidróxido de amonio, NH₄OH/amoníaco 28 %/referencia: 21190292/MM=17,03 g
 • Tripsina / Promega/referencia V511 (almacenaje a -20 °C)
 • « Medio de suspensión » (agua estéril) bioMérieux (ref.: 70640)
 • Cepa de *Escherichia coli*, n° ATCC: 11775T
 30 • Cepa de *Staphylococcus epidermidis*, n°ATCC: 14990
 • Cepa de *Candida albicans*, n°ATCC: 18804

2.2. Preparación de las soluciones tampón

- Tampón n°4: bicarbonato de amonio 50 mM pH 8/almacenaje 1 mes a +4 °C. Para 50 ml de tampón: 197,6 mg de bicarbonato c.s.p. 50 ml de H₂O/pH=7,9; añadir aproximadamente 10 µl de NH₄OH para obtener pH=8
 35 • Tampón n°5: DTT 150 mM/a preparar extemporáneamente. Para 1 ml de tampón: 23,1 mg de DTT c.s.p. 1 ml de tampón de bicarbonato n°4
 • Tampón n°6: IAA 150 mM/a preparar extemporáneamente. Para 1 ml de tampón: 27,7 mg de IAA c.s.p. 1 ml de tampón de bicarbonato n°4

2.3. Materiales

- 40 • Centrifuga APPLI 24/Prolabo
 • Tubos 1,5 ml; « Safe Lock » Eppendorf, ref: 0030120.086

- Centrifuga “de mesa”/Eppendorf/ref 5415C
- Termomezclador “comfort”/Eppendorf
- Lector de microplacas (595 nm) + microplacas+módulos
- Espectrofotómetro UVIKON + cubetas de cuarzo de 80 µl
- 5 • Placas de cultivo BMX: COS (ref.:43041) y SDA (ref.: 43555)
- Densichek Plus bioMérieux: referencia: 21250
- Sonda de ultrasonidos « Hielscher »; ref: PN-66-NNN
- Bolas de lisis de 0,1 mm (pequeño diámetro): « perlas de zirconio/sílice »/Roth/N033.1
- Bolas de lisis de 1 mm (gran diámetro): « Silibeads tipo 1/1,3 mm/ref: 4504/VWR
- 10 • Cavaliers /Dutscher/referencia: 011870A

2.4. Protocolo

2.4.1. Etapas 200, 202, 204, 206, 208 y 210

En primer lugar, se preparan las soluciones tampón nº5 (DTT 150 mM) y nº6 (IAA 150 mM).

- 15 Se pesan, con ayuda de una espátula « cuchara », 50 mg de bolas de 0,1 mm de diámetro (bolas de pequeño diámetro) y 50 mg de bolas de 1 mm de diámetro (bolas de gran diámetro) que se introducen en el tubo nº1. La mezcla de las bolas de pequeño diámetro y gran diámetro está representada en la figura 2 por la referencia numérica 2061.

- 20 Se extrae una de tres colonias 110 a partir de una placa de Petri 100, que se pone en suspensión en agua en la etapa 200. La concentración en bacterias de la suspensión así obtenida se estima por los métodos clásicos de medida de turbidez (medida de la absorción a 550 nm). Se extrae un volumen de suspensión que corresponde a $1 \cdot 10^8$ CFU y después se centrifuga, en la etapa 202, a 4000 rpm durante 5 min, a temperatura ambiente. Al final de esta etapa de centrifugación 202, se recoge el sedimento (EC5, CA16 y SE9) en la etapa 204 en 100 µL de la solución tampón nº4 (tubo nº2), y después se añaden, siempre en la etapa 204, 3,5 µl de DTT 150 mM (tampón nº5) para obtener una concentración final de DTT 5 mM en el seno del tubo nº2. Se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneizar el contenido de este tubo nº2 y se pipetea la mezcla para transferirla al tubo nº1, en la etapa 206, que contiene la mezcla de bolas de « pequeño diámetro » y « gran diámetro » 2061. El tubo nº2 es eliminado.

Se coloca un cavalier sobre el tubo nº1 para evitar que se abra durante la lisis por sonicación.

- 30 Se introduce a continuación el tubo nº1 en uno de los orificios de la sonda de ultrasonidos Hielscher (los 6 orificios en la extremidad de la sonda se supone que son idénticos según el proveedor), después se cuentan 5 min para efectuar la lisis/reducción 208 (ajustes Amplitud 100/Ciclo 1); la temperatura de la mezcla, en el tubo, alcanza 95 °C aproximadamente.

- 35 El tubo nº1 se saca del orificio de la sonda con ayuda de una « palanca » sosteniendo el tubo por el cavalier, después este tubo nº1 se enfría, en la etapa 210, manteniéndolo 1 minuto en hielo con el fin de llevar la temperatura de la mezcla del tubo a temperatura ambiente.

Se centrifuga a continuación brevemente este tubo nº1 con la ayuda de una centrifuga de mesa (al final de la etapa 210), con el fin de recuperar el líquido presente en la tapa y sobre las paredes.

2.4.2. Etapa de alquilación 212 (bloqueo de los puentes disulfuros de las proteínas por metilación con la IAA)

- 40 Se añaden 9 µL de solución de IAA 150 mM (tampón nº6) al seno del tubo nº1 en la etapa 212 para obtener una molaridad final de 12,5 mM, y a continuación dicho tubo nº1 se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

Se deja que se produzca la reacción de alquilación 212 durante 5 min a temperatura ambiente, al abrigo de la luz.

En esta fase, son posibles dos opciones, a saber:

- 45 - se sigue el protocolo P1 con la etapa de digestión trípica 214 (véase la sección 2.4.4. *infra*), utilizando una cantidad predefinida de tripsina, o
- se efectúa, antes de esta etapa de digestión trípica 214 (también denominada proteólisis trípica), una

cuantificación de las proteínas 213 (véase 2.4.3. *infra*), a realizar en el seno de un tubo n°3 que no sirve más que para realizar la cuantificación de las proteínas 213, con el fin de evaluar la cantidad de tripsina a añadir durante la etapa de digestión trípica 214 en función de la concentración en proteínas determinada al final de la etapa de alquilación 212.

5 2.4.3. Cuantificación de las proteínas 213 (según el método de Bradford)

La cuantificación de las proteínas se efectúa sobre el sobrenadante del lisado centrifugado 5 minutos a 14000 rpm. Es necesario por tanto, en un primer tiempo, someter a vórtice el tubo n°1 (homogeneización del lisado), pipetear después el lisado de dicho tubo n°1 (una parte de las bolas de 0,1 mm se recupera a menudo), transferir este lisado a un tubo (tubo n°3) y centrifugar este tubo n°3 a 14000 rpm durante 5 minutos. La cuantificación se efectúa entonces sobre el sobrenadante. El tubo n°3 que comprende las bolas restantes es eliminado.

La cantidad de proteínas se evalúa en función de un intervalo de calibración de BSA diluido en tampón de carbonato y se cuantifica en paralelo al lisado centrifugado (intervalo elaborado a partir de una solución de BSA a 1 mg/ml y después preparación de soluciones a 0,1/0,2/0,3/0,4/0,6/0,8 y 1 mg/ml).

La cuantificación se efectúa sobre 4 µl del sobrenadante del lisado centrifugado y 4 µl de cada una de las soluciones del intervalo, en 200 µl de reactivo Bradford, en microplaca, con una lectura de la densidad óptica (DO) a 595 nm.

Un ejemplo de intervalo de calibración se representa en la figura 3.

2.4.4. Digestión trípica de las proteínas 214

El termomezclador es precalentado, previamente, durante 15 minutos a 50 °C.

Se utiliza una solución de tripsina reconstituida extemporáneamente: frasco de 20 µg de tripsina Promega en 20 µl de la solución de reconstitución contenida en el kit (concentración final 1 µg/µl).

Como es sabido por los expertos en la técnica, la actividad máxima de la tripsina se efectúa a un pH de 7/9.

Si se ha efectuado una cuantificación de las proteínas en la etapa 213, la tripsina a 1 µg/µl se añade en la etapa 214 con una relación en peso (p/p) proteasa/proteína de 1/10, esto es 1 µl (=1 µg) para 10 µg de proteínas.

En cambio, si tal cuantificación de las proteínas 213 no ha sido efectuada entre la etapa de alquilación 212 y la de digestión trípica 214, la tripsina a 1 µg/µl se introduce en el tubo n°1, en la etapa 214, a una cantidad estándar de 10 µl. En efecto el solicitante ha determinado que esta cantidad estándar de tripsina permitía obtener una digestión trípica satisfactoria en el conjunto de las condiciones de cantidades de microorganismos pertinentes para lo que concierne a las aplicaciones de análisis peptídico deseadas.

Siempre en la etapa 214, y posteriormente en la adición de tripsina, la mezcla se somete a vórtice durante 2 segundos (máxima potencia) para homogeneización.

A continuación, se incuba esta mezcla en termomezclador, 15 minutos a 50 °C, 850 rpm.

2.4.5. Parada de la digestión trípica 216

La parada de la digestión trípica se efectúa por la adición de ácido fórmico (c.s.p. pH inferior a 4) en el tubo n°1 en la etapa 216. En efecto, la tripsina se vuelve inactiva a un pH inferior a 4 (este fenómeno es reversible y la tripsina vuelve a ser activa a un pH superior o igual a 4).

El pH de la muestra era de aproximadamente 8 (pH verificado con el peachímetro/sonda especial de micro-tubos) antes de añadir 0,5 µl de ácido fórmico. Es de aproximadamente 3 después de añadir este último en la etapa 216. A continuación la mezcla se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

2.4.6. Etapas 218, 220, 222 y 224

Los péptidos resultantes de la digestión trípica se encuentran en el sobrenadante.

Se pipetea el sobrenadante del tubo n°1 (una parte de las bolas de 0,1 mm se recupera a menudo) y se transfiere a otro tubo (tubo n°4) en la etapa 218 y después se centrifuga, en la etapa 220, durante 30 minutos a 15000 g, a una temperatura de 4 °C.

A continuación se recuperan 85 µl de sobrenadante que contiene los péptidos en la etapa 222 y se introducen en otro tubo (tubo n°5) en la etapa 224. Este último se conserva en el congelador a -20 °C.

Los péptidos contenidos en el tubo n°5 se analizan a continuación por MRM a fin de determinar la calidad/la eficacia del protocolo P1 (etapa de validación de los resultados). Los resultados de estos análisis se presentan a continuación.

2.5. Validación de los resultados

Como se ha indicado precedentemente, este protocolo de obtención de péptidos P1 ha sido validado en MRM. Los resultados, para cada uno de los tres microorganismos estudiados (EC5, SE9 y CA 16), se presentan respectivamente en las figuras 4, 5 y 6.

- 5 La figura 4 muestra los resultados de análisis en modo MRM de péptidos obtenidos con el protocolo P1 a partir de 10^8 CFU de *E.coli* EC5. La experiencia ha sido reproducida tres veces (columnas EC1, EC2, EC3) y comparada a los resultados obtenidos a partir del mismo inóculo utilizando el protocolo P0 (barra rayada). Las barras representan la suma de las áreas bajo la curva de los péptidos correctamente detectables en el cromatograma de masas obtenido en análisis de LC-ESI-MS en modo MRM. Este área total representa la intensidad de las señales obtenidas y está ligada a la concentración de los péptidos correspondientes en la solución analizada. Cuanto más grande es este área, más elevada es esta concentración. Las figuras indican también (puntos unidos por líneas) el número de péptidos correctamente detectados, sobre un total posible de 60 para los ajustes del análisis que se han elegido.

- 15 El primer gráfico (parte alta de la figura 4) representa los datos obtenidos al normalizar la cantidad de proteínas presente en la muestra analizada por LC-ESI-MS. El segundo gráfico (parte baja de la figura 4) representa los datos obtenidos al modificar el volumen de producto de reacción P1 para analizar el equivalente de 10^7 CFU iniciales. En este caso, la comparación de las áreas bajo las curvas permite comparar los rendimientos globales obtenidos sobre las diferentes muestras.

En conclusión parece que:

- 20 - el procedimiento P1 es reproducible sobre la suma de las áreas acumuladas bajo las curvas de los péptidos detectados, lo que significa que las intensidades de estas curvas son globalmente reproducibles y sugiere que los rendimientos de las diferentes etapas del protocolo son reproducibles,
- este procedimiento es equivalente al procedimiento de referencia P0 (presentado en el Ejemplo 1) en términos del número de péptidos detectados en lo que concierne a EC5,
- 25 - este procedimiento P1 permite una digestión por la tripsina más eficaz que en las condiciones del protocolo P0, como demuestra el hecho de que el análisis de masas proteicas equivalentes antes de la digestión se traduce por intensidades de señales de los péptidos superiores para P1 que para P0.
- en cambio, a cantidad de bacterias igual al principio del protocolo, las intensidades de detección de los péptidos son equivalentes para los dos protocolos, lo que parece sugerir que las etapas antes de la digestión del protocolo P1 son menos eficaces que en el protocolo P0.

- 30 La figura 5 es el equivalente del primer gráfico de la figura 4 (en la parte alta) en el caso en que el microorganismo estudiado es *S.epidermidis* SE9. Según esta figura 5, parece que las conclusiones sacadas anteriormente en el caso de *E.coli* EC5 son igualmente válidas en el caso de otras especies de bacterias - especialmente *S.epidermidis* SE9. Esto es aún más verdadero cuando la masa equivalente de proteínas inyectadas es más débil en la condición de P0 que en las condiciones de P1.

- 35 En conclusión, y a pesar de que la cantidad inyectada sea más débil para P0, el procedimiento P1 se puede considerar cuando menos equivalente a P0 en lo que concierne a la detección de péptidos de SE9.

La figura 6, por su parte, muestra que en lo que concierne a la detección de péptidos de CA16:

- el procedimiento P1 es reproducible sobre la suma de las áreas y,
- este procedimiento es superior al procedimiento de referencia P0.

40 2.6. Influencia de la etapa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos

- El protocolo P1 detallado antes comprende una etapa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos « Hielscher » dejando funcionar esta sonda « a vacío » en las condiciones utilizadas después para la etapa de lisis del protocolo P1 durante 1 hora. En estas condiciones, la temperatura del bloque vibrante de la sonda es de aproximadamente 95 °C. Como esta etapa de precalentamiento es susceptible de disminuir la duración de vida de la sonda de ultrasonidos, el solicitante ha buscado determinar las consecuencias eventuales de una omisión de dicha etapa de precalentamiento de esta sonda de ultrasonidos en el marco del protocolo P1. El protocolo P1 así modificado se denomina P1'.

- La figura 7 representa las cantidades de proteínas determinadas posteriormente en la etapa de lisis por sonicación y reducción 208 (véase la figura 2) después de diferentes tiempos de funcionamiento de la sonda de sonicación (0, 20, 40, 60, 80 minutos, correspondiendo el tiempo 0 min a la utilización de una sonda utilizada después de un tiempo de inactividad suficiente para que el bloque vibrante se encuentre a temperatura ambiente). Las concentraciones en proteínas han sido determinadas por un test de Bradford y se registran sobre los gráficos y se expresan en μg para 10^8 células bacterianas.

Esta cuantificación se puede efectuar por el método de Bradford o por cualquier otro método apropiado, conocido por los expertos en la técnica.

Los resultados representados sobre esta figura 7 confirman que no es necesario precalentar la sonda antes de su utilización para obtener una lisis bacteriana de calidad.

- 5 Además, los análisis MRM confirman igualmente que los ensayos de digestión trípica de las tres cepas EC5, SE9 y CA16, sin precalentamiento de la sonda de ultrasonidos utilizada para efectuar la lisis (protocolo P1'), dan resultados superiores al protocolo de referencia P0.

- 10 Además de las ventajas inherentes a los procedimientos de obtención de péptidos según la presente invención (véase anteriormente), estos procedimientos permiten prescindir de la etapa previa de precalentamiento de la sonda de ultrasonidos, en el marco de una lisis por sonicación. Esto da como resultado especialmente un aumento de la longevidad de dicha sonda de ultrasonidos así como un ahorro de energía.

Ejemplo 3: Protocolo P2

- 15 Un tercer aspecto de la invención, denominado « protocolo P2 » (o « procedimiento P2 »), se describe a continuación, en referencia a la figura 8. Este procedimiento P2 es particularmente preferido en el sentido de la presente invención.

En este Ejemplo 3, el procedimiento P2 se utiliza para obtener péptidos a partir de microorganismos.

Este procedimiento P2 es un protocolo de obtención de péptidos a partir de células procariotas y/o eucariotas muy rápido, que se puede emplear especialmente previamente a las etapas de análisis de tipo análisis por espectrometría de masas.

- 20 Lo mismo que el protocolo P1, este protocolo P2 se efectúa igualmente en 30 min aproximadamente pero combina las etapas de lisis, desnaturalización/reducción, alquilación y digestión enzimática en una sola etapa 810. Estas diferentes etapas se efectúan en efecto conjuntamente/simultáneamente en un solo y mismo tubo a 50 °C, bajo ultrasonidos durante 30 minutos. Así, no hay necesidad de efectuar intervenciones manuales entre estas etapas, ni tampoco de añadir reactivos a lo largo del procedimiento. El protocolo P2 es por lo tanto fácil de automatizar, evita eventuales errores de manipulación y permite la utilización de volúmenes más pequeños. Además, permite igualmente el análisis de muestras complejas (orina, plasma, líquido cefalorraquídeo), tal como se ha explicado precedentemente.

- 30 Este protocolo P2 da resultados semejantes (análisis por LC-ESI-MS) a los resultados del protocolo P1 descrito en el Ejemplo 2, sobre dos de los tres microorganismos ensayados: Escherichia Coli (Gram-) y Staphylococcus epidermidis (Gram+) tanto en número de péptidos como en área acumulada.

Materiales y métodos

3.1 Productos utilizados

- Ácido fórmico /Fluka/referencia: 06450
- Yodoacetamida, (IAA)/Sigma/I6125-5G/MM=184,96
- 35 • Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) hidrocloreto solución 0,5 M /Sigma/646547
- Bicarbonato de amonio/Sigma/A6141-500 g/MM=79,06
- Hidróxido de amonio, NH₄OH/amoníaco 28 %/referencia: 21190292/MM=17,03 g
- Tripsina / Promega/referencia V511 (almacenaje a -20 °C)
- « Medio de suspensión » (agua estéril) bioMérieux (ref.: 70640)
- 40 • Cepa de Escherichia coli, n° ATCC: 11775T
- Cepa de Staphylococcus epidermidis, n°ATCC: 14990
- Cepa de Candida albicans, n°ATCC: 18804

3.2 Preparación de las soluciones tampón

- 45 • Tampón n°4: bicarbonato de amonio 50 mM pH 8/almacenaje 1 mes a +4 °C. Para 50 ml de tampón: 197,6 mg de bicarbonato c.s.p. 50 ml de H₂O/pH=7,9; adición de aproximadamente 10 µl de NH₄OH para obtener pH=8
- Tampón n°5: TCEP 150 mM/para preparar extemporáneamente/dilución en tampón n°4

- Tampón n°6: IAA 150 mM/para preparar extemporáneamente

Para 1 ml de tampón: 27,7 mg de IAA c.s.p. 1 ml de tampón bicarbonato n°4

3.3 Materiales

- Centrífuga "APPLI 24"/Prolabo
- 5 • Tubos 1,5 ml; « Safe Lock » Eppendorf, ref: 0030120.086
- Centrífuga "de mesa"/Eppendorf/ref 5415C
- Espectrofotómetro UVIKON + cubetas de cuarzo de 80 µl
- Cajas de cultivo BMX: COS (ref.:43041) y SDA (ref.: 43555)
- Sonda de ultrasonidos « Hielscher »; ref: PN-66-NNN
- 10 • Bolas de lisis de 0,1 mm (pequeño diámetro): « perlas de zirconio/sílice »/Roth/N033.1
- Bolas de lisis de 1 mm (gran diámetro): « Silibeads tipo 1/1,3 mm/ref: 4504/VWR
- Cavaliers /Dutscher/referencia: 011870A

3.4 Protocolo

3.4.1. Etapas preliminares 800, 802, 804 y 806

- 15 De manera práctica, se preparan primero las soluciones tampón n°5 (dilución de una solución de TCEP 500 mM a 150 mM en tampón n°4 de bicarbonato) y n°6 (27,7 mg/ml de IAA en tampón n°4 de bicarbonato).

A continuación, se pesan, con ayuda de una espátula « cuchara », 50 mg de bolas de 0,1 mm de diámetro y 50 mg de bolas de 1 mm de diámetro que se introducen en un tubo de 1,5 ml. Tal como se ha indicado antes, la mezcla de las bolas de « pequeño diámetro » y de « gran diámetro » es designada por la referencia numérica 8061, siempre en la figura 8.

20 Se extrae una de tres colonias 110 a partir de una placa de Petri 100, que se pone en suspensión en agua en la etapa 800. La concentración en bacterias de la suspensión así obtenida se estima por los métodos clásicos de medida de turbidez (medida de la absorción a 550 nm). Se toma un volumen de suspensión que corresponde a 1.108 CFU y después se centrifuga en la etapa 802, a 4000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al final de esta etapa de centrifugación 802, se recoge el sedimento (EC5, CA16 y SE9) en la etapa 804 en 100 µL de la solución tampón n°4 (tubo n°2), después se añaden, siempre en la etapa 804, 3,5 µl de TCEP 150 mM (tampón n°5) para obtener una concentración final de TCEP 5 mM en el seno del tubo n°2. Se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneizar el contenido de este tubo n°2 y se pipetea esta mezcla para transferirla, en la etapa 806, al tubo n°1 que contiene las bolas 8061. El tubo n°2 es eliminado entonces.

30 3.4.2. Etapas 808, 810 y 812

A continuación se introducen en el tubo n°1, en la etapa 808:

- 9 µL de solución de IAA 150 mM (tampón n°6) a fin de obtener una molaridad final de 12,5 mM; y
- 10 µl de tripsina a 1µg/µl.

Después de esto, se mantiene en vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

- 35 Se coloca un cavalier sobre el tubo n°1 para evitar que se abra durante la lisis por sonicación.

Este tubo n°1 se introduce después en uno de los orificios de la sonda Hielscher (los 6 orificios del extremo de la sonda se supone que son idénticos según el proveedor), después se cuentan 30 minutos (ajustes Amplitud 100/Ciclo 0,5) para permitir que las reacciones de lisis, de reducción, de alquilación y de digestión trípica se produzcan conjuntamente/simultáneamente. La temperatura de la mezcla en el tubo n°1, durante la etapa 810, alcanza aproximadamente 50 °C.

40 El tubo n°1 se saca después del orificio de la sonda con ayuda de una « palanca » sujetando el tubo por el cavalier, después este tubo n°1 se enfría, en la etapa 812, conservándole 1 minuto en hielo con el fin de llevar la temperatura de la mezcla del tubo a temperatura ambiente.

En resumen, la etapa principal 810 permite efectuar conjuntamente/simultáneamente:

a. La lisis de las bacterias / reducción de las proteínas (la TCEP rompe los puentes disulfuros): obtención de las proteínas desnaturalizadas/reducidas

b. La alquilación: etapa de bloqueo de los puentes disulfuros de las proteínas por metilación con la IAA

c. La digestión trípica de las proteínas: obtención de los péptidos.

5 3.4.3. Parada de la digestión trípica 814

La parada de la digestión trípica se efectúa por adición de ácido fórmico (c.s.p. pH inferior a 4) en el tubo n°1, en la etapa 814. Como se ha indicado precedentemente, el hecho de bajar el pH por debajo de 4 inactiva, de forma reversible, la actividad enzimática de la tripsina.

10 El pH de la muestra es de aproximadamente 8 (pH verificado con peachímetro/sonda especial para micro-tubos) antes de la adición de 0,5 µl de ácido fórmico. Es de aproximadamente 3 después de la adición de este último en la etapa 814. La mezcla se mantiene después en vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

3.4.4. Etapas 816, 818, 820 y 822

15 Los péptidos obtenidos al final de la etapa principal 810 se encuentran en el sobrenadante. Así pues, este último se pipetea (una parte de las bolas de 0,1 mm se recupera a menudo) y se transfiere, en la etapa 816, a otro tubo (tubo n°3), después se centrifuga, en la etapa 818, durante 30 minutos, a 15000 g y a 4 °C.

A continuación se recuperan en la etapa 820, 90 µl de sobrenadante que comprende los péptidos y se introducen en otro tubo (tubo n°4) en la etapa 822. Este último se mantiene en el congelador a una temperatura de -20 °C.

3.5. Validación de los resultados

20 Los péptidos contenidos en el tubo n°4 se analizan después por LC-ESI-MS con el fin de determinar la calidad/la eficacia del protocolo de lisis P2 (etapa de validación de los resultados). Los resultados, para cada uno de los tres microorganismos estudiados, se presentan en la figura 9. Dicho protocolo P2 se denomina « P2-TCEP » en esta figura 9, en referencia a la TCEP, utilizada como agente desnaturalizante en el presente ejemplo 3.

25 Como se ha explicado precedentemente, los valores representados en esta figura 9 corresponden a los números de péptidos objetivos correctamente detectados así como al área bajo la curva acumulada de estos péptidos en el espectro de masas obtenido por LC-ESI-MS en modo MRM.

Como se representa en esta figura 9, este protocolo P2 proporciona resultados semejantes a los obtenidos por el protocolo P1 mencionado sobre dos de los tres microorganismos ensayados, a saber *Escherichia Coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados obtenidos para *Candida albicans* son satisfactorios a nivel del número de péptidos.

30 Como se ha indicado precedentemente, los procedimientos (protocolos) de obtención de péptidos según la presente invención se inscriben en el marco de la preparación de muestras de células procariotas y/o eucariotas con vistas a su análisis posterior.

Ejemplo 4: Protocolo P2 con DTT (« P2-DTT »)

35 El protocolo P2 objeto del ejemplo 3 anterior ha sido reproducido reemplazando la TCEP por otro agente desnaturalizante, a saber el DTT. A fines de claridad, este procedimiento P2 con DTT se denomina « P2-DTT ».

El protocolo P2-DTT se describe a continuación, en referencia a la figura 10.

Este protocolo P2-DTT da resultados semejantes (análisis por LC-ESI-MS) al protocolo P1 descrito en el ejemplo 2, sobre dos de los tres microorganismos ensayados: *Escherichia Coli* (Gram-) y *Staphylococcus epidermidis* (Gram+) tanto en número de péptidos como en área acumulada.

40 Materiales y métodos

4.1 Productos utilizados

- Ácido fórmico /Fluka/referencia: 06450
- Yodoacetamida, (IAA)/Sigma/I6125-5G/MM=184,96
- DL-1,4-Ditiotreitol al 99 %,
- 45 • (DTT)/Acros/165680010/lote A0269816/MM=154,24
- Bicarbonato de amonio/Sigma/A6141-500 g/MM=79,06

- Hidróxido de amonio, NH₄OH/amoniaco 28 %/referencia: 21190292/MM=17,03 g
 - Tripsina / Sigma/T0303 (almacenaje a -20 °C)
 - « Medio de suspensión » (agua estéril) bioMérieux (ref.: 70640)
 - Cepa de Escherichia coli, n° ATCC: 11775T
- 5
- Cepa de Staphylococcus epidermidis, n°ATCC: 14990
 - Cepa de Candida albicans, n°ATCC: 18804

4.2 Preparación de las soluciones tampón

- Tampón n°4: bicarbonato de amonio 50 mM pH 8/almacenaje 1 mes a +4 °C. Para 50 ml de tampón: 197,6 mg de bicarbonato c.s.p. 50 ml de H₂O/pH=7,9; adición de aproximadamente 10 µl de NH₄OH para obtener pH=8
- 10
- Tampón n°5: DTT 150 mM/a preparar extemporáneamente. Para 1 ml de tampón: 23,1 mg de DTT c.s.p. 1 ml de tampón de bicarbonato n°4
 - Tampón n°6: IAA 150 mM/a preparar extemporáneamente. Para 1 ml de tampón: 27,7 mg de IAA c.s.p. 1 ml de tampón de bicarbonato n°4

4.3 Materiales

- 15
- Centrífuga APPLI 24/Prolabo
 - Tubos 1,5 ml; « Safe Lock » Eppendorf, ref: 0030120.086
 - Centrífuga “de mesa”/Eppendorf/ref 5415C
 - Espectrofotómetro UVIKON + cubetas de cuarzo de 80 µl
 - Cajas de cultivo BMX: COS (ref.:43041) y SDA (ref.: 43555)
- 20
- Sonda de ultrasonidos « Hielscher »; ref: PN-66-NNN
 - Bolas de lisis 0,1 mm (pequeño diámetro): « perlas de zirconio/sílice »/Roth/N033.1
 - Bolas de lisis 1 mm (gran diámetro): « Silibeads tipo 1/1,3 mm/ref: 4504/VWR
 - Cavaliers /Dutscher/referencia: 011870A

4.4 Protocolo

4.4.1. Etapas preliminares 1000, 1002, 1004 y 1006

En primer lugar, se preparan las soluciones tampón n°5 (DTT 150 mM) y n°6 (IAA 150 mM).

A continuación, se pesan, con ayuda de una espátula « cuchara », 50 mg de bolas de 0,1 mm de diámetro y 50 mg de bolas de 1 mm de diámetro que se introducen en un tubo de 1,5 ml. Tal como se ha indicado antes, la mezcla de las bolas de « pequeño diámetro » y de « gran diámetro » es designada por la referencia numérica 10061, siempre en la figura 10.

Se extrae una de tres colonias 110 a partir de una placa de Petri 100, que se pone en suspensión en agua en la etapa 1000. La concentración en bacterias de la suspensión así obtenida se estima por los métodos clásicos de medida de turbidez (medida de la absorción a 550 nm). Se extrae un volumen de suspensión que corresponde a 1.10⁸ CFU y después se centrifuga, en la etapa 1002, a 4000 rpm durante 5 min, a temperatura ambiente. Al final de esta etapa de centrifugación 1002, se recoge el sedimento (EC5, CA16 y SE9) en la etapa 1004 en 100 µL de la solución tampón n°4 (tubo n°2), y después se añaden, siempre en la etapa 1004, 3,5 µl de DTT 150mM (tampón n°5) para obtener una concentración final de DTT 5 mM en el seno del tubo n°2. Se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneizar el contenido de este tubo n°2 y se pipetea esta mezcla para transferirla, en la etapa 1006, al tubo n°1 que contiene las bolas 10061. El tubo n°2 es entonces eliminado.

4.4.2. Etapas 1008, 1010 y 1012

A continuación se introducen en el tubo n°1, en la etapa 1008:

- 9 µL de solución de IAA 150 mM (tampón n°6) a fin de obtener una molaridad final de 12,5 mM; y

- 10 µl de tripsina a 1µg/µl.

Después de esto, se mantiene en vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

Se coloca un cavalier sobre el tubo n°1 para evitar que se abra durante la lisis por sonicación.

5 Este tubo n°1 se introduce después en uno de los orificios de la sonda Hielscher (los 6 orificios del extremo de la sonda se supone que son idénticos según el proveedor), después se cuentan 30 minutos (ajustes Amplitud 100/Ciclo 0,5) para permitir que las reacciones de lisis, de reducción, de alquilación y de digestión trípica se produzcan conjuntamente/simultáneamente. La temperatura de la mezcla en el tubo n°1, durante la etapa 1010, alcanza aproximadamente 50 °C.

10 El tubo n°1 se saca después del orificio de la sonda con ayuda de una « palanca » sujetando el tubo por el cavalier, después este tubo n°1 se enfría, en la etapa 1012, conservándole 1 minuto en hielo con el fin de llevar la temperatura de la mezcla del tubo a temperatura ambiente.

En resumen, la etapa principal 1010 permite efectuar conjuntamente/simultáneamente:

a. La lisis de las bacterias / reducción de las proteínas (el DTT rompe los puentes disulfuros): obtención de las proteínas desnaturalizadas/reducidas

15 **b. La alquilación:** etapa de bloqueo de los puentes disulfuros de las proteínas por metilación con la IAA

c. La digestión trípica de las proteínas: obtención de los péptidos.

4.4.3. Parada de la digestión trípica 1014

20 La parada de la digestión trípica se efectúa por adición de ácido fórmico (c.s.p. pH inferior a 4) en el tubo n°1, en la etapa 1014. Como se ha indicado precedentemente, el hecho de bajar el pH por debajo de 4 inactiva, de forma reversible, la actividad enzimática de la tripsina.

El pH de la muestra es de aproximadamente 8 (pH verificado con peachímetro/sonda especial para micro-tubos) antes de la adición de 0,5 µl de ácido fórmico. Es de aproximadamente 3 después de añadir este último en la etapa 1014. A continuación la mezcla se somete a vórtice 2 segundos (potencia máxima) para homogeneización.

4.4.4. Etapas 1016, 1018, 1020 y 1022

25 Los péptidos obtenidos al final de la etapa principal 1010 se encuentran en el sobrenadante. Así pues, este último se pipetea (una parte de las bolas de 0,1 mm se recupera a menudo) y se transfiere, en la etapa 1016, a otro tubo (tubo n°3), después se centrifuga, en la etapa 1018, durante 30 minutos, a 15000 g y a 4 °C.

A continuación 90 µl de sobrenadante que comprende los péptidos se recuperan en la etapa 1020 y se introducen en otro tubo (tubo n°4) en la etapa 1022. Este último se mantiene en el congelador a una temperatura de -20 °C.

30 4.5. Validación de los resultados

Los péptidos contenidos en el tubo n°4 se analizan después por LC-ESI-MS con el fin de determinar la calidad/la eficacia del protocolo de lisis P2-DTT (etapa de validación de los resultados). Los resultados, para cada uno de los tres microorganismos estudiados, se presentan en la figura 11.

35 Como se ha explicado precedentemente, los valores representados en esta figura 11 corresponden a los números de péptidos objetivos correctamente detectados así como al área bajo la curva acumulada de estos péptidos en el espectro de masas obtenido por LC-ESI-MS en modo MRM.

40 Como se representa en esta figura 11, este protocolo P2 con DTT proporciona resultados semejantes a los obtenidos por el protocolo P1 mencionado sobre dos de los tres microorganismos ensayados, a saber Escherichia Coli y Staphylococcus epidermidis. Los resultados obtenidos para Candida albicans son satisfactorios a nivel del número de péptidos.

Además, parece que la utilización de DTT en lugar de TCEP como agente desnaturalizante no tiene impacto visible tanto a nivel del número de péptidos como del área acumulada global.

45 Como se ha indicado precedentemente, los procedimientos (protocolos) de obtención de péptidos según la presente invención se inscriben en el marco de la preparación de muestras de células procariotas y/o eucariotas con vistas a su análisis posterior.

El análisis de estas muestras puede permitir especialmente la búsqueda de biomarcadores y pueden ser aplicados, entre otros, al análisis de muestras biológicas complejas tales como el plasma, la orina, el líquido cefalorraquídeo, etc.

En el campo de la microbiología, los péptidos obtenidos por el procedimiento según la invención pueden permitir la caracterización de al menos un microorganismo procedente de una muestra, que comprende por ejemplo, la identificación de dicho microorganismo y la determinación de las propiedades de tipificación, resistencia potencial a por lo menos un antimicrobiano y factor de virulencia que conciernen a dicho microorganismo.

- 5 Este procedimiento de caracterización de al menos un microorganismo puede resultar particularmente útil en el campo médico, farmacéutico o agroalimentario.

La determinación de las propiedades de tipificación, resistencia a por lo menos un antimicrobiano y factor de virulencia se realiza por espectrometría de masas utilizando proteínas, péptidos y/o productos metabólicos como marcadores de dichas propiedades de tipificación, resistencia a por lo menos un antimicrobiano y factor de virulencia. Con preferencia la espectrometría de masas es de tipo MS/MS, ventajosamente esta espectrometría de masas es la MRM.

Con preferencia, la determinación de los productos de tipificación, resistencia a por lo menos un antimicrobiano y factor de virulencia se efectúa en el mismo equipo de espectrometría de masas, simultáneamente.

- 15 De manera óptima, se puede considerar una espectrometría de masas de tipo MS/MS, y ventajosamente de tipo MRM, como etapa de confirmación de la identificación del microorganismo.

En efecto, la caracterización de los microorganismos es fundamental tanto en el campo clínico como en el campo industrial. Así, por ejemplo, la identificación de resistencias a los antimicrobianos tales como los antibióticos, y la detección de factores de virulencia son elementos esenciales para asegurar una atención óptima de los pacientes. Igualmente, la tipificación es crucial para los estudios epidemiológicos y para asegurar la lucha contra las enfermedades nosocomiales.

Por tipificación de un microorganismo, se entiende la diferenciación de varias cepas en el seno de una misma especie. La tipificación tiene un valor epidemiológico, el clínico sabe si la cepa aislada en el paciente proviene de la misma fuente que otras cepas aparentemente idénticas y aisladas en otros pacientes o en el ambiente. Esto permite poner así en evidencia un foco infeccioso en el seno de un hospital o durante una intoxicación alimentaria. A título de ejemplos no limitativos de marcadores de propiedades de tipificación en las bacterias, se pueden citar los péptidos que presentan mutaciones características tales como los productos de transcripción de los genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA* de *Escherichia coli*, y los de los genes *arc*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi* y *yqjL* de *Staphylococcus aureus*. A título de ejemplos no limitativos de marcadores de propiedades de tipificación en los protozoos, se pueden citar los productos del gen quitinasa de *Entamoeba histolytica* y *E. dispar*. A título de ejemplos no limitativos de marcadores de propiedades de tipificación en los virus, se pueden citar los productos del gen polimerasa del virus de la inmunodeficiencia humana. Finalmente, a título de ejemplos no limitativos de marcadores de propiedades de tipificación en las levaduras, se pueden citar los productos de transcripción de los fragmentos de genes *aat1a*, *acc1*, *adp1*, *mpib*, *syal*, *vps13*, y *zwf1b* de *Candida albicans*.

Por determinación de la resistencia a por lo menos un antimicrobiano, se entiende la determinación de la susceptibilidad de un microorganismo a ser destruido por un antimicrobiano. Así, si el microorganismo es una bacteria, el antimicrobiano contra el que puede desarrollar una resistencia es un antibiótico, si es un protozoo, el antimicrobiano es un anti-parasitario, si es un virus, el antimicrobiano es un antiviral, y, si es una levadura, el antimicrobiano es un anti-fúngico. Las proteínas implicadas en los mecanismos de resistencia difieren según la familia y la especie. A título de ejemplos no limitativos de marcadores de resistencia a por lo menos un antibiótico útiles en las bacterias, se pueden citar los productos de transcripción del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus*, que confieren una resistencia a la metilina, y permiten indicar si las cepas son metilino-resistentes (cepas MRSA) o bien metilino-sensibles (cepas MSSA). Se puede citar igualmente la proteína TEM-2 que permite indicar si las cepas de *Escherichia coli* son resistentes a las penicilinas pero sensibles a otras clases de antibióticos tipo cefalosporinas o carbapenemos. Otro marcador es la enzima denominada KPC (para *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemasa) que confiere una resistencia a los carbapenemos. Otro ejemplo de marcador de resistencia para *Staphylococcus aureus* es el perfil metabólico representativo de la resistencia a la vancomicina tal como está descrito por Alexander E. et al en el poster « Metabolomics-based approach to antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* » presentado en el congreso de la ASMS, 2009. A título de ejemplo no limitativo de marcadores de resistencia a por lo menos un anti-parasitario útil en los protozoos, se puede citar la superóxido dismutasa que contiene hierro (Fe-SOD) y la peroxirredoxina cuya expresión incrementada confiere una resistencia al metronidazol. A título de ejemplo no limitativo de marcador de resistencia a por lo menos un antiviral útil en los virus, se pueden citar las mutaciones de la enzima transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana, que confiere una sensibilidad disminuida a los inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa. Finalmente, a título de ejemplo no limitativo de marcadores de resistencia a por lo menos un antifúngico útil en las levaduras, se puede citar la mutación de la enzima 1-3-b-D-glucano sintasa de *Candida albicans*, que confiere una disminución de la sensibilidad a las equinocandinas. Como otro ejemplo, se puede evocar la resistencia a los antifúngicos azoles en *Candida albicans*, en particular la resistencia al fluconazol. El objetivo del fluconazol es una enzima, la lanosterol desmetilasa, implicada en la síntesis del ergosterol, constituyente principal de la pared fúngica. La resistencia al fluconazol puede estar asociada con la aparición de mutaciones puntuales en el gen *erg11* que codifica la lanosterol desmetilasa.

Por determinación de la virulencia de un microorganismo, se entiende la evaluación del carácter patógeno, nocivo y violento del microorganismo. A título de ejemplos no limitativos de marcador de virulencia en las bacterias, se puede citar la PVL (Panton-Valentine Leucocidina), toxina citolítica de dos componentes sinérgicos (LukFet LukS), presente en *Staphylococcus aureus*, que es una de las toxinas más virulentas que causan afecciones cutáneas, celulitis extensiva, osteomielitis y neumonías necrosantes, y está implicada en sobreinfecciones virales. Otros ejemplos comprenden la autolisina y la pneumolisina presentes en *Streptococcus pneumoniae*, especie responsable de infecciones de las vías respiratorias, de meningitis y de bacteriemias, así como las toxinas A y B de *Clostridium difficile*, bacteria comensal del intestino, las cuales provocan o bien la alteración de la permeabilidad del epitelio intestinal (toxina A), o bien atacan directamente a las células del epitelio (toxina B), o bien disminuyen en el tiempo el tránsito intestinal y la absorción intestinal, provocando una diarrea (acción combinada de las toxinas A y B). Se pueden citar también como ejemplo las Shiga toxinas Stx1 y Stx2 presentes en *Escherichia coli*. Estas dos citotoxinas son consideradas factores de virulencia importantes de las *Escherichia coli* enterohemorrágicas. Ellas son responsables de complicaciones como la colitis hemorrágica o el síndrome hemolítico urémico. A título de ejemplo no limitativo de marcador de virulencia en los protozoos, se pueden citar los antioxidantes (Fe-hidrogenasa 2, peroxirredoxina, superóxido dismutasa) presentes en *Entamoeba histolytica*, especie responsable de disentería, absceso hepático. A título de ejemplo no limitativo de marcador de virulencia en los virus, se puede citar la variante de la proteína Nef en el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1, tipo más patógeno en el ser humano. Finalmente, a título de ejemplo no limitativo de marcador de virulencia en las levaduras, se puede citar la lipasa 8 en *Candida albicans*, especie responsable de candidosis superficiales pero también de candidosis septicémicas y diseminadas. Conviene observar que los marcadores específicos de la virulencia son igualmente utilizables como marcador de tipificación.

A título de ejemplo de bacterias que pueden ser caracterizadas por un procedimiento de análisis de este tipo, se pueden citar:

- *Escherichia coli* utilizando TEM-2 como marcador de resistencia y de tipificación, así como Shiga toxinas, OmpA como marcador de virulencia y de tipificación.

- *Enterococcus faecalis* y *faecium* utilizando VanA y VanB para la resistencia y la tipificación, así como ESP (Enterococcal Surface Protein) para la virulencia y la tipificación, o bien

- *Staphylococcus aureus* utilizando la proteína denominada proteína A de unión a inmunoglobulina G (también denominada proteína A) para la tipificación, la proteína PBP2a para la resistencia, incluso la tipificación, así como la proteína PVL para la virulencia, incluso igualmente la tipificación.

A título de otros microorganismos que pueden ser caracterizados por el mencionado procedimiento de análisis, se pueden citar:

- *Candida albicans* utilizando la enzima 1-3-b-D-glucano sintasa o bien la enzima lanosterol desmetilasa como marcador de resistencia y de tipificación, así como la lipasa 8 como marcador de virulencia y de tipificación.

Las células procariotas y/o eucariotas según la presente invención se pueden obtener a partir de cualquier muestra susceptible de contener un microorganismo objetivo. La muestra puede ser de origen biológico, ya sea animal, vegetal o humano. También puede corresponder a una extracción de fluido biológico (sangre total, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, secreción orgánica, por ejemplo), una extracción tisular o de células aisladas. Esta extracción puede ser utilizada tal cual en la medida en que los marcadores de caracterización de los microorganismos estén disponibles en la muestra ensayada, o bien puede sufrir previamente al análisis, una preparación de tipo enriquecimiento, extracción, concentración, purificación, cultivo, según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La muestra puede ser de origen industrial, ya sea, según una lista no exhaustiva, una toma de aire, una toma de agua, una toma efectuada sobre una superficie, una pieza o un producto manufacturado, un producto de origen alimentario. Entre las muestras de origen alimentario, se pueden citar de forma no exhaustiva una muestra de producto lácteo (yogures, quesos), de carne, de pescado, de huevos, de frutas, de verduras, de agua, de bebida (leche, zumo de frutas, gaseosa, etc.). Estas muestras de origen alimentario pueden provenir también de salsas o de platos elaborados. Una muestra alimentaria puede proceder finalmente de una alimentación destinada a los animales, tal como concretamente harinas animales.

La espectrometría de masas a llevar a cabo en el procedimiento de análisis según la invención es ampliamente conocida por los expertos en la técnica como un instrumento potente para el análisis y la detección de diferentes tipos de moléculas. De forma general, todo tipo de molécula que puede ser ionizada puede ser detectada en función de su masa molecular con ayuda de un espectrómetro de masas. Según la naturaleza de la molécula a detectar, de origen proteico o metabólico, pueden ser más adecuadas ciertas tecnologías de espectrometría de masas. Sin embargo, cualquiera que sea el método de espectrometría de masas utilizado para la detección, este último comprende una etapa de ionización de la molécula objetivo en iones llamados moleculares, en el caso presente una etapa de ionización de los marcadores de caracterización, y una etapa de separación de los iones moleculares obtenidos en función de su masa.

Por lo tanto todos los espectrómetros de masas constan de:

i) una fuente de ionización destinada a ionizar los marcadores presentes en la muestra a analizar, es decir a conferir una carga positiva o negativa a estos marcadores;

5 ii) un analizador de masas destinado a separar los marcadores ionizados, o iones 15 moleculares, en función de su relación de masa sobre carga (m/z);

iii) un detector destinado a medir la señal producida ya sea directamente por los iones moleculares, ya sea por los iones producidos a partir de los iones moleculares, como se detallan más adelante.

10 La etapa de ionización necesaria para la realización de una espectrometría de masas puede ser efectuada por todo procedimiento conocido por los expertos en la técnica. La fuente de ionización permite llevar las moléculas a cuantificar a un estado gaseoso y ionizado. Una fuente de ionización puede ser utilizada ya sea en modo positivo para estudiar los iones positivos, ya sea en modo negativo para estudiar los iones negativos. Existen diversos tipos de fuentes y serán utilizados en función del resultado buscado y de las moléculas analizadas. Se pueden citar, especialmente:

- la ionización electrónica (EI), la ionización química (CI) y la desorción-ionización química (DCI)

15 - el bombardeo por átomos rápidos (FAB), átomos metaestables (MAB) o iones (SIMS, LSIMS)

- el acoplamiento de plasma inductivo (ICP)

- la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI)

- la electronebulización o electropulverización (ESI)

- la desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI), activada por una superficie (SELDI) o sobre silicio (DIOS)

20 - la ionización-desorción por interacción con especies metaestables (DART).

Especialmente, la ionización se puede llevar a cabo como sigue: la muestra que contiene las moléculas objetivos se introduce en una fuente de ionización, donde las moléculas son ionizadas en estado gaseoso y transformadas así en iones moleculares que corresponden a las moléculas iniciales. Una fuente de ionización de tipo electropulverización (ESI para ElectroSpray Ionisation) permite ionizar una molécula haciéndola pasar de un estado líquido a un estado gaseoso. Los iones moleculares obtenidos corresponden entonces a las moléculas presentes en estado líquido, teniendo en modo positivo uno, dos, incluso tres protones suplementarios o más y son por tanto portadores de una, dos, incluso tres cargas o más. Por ejemplo, cuando la molécula objetivo es una proteína, una ionización de los péptidos proteotípicos obtenidos después de fraccionamiento de la proteína objetivo, gracias a una fuente de tipo electropulverización que funciona en modo positivo, conduce a iones polipeptídicos en estado gaseoso, con uno, dos, incluso tres protones suplementarios o más y que son por tanto portadores de una, dos, incluso tres cargas o más, y permite el paso de un estado líquido a un estado gaseoso [18]. Este tipo de fuente es particularmente adecuado, cuando las moléculas objetivos o péptidos proteotípicos obtenidos son previamente separados por cromatografía de líquidos en fase inversa. Sin embargo, la eficiencia de ionización de las moléculas presentes en la muestra puede variar en función de la concentración y de la naturaleza de las diferentes especies presentes. Este fenómeno se traduce por un efecto matriz bien conocido por los expertos en la técnica.

Una fuente de ionización MALDI permitirá ionizar las moléculas, a partir de una muestra en estado sólido.

40 El analizador de masas en el que se lleva a cabo la etapa de separación de los marcadores ionizados en función de su relación masa/carga (m/z) es todo analizador de masas conocido por los expertos en la técnica. Se pueden citar los analizadores de baja resolución, del tipo cuadripolo o cuadrupolo (Q), trampa de iones 3D (IT) o lineal (LIT), igualmente denominados trampa iónica, y los analizadores de alta resolución, que permiten medir la masa exacta de los analitos y que utilizan especialmente el sector magnético acoplado a un sector eléctrico, el tiempo de vuelo (TOF).

45 La separación de los iones moleculares en función de su relación m/z se puede realizar una sola vez (espectrometría de masas simple o MS), o bien se pueden considerar varias separaciones MS sucesivas. Cuando se realizan dos separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS/MS o MS². Cuando se realizan tres separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS/MS/MS o MS³ y más generalmente, cuando se realizan n separaciones MS sucesivas, el análisis se denomina MS n .

50 Entre las técnicas que realizan varias separaciones sucesivas, los modos SRM (Selected Reaction Monitoring) en caso de detección o cuantificación de una sola molécula objetivo, o bien MRM (Multiple Reaction Monitoring) en caso de detección o cuantificación de varias moléculas objetivos, son utilizaciones particulares de separación MS². Igualmente el modo MRM³ es una utilización particular de separación en MS/MS/MS. Se habla entonces de espectrometría de masas dirigida.

En el caso de una detección en modo MS simple, es la relación masa/carga de los iones moleculares obtenidos la que está correlacionada con la molécula objetivo a detectar.

En el caso de una detección en modo MS/MS, esencialmente se añaden dos etapas, con respecto a una cuantificación MS que son:

- 5 i) una fragmentación de los iones moleculares, entonces llamados iones precursores, para dar iones denominados iones fragmentos de primera generación, y
- ii) una separación de los iones denominados iones fragmentos de primera generación en función de su masa (m/z)₂, y la relación (m/z)₁ que corresponde a la relación (m/z) de los iones precursores.

10 Es entonces la relación masa/carga de los iones fragmentos de primera generación así obtenidos la que está correlacionada con la molécula objetivo a detectar. Por ion fragmento de primera generación, se entiende un ion procedente del ion precursor, como consecuencia de una etapa de fragmentación y cuya relación de masa sobre carga m/z es diferente del ion precursor.

Los pares (m/z)₁ y (m/z)₂ se denominan transiciones y son representativas de los iones característicos a detectar.

15 La elección de los iones característicos que son detectados para ser correlacionados con la molécula objetivo es efectuada por los expertos en la técnica según los métodos estándar. Su selección llevará ventajosamente a las cuantificaciones más sensibles, más específicas y más robustas posibles, en términos de reproducibilidad y fiabilidad. En los métodos desarrollados para la selección de péptidos proteotípicos (m/z)₁, y de fragmento de primera generación (m/z)₂, la elección se basa esencialmente en la intensidad de la respuesta. Para más detalles, se puede referir a V. Fusaro et al. [4]. Los softwares comerciales, tales como los softwares MIDAS y MRM Pilote d'Applied Biosystems o también MRMAid [5] pueden ser utilizados por los expertos en la técnica para permitirles predecir todos los pares de transiciones posibles. Se podrá recurrir igualmente a una base de datos denominada PeptideAtlas, construida por F. Desiere et al. [6] para compilar el conjunto de las transiciones MRM de péptidos descritos por la comunidad científica. Esta base PeptideAtlas está disponible en acceso libre en internet.

25 Una estrategia alternativa para seleccionar los péptidos proteotípicos (obtenidos por ejemplo por digestión trípica; véase *supra*), (m/z)₁ y (m/z)₂, consiste en utilizar los espectros de fragmentación MS/MS obtenidos con ocasión de otros trabajos. Estos trabajos pueden ser, por ejemplo, las fases de descubrimiento y de identificación de los biomarcadores por análisis proteómico. Esta estrategia ha sido propuesta por Thermo Scientific durante la reunión de utilizadores [5]. Ella permite generar una lista de transiciones candidatas a partir de los péptidos identificados experimentalmente por el software SIEVE (Thermo Scientific). Ciertos criterios han sido detallados por J. Mead et al. [5] para la elección de los iones (m/z)₁ y (m/z)₂ y se detallan a continuación:

- Los péptidos con sitios de escisión interna, es decir con lisina o arginina interna, deben ser evitados, salvo si la lisina o la arginina va seguida por la prolina,
- Los péptidos con asparagina o glutamina deben ser evitados porque se pueden desaminar,
- Los péptidos con glutamina o ácido glutámico en N-terminal deben ser evitados porque se pueden ciclar espontáneamente,
- Los péptidos con metionina deben ser evitados porque pueden ser oxidados,
- Los péptidos con cisteína deben ser evitados porque pueden ser modificados de forma no reproducible durante una eventual etapa de desnaturalización, reducción y bloqueo de las funciones tioles,
- Los péptidos con prolina pueden ser considerados como favorables porque producen generalmente fragmentos intensos en MS/MS con un solo pico muy mayoritario. Sin embargo, un solo fragmento muy mayoritario no permite validar la identidad de la transición en una mezcla compleja. En efecto, solo la presencia simultánea de varios fragmentos característicos permite verificar que el ion precursor buscado es bien detectado,
- Los péptidos que tienen una prolina adyacente al C-terminal (posición n-1) o en segunda posición con respecto al C-terminal (posición n-2) se deben evitar porque, en este caso, el tamaño del fragmento del péptido de primera generación es generalmente considerado como demasiado pequeño para ser suficientemente específico,
- La selección de fragmentos que tienen una masa superior al precursor es preferible para favorecer la especificidad. Para esto, es preciso seleccionar un ion precursor descargado y seleccionar el ion fragmento de primera generación más intenso que tiene una masa superior al precursor, es decir un ion fragmento de primera generación monocargado.

La fragmentación de los iones precursores seleccionados se realiza en una célula de fragmentación tal como los modelos de tipo triple cuadrupolo [19], o de tipo trampa iónica [20], o incluso de tipo tiempo de vuelo (TOF) [21], los

- cuales permiten igualmente la separación de los iones. La fragmentación o fragmentaciones serán realizadas clásicamente por colisión con un gas inerte tal como el argón o el nitrógeno, en el seno de un campo eléctrico, por foto-excitación o fotodisociación con ayuda de una fuente luminosa intensa, colisión con electrones o especies radicalarias, por aplicación de una diferencia de potencial, por ejemplo en un tubo de tiempo de vuelo, o por cualquier otro modo de activación. Las características del campo eléctrico condicionan la intensidad y la naturaleza de la fragmentación. Así, el campo eléctrico aplicado en presencia de un gas inerte, por ejemplo en un cuadrupolo, condiciona la energía de colisión aportada a los iones. Esta energía de colisión será optimizada, por los expertos en la técnica, para aumentar la sensibilidad de la transición a cuantificar. A título de ejemplo, es posible hacer variar la energía de colisión entre 5 y 180 e-V en q2 en un espectrómetro de masas AB SCIEX QTRAP® 5500 de la compañía Applied Biosystems (Foster City, Estados Unidos). Igualmente, la duración de la etapa de colisión y la energía de excitación en el seno, por ejemplo, de una trampa iónica serán optimizadas por los expertos en la técnica, para llevar a la cuantificación más sensible. A título de ejemplo, es posible hacer variar esta duración, denominada tiempo de excitación, entre 0,010 y 50 ms y la energía de excitación entre 0 y 1 (unidad arbitraria) en Q3 en un espectrómetro de masas AB SCIEX QTRAP® 5500 de la compañía Applied Biosystems.
- Finalmente, la detección de los iones característicos seleccionados se hace de forma clásica, especialmente gracias a un detector y a un sistema de tratamiento. El detector recoge los iones y produce una señal eléctrica cuya intensidad depende de la cantidad de iones recogida. La señal obtenida se amplifica a continuación para que pueda ser tratada informáticamente. Un conjunto informático de tratamiento de los datos permite transformar las informaciones recibidas por el detector en espectro de masas.
- El principio del modo SRM, o incluso del modo MRM, es seleccionar específicamente un ion precursor, fragmentarlo, y después seleccionar específicamente uno de sus iones fragmentos. Para tales aplicaciones, se utilizan generalmente dispositivos del tipo triple cuadrupolo o híbridos de triple cuadrupolo con trampa iónica.
- En el caso de un dispositivo triple cuadrupolo (Q1q2Q3) utilizado en modo MS², con vistas a la cuantificación o detección de una proteína objetivo, el primer cuadrupolo (Q1) permite filtrar los iones moleculares, que corresponden a los péptidos proteotípicos característicos de la proteína a cuantificar y obtenidos durante una etapa anterior de digestión, en función de su relación de masa sobre carga (m/z). Solo los péptidos que tienen la relación de masa/carga del péptido proteotípico buscado, relación denominada (m/z)₁, son transmitidos en el segundo cuadrupolo (q2) y desempeñan el papel de iones precursores para la fragmentación posterior. El analizador q2 permite fragmentar los péptidos de relación masa/carga (m/z)₁ en iones fragmentos de primera generación. La fragmentación se obtiene generalmente por colisión de los péptidos precursores con un gas inerte, tal como nitrógeno o argón en q2. Los iones fragmentos de primera generación son transmitidos en un tercer cuadrupolo (Q3) que filtra los iones fragmentos de primera generación en función de una relación masa sobre carga específica, relación denominada (m/z)₂.
- Solo los iones fragmentos de primera generación que tienen la relación masa/carga de un fragmento característico del péptido proteotípico buscado (m/z)₂ son transmitidos en el detector para ser detectados, e incluso cuantificados.
- Este modo de funcionamiento presenta una doble selectividad, en relación con la selección del ion precursor de una parte y de la selección del ion fragmento de primera generación de otra parte. La espectrometría de masas en modo SRM o MRM es por tanto ventajosa para la cuantificación.
- Cuando la espectrometría de masas llevada a cabo en el procedimiento de la invención es una espectrometría de masas en tándem (MS², MS³, MS⁴ o MS⁵), varios analizadores de masas pueden estar acoplados entre sí. Por ejemplo, un primer analizador separa los iones, una célula de colisión permite fragmentar los iones, y un segundo analizador separa los iones fragmentos. Ciertos analizadores, tales como las trampas de iones o la FT-ICR, constituyen varios analizadores en uno y permiten fragmentar los iones y analizar los fragmentos directamente.
- Según modos de realización preferidos de la invención, el procedimiento de la invención comprende una o varias de las siguientes características:
- la espectrometría de masas, realizada para las propiedades de tipificación, de resistencia potencial a por lo menos un antimicrobiano y de factor de virulencia, es una espectrometría de tipo MS/MS, lo que tiene por ventaja generar un fragmento específico de la molécula a detectar o a cuantificar, y así aportar una gran especificidad al método de cuantificación;
 - la espectrometría MS/MS es en modo MRM, lo que tiene por ventaja utilizar un tiempo de ciclo de análisis en el espectrómetro de masas de algunas decenas de milisegundos, lo que permite detectar o cuantificar con una gran sensibilidad, y de forma multiplexada, un gran número de moléculas diferentes;
 - la determinación de las propiedades de tipificación, resistencia a un antimicrobiano y factor de virulencia se realiza en el mismo equipo de espectrometría de masas, con preferencia simultáneamente, lo que tiene por ventaja reducir el tiempo de análisis y el coste del instrumento, lo que facilita igualmente el tratamiento y el rendimiento de los resultados.
- Además de la determinación de las propiedades de tipificación, resistencia a un antimicrobiano y factor de virulencia,

conviene identificar el microorganismo o microorganismos presentes en la muestra a ensayar.

Los procedimientos de identificación de microorganismos son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica, como está descrito por ejemplo por Murray P. R. et al. en *Manuel of Clinical Microbiology*, 2007, 9th edition, y en particular en el Vol. I, Sección III, capítulos 15 y 16 para las bacterias y levaduras, Vol. II, Sección VI, capítulo 82 para los virus, y Vol. II, Sección X, capítulo 135 para los protozoos. A título de ejemplo de procedimientos clásicos de identificación, se puede citar la determinación del perfil biológico, utilizando por ejemplo las cartas de identificación de Vitek 2 (bioMérieux), o incluso mejor utilizando técnicas de biología molecular con criterios de identificación basados en el estudio de la presencia de ciertos genes, en el estudio de su secuencia.

La identificación se puede llevar a cabo directamente a partir de la muestra en la que se efectúa la identificación, o bien los microorganismos contenidos en la muestra pueden ser cultivados por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica con medios de cultivo y condiciones de cultivo óptimas adaptadas en función de las especies de microorganismos a investigar, como está descrito por Murray P.R. et al. en *Manuel of Clinical Microbiology*, 2007, 9th edition, Vol. I, Sección III, capítulo 14, y en particular en el Vol. I, Sección IV, capítulo 21 para las bacterias, Vol. II, Sección VI, capítulo 81 para los virus, Vol. II, Sección VIII, capítulo 117 para las levaduras, y Vol. II, Sección X, capítulo 134 para los protozoos.

Así, de forma general, en el caso de una identificación por un método bioquímico de una bacteria en una muestra, es preciso obtenerla primero en cultivo puro, por ejemplo después de siembra sobre agar. La biología molecular (PCR) se puede aplicar en ciertos casos directamente a la muestra a analizar.

En lugar de cultivar los microorganismos, estos últimos pueden ser concentrados por captura directamente en la muestra por medio de superficies activas. Dicho procedimiento ha sido descrito por W.-J. Chen et al. [1] que han capturado diferentes especies bacterianas con ayuda de bolas magnéticas con una superficie activada con $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$. Es igualmente posible una captura por otros medios, tal como una captura por lectinas [22], o por anticuerpos [23], o incluso por la vancomicina [24]. La captura permite concentrar los microorganismos y reducir así o incluso suprimir la etapa de cultivo. Se consigue un ahorro de tiempo considerable.

La identificación se puede realizar igualmente por espectrometría de masas, según las técnicas descritas precedentemente, con preferencia por MS, por MS/MS, o bien por MS seguido de una espectrometría de tipo MS/MS, lo que constituye un modo de realización de la invención. En este caso igualmente, la muestra puede ser sometida previamente a una etapa de cultivo tal como una siembra sobre agar.

La utilización de un procedimiento de identificación por MS es ventajosa porque se puede realizar en unos minutos y porque necesita un espectrómetro de masas con un solo analizador, es decir un instrumento menos complejo que un espectrómetro de masas en tándem utilizado en MS/MS.

La utilización de un procedimiento de identificación por MS seguido de una espectrometría de tipo MS/MS es igualmente ventajosa. Ella permite asegurar la identidad de los iones observados en MS, lo que aumenta la especificidad del análisis.

La utilización de un procedimiento de identificación por MS/MS de tipo MRM presenta la ventaja de ser más sensible y más simple que los métodos de MS y después MS/MS tradicionales. Este procedimiento no necesita ni software eficiente para tratar la información entre la adquisición del espectro MS y del espectro MS/MS, ni cambio del ajuste de los parámetros de las máquinas para encadenar los espectros MS y después MS/MS.

El procedimiento de identificación por MS se puede llevar a cabo con una fuente de electropulverización sobre la muestra bruta, como está descrito por S. Vaidyanathan et al. [7] o también por R. Everley et al. [8] después de separación cromatográfica. Diferentes intervalos de m/z permiten entonces identificar los microorganismos. S. Vaidyanathan et al. han utilizado una ventana entre 200 y 2000 Th y R. Everley et al. una ventana entre 620 y 2450 Th. Los espectros de masas pueden ser igualmente deconvolucionados para acceder a la masa de las proteínas independientemente de su estado de carga. R. Everley et al. han aprovechado así las masas entre aproximadamente 5.000 y 50.000 Da. De forma alternativa, el procedimiento de identificación por MS puede ser llevado a cabo igualmente con la ayuda de un MALDI-TOF, como está descrito por Claydon et al [9] y T. Krishnamurthy y P. Ross [10]. El análisis asocia la adquisición de un espectro de masas y la interpretación de un software experto. Es extremadamente simple y se puede efectuar en unos minutos. Este procedimiento de identificación se prodiga actualmente en los laboratorios de análisis médico [25].

La identificación de bacterias por MS y después MS/MS a través de sus proteínas presentes en la muestra, ha sido largamente aplicada por numerosos equipos. A título de ejemplo, es posible citar los trabajos recientes de Manes N. et al. [11] que han estudiado el peptidoma de *Salmonelle enterica*, o los trabajos de R. Nandakumar et al. [12] o de L. Hernychova et al. [13] que han estudiado el proteoma de bacterias después de digestión de las proteínas con la tripsina. La estrategia clásica consiste en i) adquirir un espectro MS, ii) seleccionar sucesivamente cada ion precursor observado sobre el espectro MS con una señal intensa, iii) fragmentar sucesivamente cada ion precursor y adquirir su espectro MS/MS, iv) consultar las bases de datos proteicos tales como SWISS-PROT o NCBI, a través de los software tales como Mascot (Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) o SEQUEST (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), para identificar el péptido que tiene una fuerte probabilidad de corresponder al espectro MS/MS

observado. Este método puede llevar a la identificación de un microorganismo si se identifica una proteína o un péptido característico de la especie.

Según otro modo más de realización, la identificación de dicho al menos un microorganismo se lleva a cabo por un procedimiento clásico de identificación y el procedimiento de la invención comprende una etapa suplementaria de confirmación de la identificación de dicho al menos un microorganismo, cuya etapa de confirmación se lleva a cabo por espectrometría de masas, según las técnicas descritas precedentemente para la identificación de microorganismos.

Según un modo de realización particular, la espectrometría de masas de la etapa de confirmación es una espectrometría de masas de tipo MS/MS, con preferencia una MRM.

Una de las ventajas de la utilización de la espectrometría de masas reside en que es particularmente útil para cuantificar las moléculas, en el presente caso los marcadores de las propiedades de tipificación, resistencia por lo menos a un antimicrobiano. Para hacer esto, se utiliza la intensidad de corriente detectada, la cual es proporcional a la cantidad de molécula objetivo. La intensidad de corriente así medida podrá servir de medida cuantitativa que permite determinar la cantidad de molécula objetivo presente, la cual se caracteriza por su expresión en unidades del Sistema Internacional (SI) de tipo mol/m³ o kg/m³, o por los múltiplos o sub-múltiplos de estas unidades, o por los derivados usuales de las unidades SI, comprendidos sus múltiplos o sub-múltiplos. A título de ejemplo no limitativo, las unidades tales como ng/ml o fmol/l son unidades que caracterizan una medida cuantitativa.

Sin embargo es necesaria una calibración para poder correlacionar el área del pico medida, que corresponde a la intensidad de corriente inducida por los iones detectados, con la cantidad de molécula objetivo a cuantificar. Para esto, las calibraciones utilizadas clásicamente en espectrometría de masas podrán llevarse a cabo, en el marco de la invención. Las cuantificaciones por MRM se calibran clásicamente con ayuda de estándares externos o, con preferencia, con ayuda de estándares internos tales como los descritos por T. Fortin et al. [2]. En el caso en que la molécula objetivo es un péptido proteotípico, que permite cuantificar una proteína de interés, la correlación entre la medida cuantitativa y la cantidad de péptido proteotípico objetivo, y posteriormente la proteína de interés, se obtiene calibrando la señal medida con respecto a una señal patrón para la cual la cantidad a cuantificar es conocida. La calibración se puede realizar por medio de una curva de calibración, por ejemplo obtenida por inyecciones sucesivas de péptido proteotípico patrón a diferentes concentraciones (calibración externa), o de forma preferida, por calibración interna utilizando un péptido pesado, como estándar interno, por ejemplo conforme a los métodos AQUA, QconCAT o PSAQ detallados más adelante. Por « péptido pesado », se entiende un péptido que corresponde al péptido proteotípico, pero en el cual uno o varios átomos de carbono 12 (¹²C) están reemplazados por carbono 13 (¹³C), y/o uno o varios átomos de nitrógeno 14 (¹⁴N) están reemplazados por nitrógeno 15 (¹⁵N).

La utilización de péptidos pesados, como estándares internos (AQUA), ha sido propuesta igualmente en la solicitud de patente US 2004/0229283. El principio es sintetizar artificialmente los péptidos proteotípicos con aminoácidos que constan de isótopos más pesados que los isótopos naturales usuales. Tales aminoácidos se obtienen, por ejemplo, reemplazando ciertos átomos de carbono 12 (¹²C) por carbono 13 (¹³C), o reemplazando ciertos átomos de nitrógeno 14 (¹⁴N) por nitrógeno 15 (¹⁵N). El péptido artificial (AQUA) así sintetizado tiene rigurosamente las mismas propiedades fisicoquímicas que el péptido natural (con la excepción de una masa más elevada). Generalmente se añade, a una concentración dada, a la muestra, antes de la cuantificación por espectroscopía de masas, por ejemplo entre el tratamiento que causa la escisión de las proteínas de la muestra de interés y el fraccionamiento de los péptidos obtenidos después de la etapa de tratamiento. De este modo, el péptido AQUA es co-purificado con el péptido natural a cuantificar, durante el fraccionamiento de los péptidos. Los dos péptidos son por tanto inyectados simultáneamente en el espectrómetro de masas, para la cuantificación. Sufren entonces los mismos rendimientos de ionización en la fuente. La comparación de las áreas de los picos de los péptidos naturales y AQUA, cuya concentración es conocida, permite calcular la concentración del péptido natural y llegar así a la concentración de la proteína a cuantificar. Una variante de la técnica AQUA ha sido propuesta por J.-M. Pratt et al. [14] bajo el nombre de QconCat. Esta variante está igualmente descrita en la solicitud de patente WO 2006/128492. Ella consiste en concatenar diferentes péptidos AQUA y en producir el polipéptido artificial bajo la forma de proteína recombinante pesada. La proteína recombinante es sintetizada con aminoácidos que constan de isótopos pesados. De esta forma, es posible obtener un estándar para calibrar la cuantificación simultánea de varias proteínas a menor coste. El estándar QconCAT se añade desde el principio, antes del tratamiento que causa la escisión de las proteínas y antes de las etapas de fraccionamiento de las proteínas, de desnaturalización, de reducción y después de bloqueo de las funciones tioles de las proteínas, si éstas están presentes. El estándar QconCAT sufre pues el mismo ciclo de tratamiento que causa la escisión de las proteínas que la proteína natural, lo que permite tener en cuenta la eficiencia de la etapa de tratamiento que causa la escisión de las proteínas. En efecto, el tratamiento, especialmente por digestión, de la proteína natural puede no ser completo. En este caso la utilización de un estándar AQUA llevará a subestimar la cantidad de proteína natural. Para una cuantificación absoluta, puede ser importante tener en cuenta rendimientos de tratamiento que causan la escisión de las proteínas. Sin embargo, V. Brun et al. [15] han demostrado que, a veces, los estándares QconCAT no reproducían exactamente la eficiencia de tratamiento especialmente por digestión de la proteína natural, sin duda debido al hecho de una conformación tridimensional diferente de la proteína QconCAT.

V. Brun et al. [15] han propuesto entonces utilizar un método denominado PSAQ y descrito en la solicitud de patente

WO 2008/145763. En este caso, el estándar interno es una proteína recombinante, que tiene la misma secuencia que la proteína natural pero sintetizada con aminoácidos pesados. La síntesis se realiza *ex-vivo* con aminoácidos pesados. Este estándar tiene rigurosamente las mismas propiedades fisicoquímicas que la proteína natural (con la excepción de una masa más elevada). Se añade desde el principio, antes de la etapa de fraccionamiento de las proteínas, cuando esta última está presente. Es así co-purificada con la proteína nativa, durante la etapa de fraccionamiento de las proteínas. Presenta la misma eficiencia de tratamiento, especialmente por digestión, que la proteína nativa. El péptido pesado obtenido después de la escisión es igualmente co-purificado con el péptido natural, si se realiza una etapa de fraccionamiento de los péptidos. Los dos péptidos son por tanto inyectados simultáneamente en el espectrómetro de masas, para ser determinados cuantitativamente. Sufren entonces los mismos rendimientos de ionización en la fuente. La comparación de las áreas de los picos de los péptidos naturales y de los péptidos de referencia en el método PSAQ permite calcular la concentración de la proteína a cuantificar teniendo en cuenta la totalidad de las etapas del procedimiento de cuantificación.

El conjunto de estas técnicas, a saber AQUA, QconCAT o PSAQ o cualquier otra técnica de calibración, utilizada en las cuantificaciones por espectrometría de masas y en particular en las cuantificaciones por MRM o MS, pueden ser realizadas para efectuar la calibración.

Referencias bibliográficas

- [1] W.-J. Chen et al., 2008, Anal. Chem., 80: 9612-9621
- [2] T. Fortin et al., 2009, Mol. Cell Proteomics, 8(5): 1006-1015.
- [3] H. Keshishian et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2212-2229.
- [4] V. Fusaro et al., 2009, Nature Biotech. 27, 190-198.
- [5] J. Mead et al., 15 nov 2008, Mol. Cell Proteomics, E-pub.
- [6] F. Desiere et al., 2006, Nucleic Acids Res., 34(database issue): D655-8).
- [7] S. Vaidyanathan et al., 2001, Anal. Chem., 73:4134-4144.
- [8] R. Everley et al., 2009, J. Microbiol. Methods, 77:152-158.
- [9] M. Claydon et al, 1996, Nature Biotech. 14:1584-1586.
- [10] T. Krishnamurthy & P. Ross, 1996, Rapid Com. Mass Spec., 10:1992-1996.
- [11] Manes N. et al., 2007, Mol. & Cell. Proteomics, 6(4): 717-727.
- [12] R. Nandakumar et al., 2009, Oral Microbiology Immunology, 24:347-352).
- [13] L. Hernychova et al., 2008, Anal. Chem., 80:7097-7104.
- [14] J.-M. Pratt et al., 2006, Nat. Protoc., 1:1029-1043.
- [15] V. Brun et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2139-2149.
- [16] D. Lopez-Ferrer et al., 2008, Anal. Chem., 80:8930-8936
- [17] D. Lopez-Ferrer et al., 2005, J. Proteome res., 4(5): 1569-1574
- [18] Gaskell, Electrospray: principles and practise, 1997, J. Mass Spectrom., 32, 677-688).
- [19] L. Anderson & C. Hunter, 2006, Mol. Cell Proteomics, 573-588).
- [20] B. Han & R. Higgs, 2008, Brief Funct Genomic Proteomic., 7(5):340-54).
- [21] K.-Y. Wang et al., 2008, Anal Chem, 80(16) 6159-6167).
- [22] J. Bundy & C. Fenselau, 1999, Anal. Chem. 71: 1460-1463.
- [23] K-C Ho et al., 2004, Anal. Chem. 76: 7162-7268.
- [24] Y.S. Lin et al., 2005, Anal. Chem., 77: 1753-1760.
- [25] P. Seng et al., 2009, Clin. Infect. Dis., 49:543-551.
- [26] Santos H. M. et al.: «An improved clean sonoreactor-based method for protein identification by mass spectrometry-based techniques», TALANTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL (2008). Vol. 77, no. 2, pages 870-875.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de péptidos a partir de células procariotas y/o eucariotas, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
 - a) lisis de las células procariotas y/o eucariotas y recuperación de las proteínas así obtenidas,
 - 5 b) desnaturalización de dichas proteínas utilizando al menos un agente desnaturalizante,
 - c) alquilación de las proteínas desnaturalizadas utilizando al menos un agente alquilante,
 - d) proteólisis enzimática de las proteínas obtenidas al final de la etapa c) utilizando al menos una enzima proteolítica,
 - e) recuperación de los péptidos obtenidos al final de la etapa de proteólisis enzimática d),
- 10 en el cual la lisis de las células procariotas y/o eucariotas en la etapa a) es una lisis con débil concentración de agente o agentes caotrópicos,
- y en el cual al menos las etapas a) y b) se llevan a cabo conjuntamente;
- siendo realizada dicha lisis con débil concentración de agente o agentes caotrópicos, a una concentración en agente o agentes caotrópicos inferior o igual a 1 M, con preferencia inferior o igual a 100 mM, y
- 15 llevando a cabo dicho procedimiento bajo una presión inferior a 100 bares, con preferencia inferior a 50 bares, ventajosamente inferior a 10 bares.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos se realiza en ausencia de agente o agentes caotrópicos no salinos tales como la urea.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el cual la lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos es una lisis por sonicación efectuada por medio de una sonda de ultrasonidos.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el cual dicha sonda de ultrasonidos no sufre la etapa de precalentamiento previo a la lisis por sonicación.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la enzima proteolítica es una proteasa de serina, preferiblemente seleccionada en el grupo que consiste en la tripsina, la quimotripsina y la elastasa, ventajosamente dicha enzima proteolítica es la tripsina.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el agente desnaturalizante es un agente reductor de tioles, con preferencia seleccionado entre el 2-mercaptoetanol, la tris(2-carboxietil)fosfina, el ditioeritritol, la tributilfosfina y el ditiotretol, ventajosamente dicho agente reductor de tioles es la tris(2-carboxietil)fosfina o el ditiotretol.
- 30 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual el agente alquilante se selecciona en el grupo constituido por la N-etilmaleimida, la yodoacetamida y la M-biotina, preferiblemente dicho agente alquilante es la yodoacetamida.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la duración mínima que corresponde a la etapa de proteólisis d) es de aproximadamente 15 minutos.
- 35 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual al menos las etapas a) - c) se efectúan conjuntamente.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual las etapas a) - d) se efectúan conjuntamente.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, en el cual:
 - el agente desnaturalizante es un agente reductor de tioles seleccionado entre la tris(2-carboxietil)fosfina y el ditiotretol, siendo ventajosamente dicho agente reductor de tioles la tris(2-carboxietil)fosfina, y
 - el agente alquilante es la yodoacetamida.
- 40 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, siendo llevado a cabo dicho procedimiento a presión atmosférica.
13. Procedimiento de análisis de péptidos de células procariotas y/o eucariotas que comprende las siguientes etapas:
- 45

i) Obtención de los péptidos a partir de dichas células procariotas y/o eucariotas utilizando el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12,

ii) Análisis de los péptidos así obtenidos, siendo efectuado dicho análisis con ayuda de un medio de análisis de tipo espectrometría de masas.

- 5 **14.** Kit de obtención de péptidos a partir de células procariotas y/o eucariotas, siendo dicho kit específicamente adecuado para llevar a cabo el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho kit:
- 10 - un neceser de lisis que permite efectuar dicha lisis con débil concentración en agente o agentes caotrópicos de las células procariotas y/o eucariotas, con preferencia un neceser de lisis por sonicación, permitiendo además dicho neceser de lisis efectuar la lisis bajo una presión inferior a 100 bares, con preferencia inferior a 50 bares, ventajosamente inferior a 10 bares, y de manera particularmente preferida bajo presión atmosférica,
- 15 - una primera solución que comprende al menos un agente desnaturalizante, con preferencia seleccionado entre el 2-mercaptoetanol, la tris(2-carboxietil)fosfina, el ditioneol, la tributilfosfina y el ditioneol, ventajosamente dicho agente desnaturalizante es la tris(2-carboxietil)fosfina o el ditioneol,
- 15 - una segunda solución que comprende al menos un agente alquilante, con preferencia seleccionado en el grupo constituido por la N-etilmaleimida, la yodoacetamida y la M-biotina, preferiblemente dicho agente alquilante es la yodoacetamida,
- 20 - una tercera solución que comprende al menos una enzima proteolítica tal como una proteasa de serina, preferiblemente seleccionada en el grupo que consiste en la tripsina, la quimotripsina y la elastasa, ventajosamente dicha enzima proteolítica es la tripsina.
- 20 **15.** Utilización del kit según la reivindicación 14, para la realización del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13.

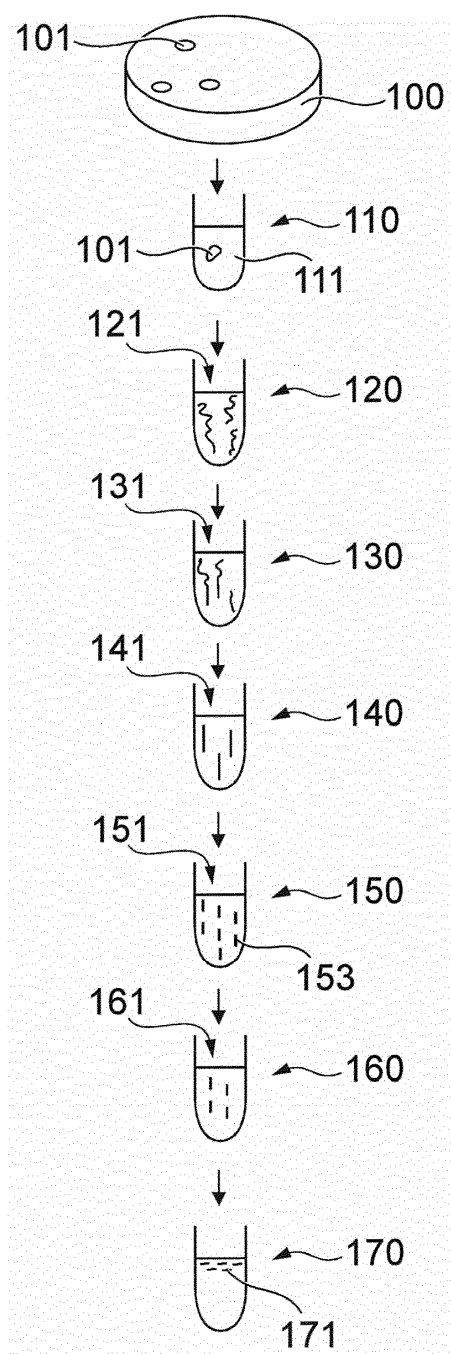
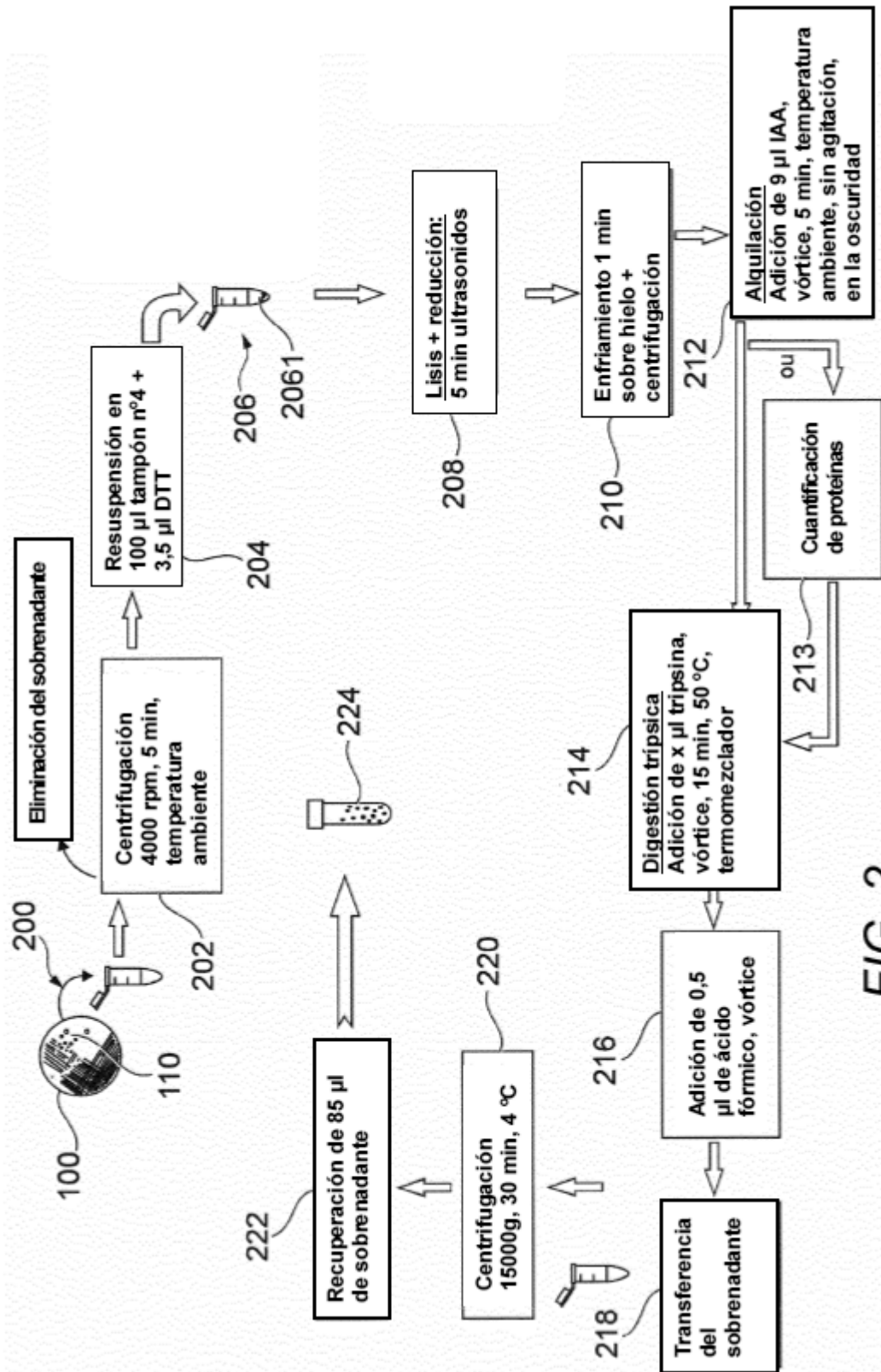


FIG. 1



C BSA(mg/ml)	DO(595nm)
0	0,290
0,1	0,321
0,2	0,358
0,3	0,400
0,4	0,436
0,6	0,495
0,8	0,575
1,0	0,650

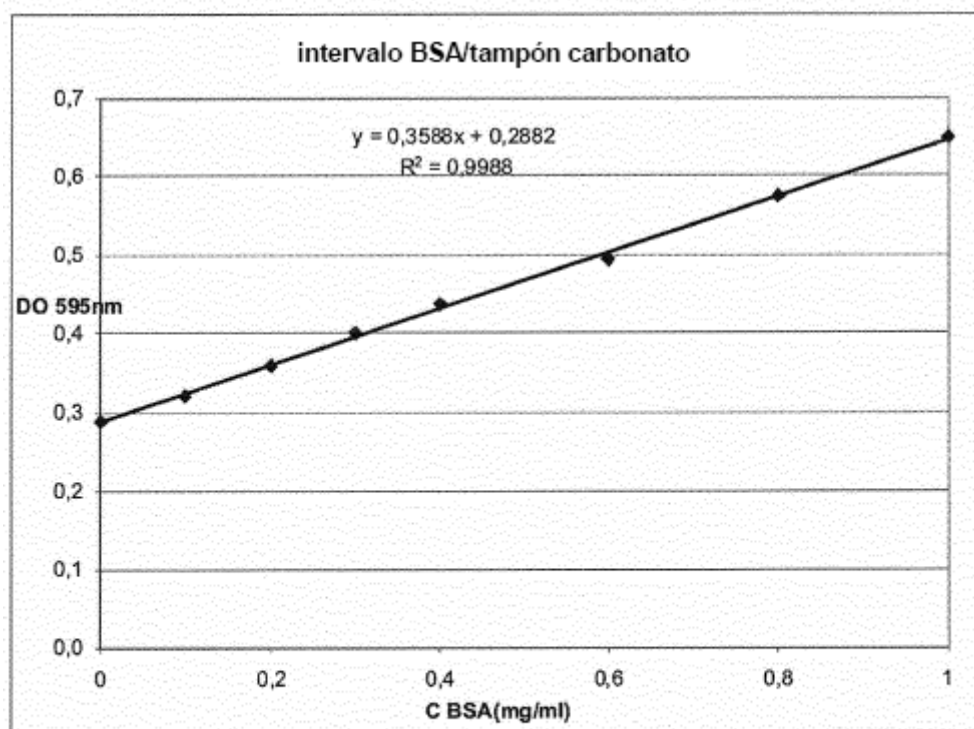


FIG. 3

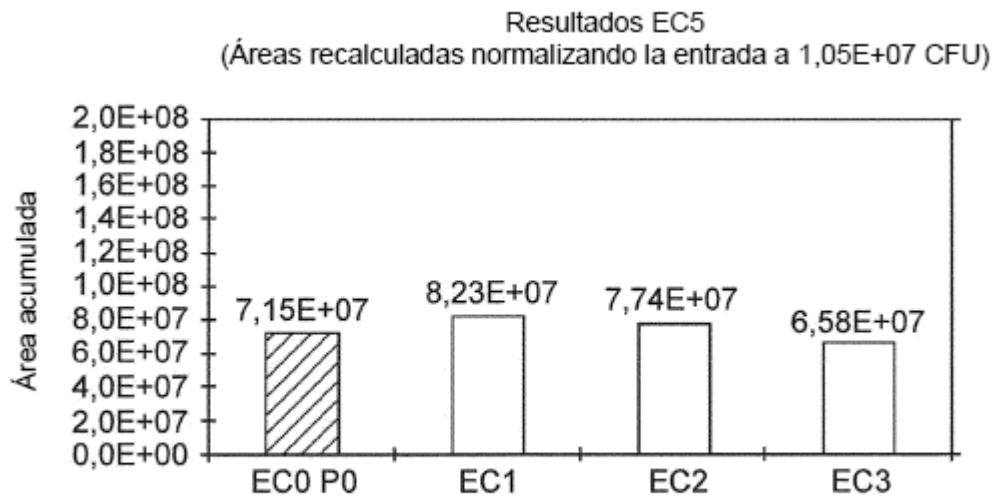
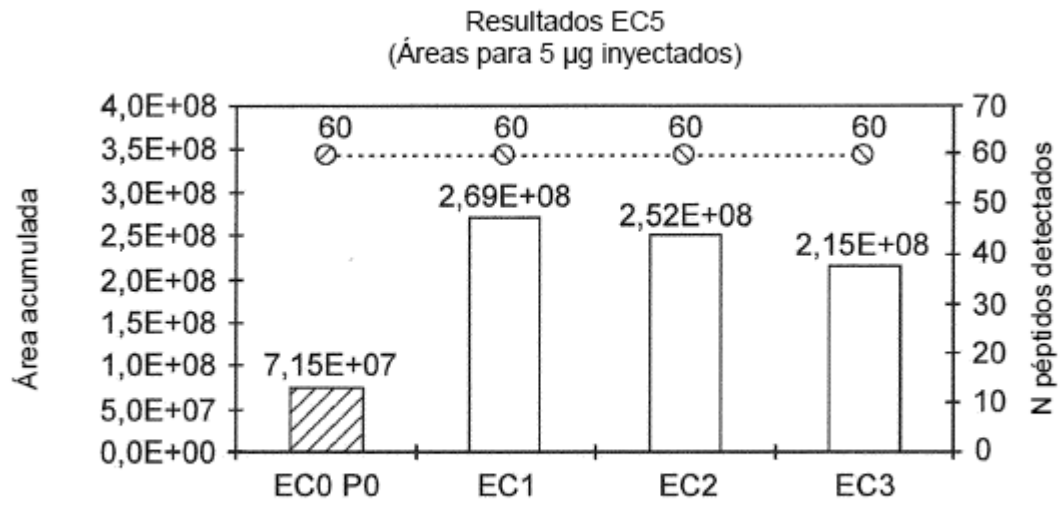


FIG. 4

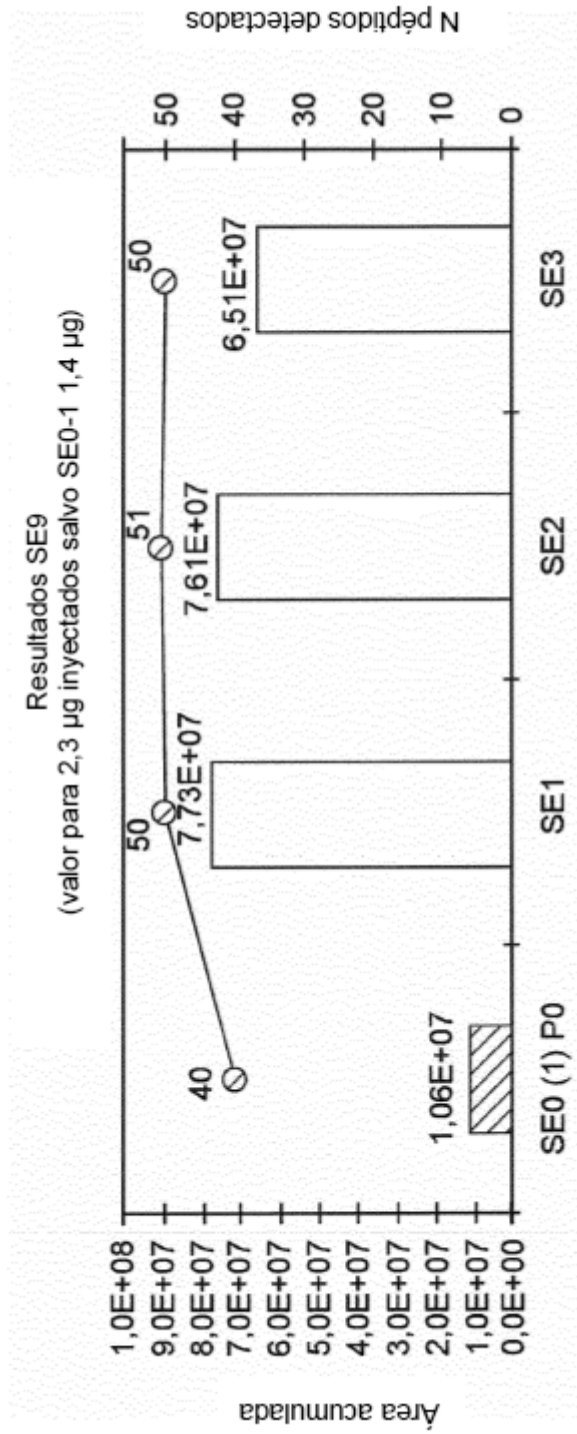


FIG. 5

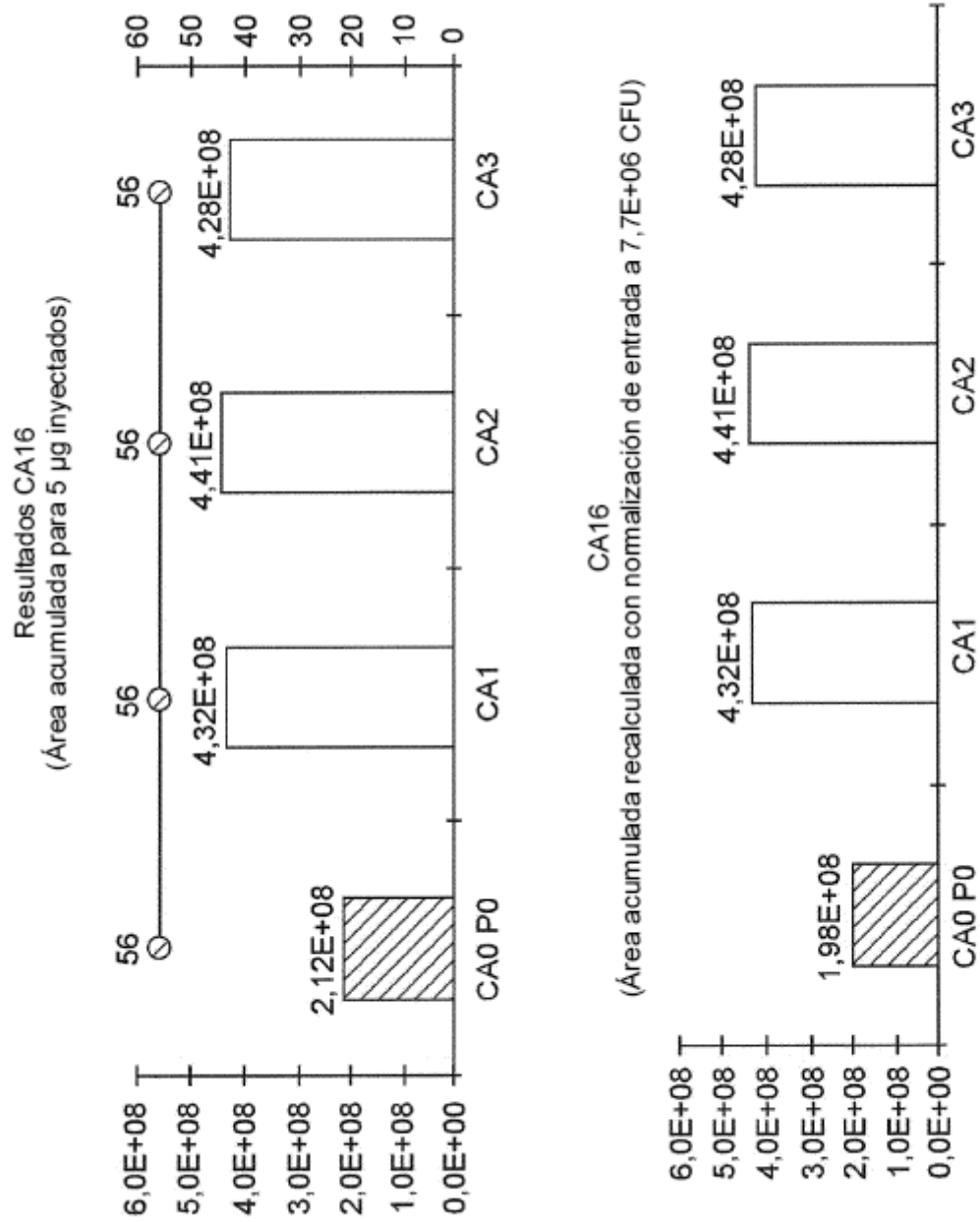


FIG. 6

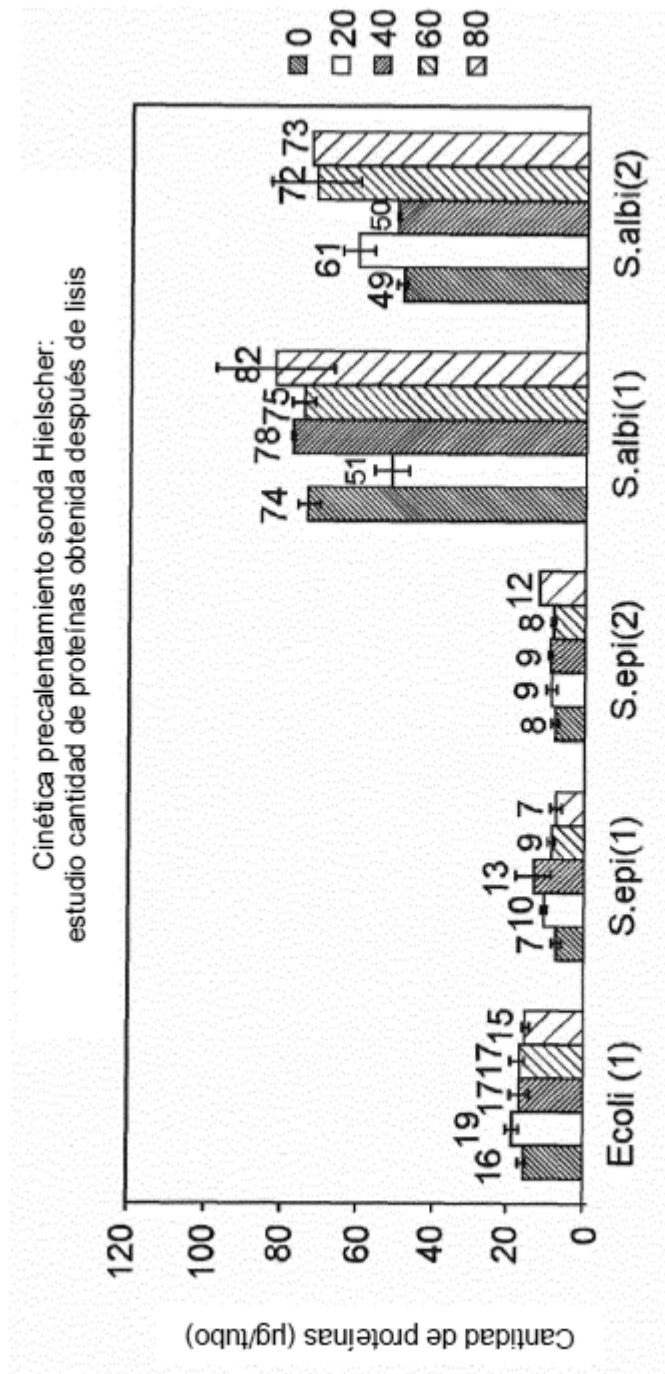
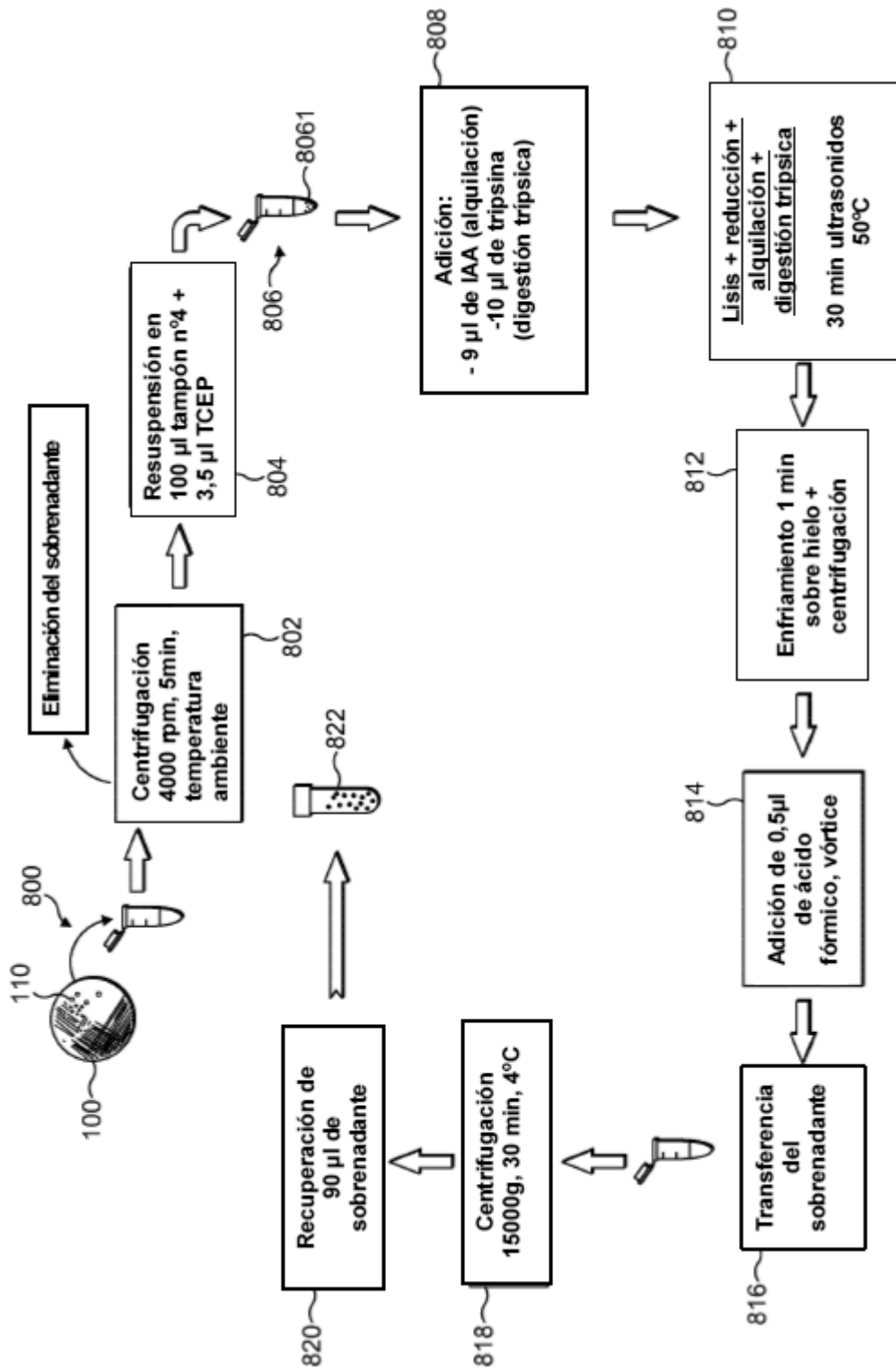


FIG. 7



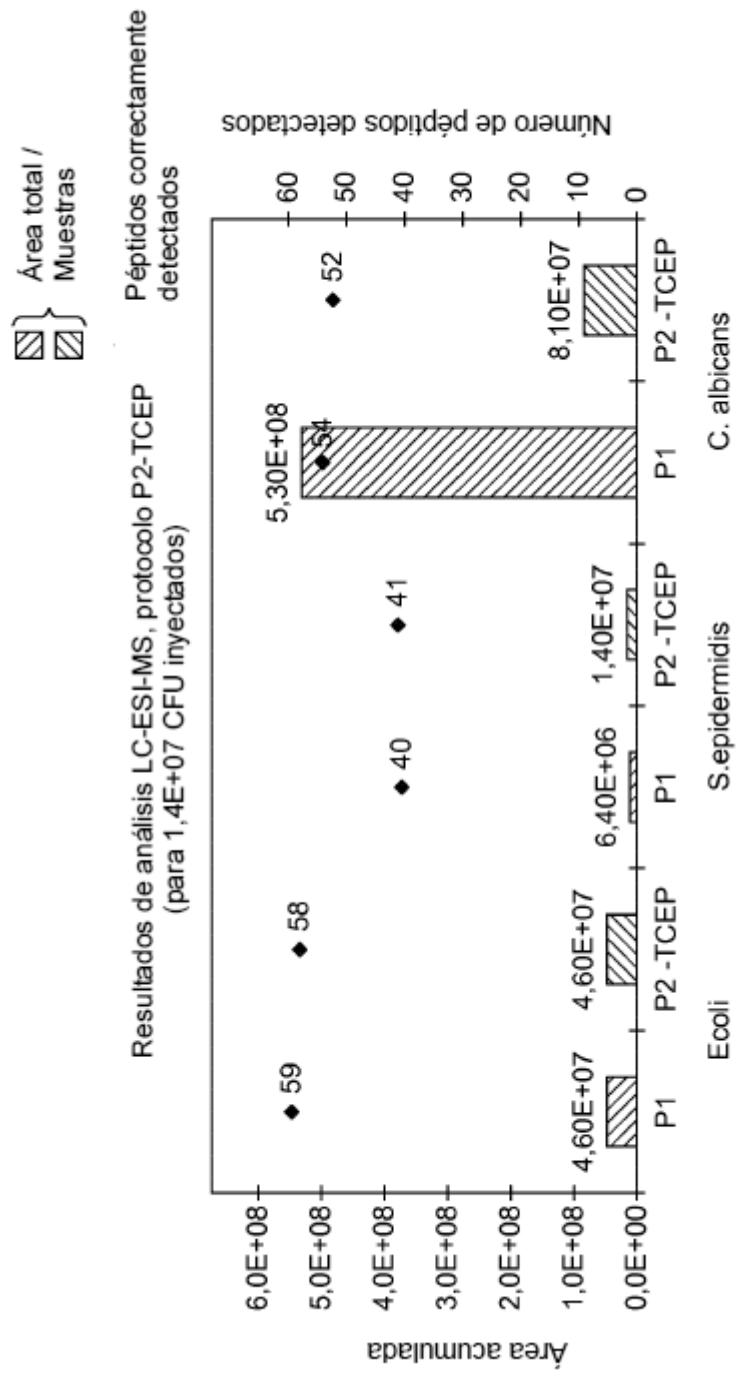


FIG. 9

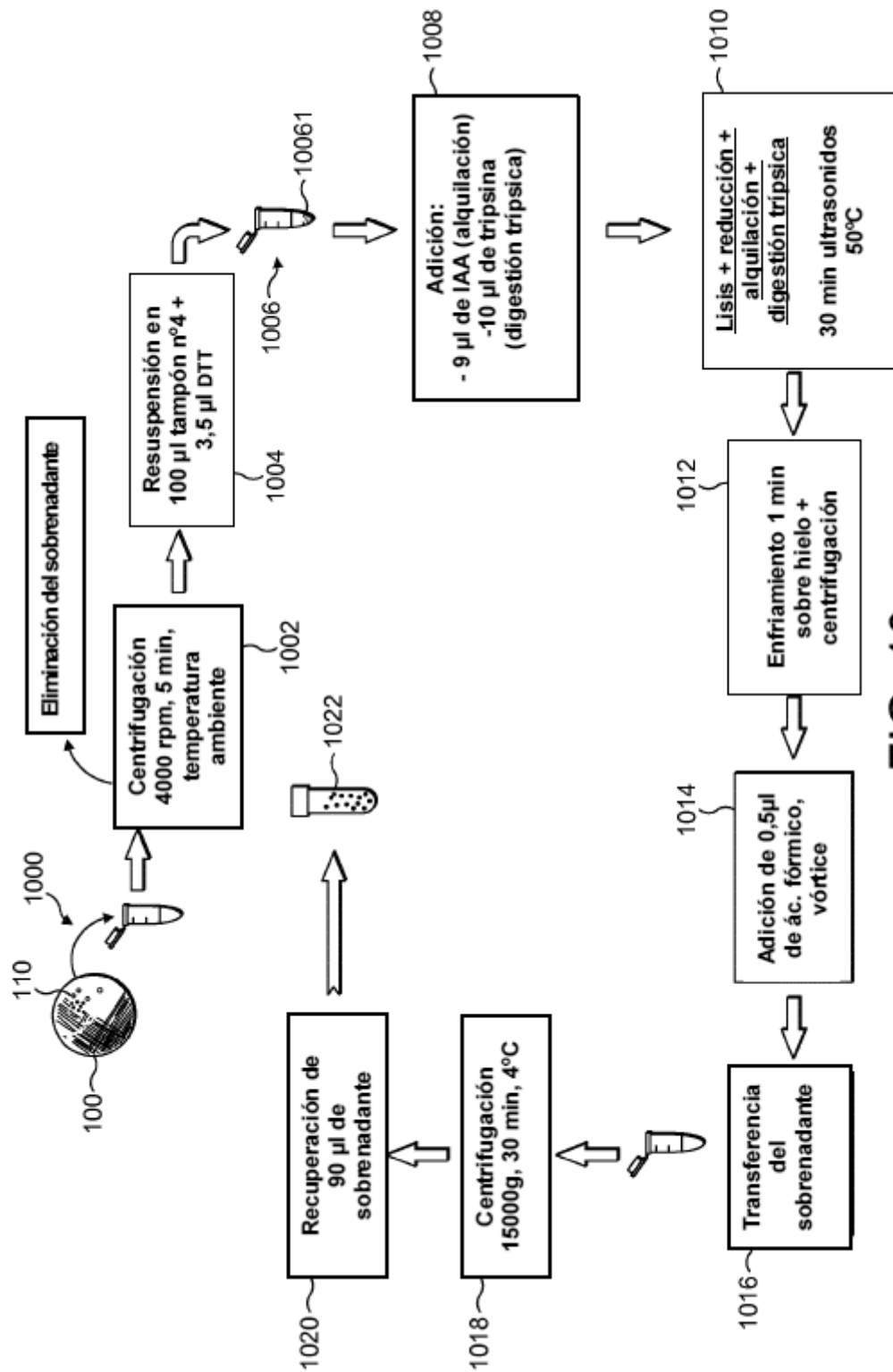


FIG. 10

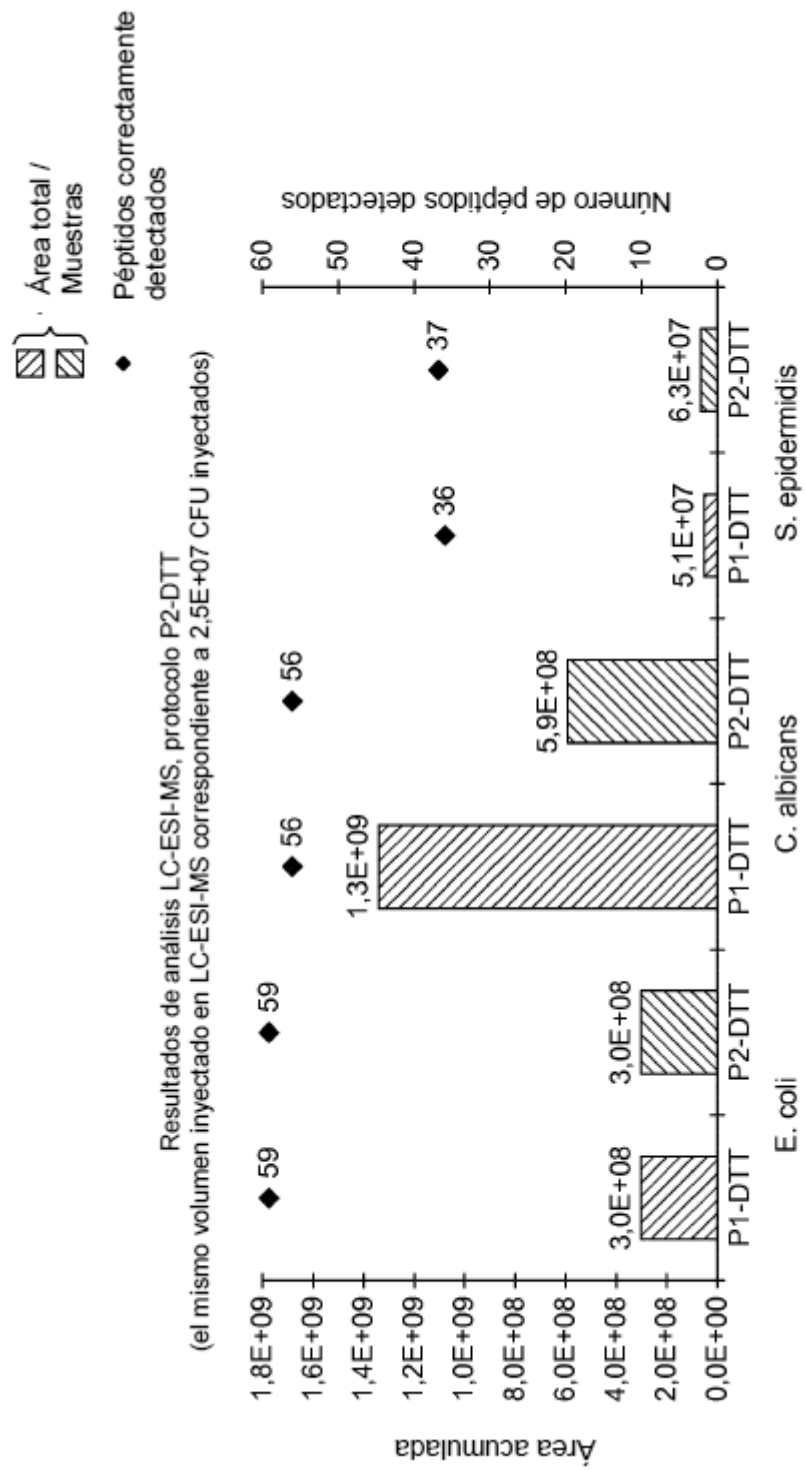


FIG. 11