

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 640**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/DE2015/100238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15745377 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3155429**

54 Título: **Marcador de proteínas específico, así como procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas**

30 Prioridad:

13.06.2014 DE 102014108331

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NEUE MATERIALIEN
GEMEINNÜTZIGE GMBH (100.0%)
Campus D2 2
66123 Saarbrücken, DE**

72 Inventor/es:

**DE JONGE, NIELS y
PECKYS, DIANA, B.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 733 640 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

Marcador de proteínas específico, así como procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas

5 La presente invención se refiere a un marcador de proteínas específico, así como a un procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de complejos proteicos, también llamada estequiometría de proteínas.

10 Las funciones celulares se regulan mediante los mecanismos moleculares a partir de proteínas, ADN, péptidos, etc, que se reúnen dinámicamente para dar complejos funcionales macromoleculares. En el transcurso del último medio siglo se obtuvieron numerosos progresos técnicos en la investigación biomédica y percepciones importantes en las interacciones moleculares complejas. Sin embargo, muchas cuestiones científicas sobre la interacción de complejos macromoleculares en relación con la función celular no se han aclarado completamente, entre otras cosas por que faltan procedimientos que puedan analizar éstos en células intactas. Como consecuencia, los estudios bioquímicos proporcionan a veces resultados contradictorios. Por lo demás, estos estudios bioquímicos tampoco pueden poner a disposición informaciones sobre el lugar de origen de los complejos macromoleculares dentro de las células.

15 Por lo demás, la representación de componentes celulares dentro de células completas es complicada, ya que las dimensiones se sitúan en el intervalo nanoscópico.

Una cuestión importante es bajo qué condiciones y en que lugar se produce la dimerización. Este ejemplo refleja solo una de tantas cuestiones, que dependen de la interacción de aproximadamente 20.000 proteínas en una célula eucariótica típica.

20 Un biólogo o un biofísico tendría idealmente la posibilidad de un microscopio rápido con una resolución espacial de algunos nanómetros, para identificar la localización de subunidades individuales en un complejo proteico. Idealmente, la célula se encontraría en su entorno acuoso natural, y la célula no se dañaría durante la localización de las subunidades. En especial membranas proteicas, que representan el grupo principal de los actuales objetivos de principio activo, son difíciles de analizar con las técnicas microscópicas conocidas actualmente.

25 Los inconvenientes de la microscopía óptica empleada habitualmente se discuten a continuación.

30 Las funciones celulares se analizan frecuentemente con microscopios de fluorescencia, empleándose células que presentan marcadores de proteínas fluorescentes. La microscopía de fluorescencia de superresolución ofrece imágenes con una resolución espacial de algunas decenas de nanómetros. No obstante, la resolución está limitada por las diferentes propiedades de fluoróforos y, en el caso de microscopía de emisión-depleción estimulada (STED), la intensidad del rayo láser, de modo que se obtiene un valor de aproximadamente 30 nm para las condiciones de representación prácticas en células completas. No obstante, esta escala de longitudes no es suficiente para reflejar proteínas individuales marcadas en complejos. No obstante, se requiere esto para analizar la función celular en el plano molecular. Por ejemplo, si se considera la investigación en el receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF) (EGFR), rápidamente se desprende que se requieren técnicas para diferenciar si un receptor se presenta en una configuración monomérica, dimérica o de cluster.

35 Se emplearon otros desarrollos tecnológicos de microscopía óptica, como acoplamiento de resonancia de plasmón, iluminación de reflexión total (TIRFM) y detección de fotones individuales calibrada, para analizar EGFR y otros receptores de membrana. No obstante, en este caso se debe tener en cuenta que estos métodos están limitados en difracción en su resolución espacial, y se debe recurrir al procesamiento de imágenes completo y a cálculos. Estos métodos no visualizan directamente los EGFRs individuales, sino que posibilitan solo conclusiones indirectas sobre conjuntos de EGFRs.

40 Otro método de microscopía óptica, la denominada transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), es muy sensible para distancias intermoleculares cortas (<10 nm) y se aplicó con éxito para la investigación de modificaciones en la conformación de EGFRs. Pero también FRET es una técnica de promedio de conjunto y se debe interpretar con mucha precaución cuando se producen los clusters menores, los dímeros. Esto se basa en que los datos de FRET que indican dímeros se pueden producir también a partir de una mezcla de monómeros y grandes clusters (con – en promedio – dos moléculas en relación espacial estrecha).

45 Otro método es la estimación del número de subunidades de complejo proteico en parches de membrana plasmática preparados mediante pasos de blanqueo discretos de las señales de fluorescencia bajo empleo de microscopía de resolución temporal. No obstante, esta técnica requiere una densidad muy reducida de complejo proteico con marcador fluorescente dentro de una zona del tamaño de una mancha de difracción, requiere aproximaciones estocásticas, conduce a dificultades prácticas en la investigación de células intactas, está limitado a un total de cinco

subunidades del mismo tipo, y los resultados se deben transferir mediante métodos bioquímicos o microscopía electrónica para garantizar la exactitud de la interpretación.

El método de selección para estudios a escala nanoscópica es la microscopía electrónica. Los actuales métodos a nivel de nanoescala para analizar células emplean casi siempre microscopía electrónica de transmisión (TEM) de secciones celulares delgadas insertadas en material sintético, secciones congeladas, cantos de células congeladas o fracturas de muestras celulares. Alternativamente, las células se pueden cortar y representar en un proceso en serie. En todos los casos se requieren muestras sólidas para análisis en vacío del microscopio electrónico, no permaneciendo las células, por consiguiente, en estado líquido. También el contraste y la resolución son generalmente demasiado reducidos para una identificación directa de las proteínas individuales en células eucarióticas. Por lo tanto, se requieren marcadores inmunológicos de materiales pesados, por ejemplo nanopartículas de oro (Au-NP), que están acoplados a anticuerpos específicos, para localizar proteínas en secciones delgadas. Las nanopartículas (NP) ofrecen suficiente contraste para la microscopía electrónica, de modo que las proteínas se pueden identificar en la matriz celular densamente empaquetada.

Se puede esperar una resolución aún más elevada para la representación de proteínas marcadas que están insertadas en la estructura biológica mediante empleo de un microscopio electrónico de transmisión por barrido (STEM). El STEM ofrece un fuerte contraste de marcadores de materiales pesados debido al contraste del número atómico (Z). Este principio se emplea para identificar marcadores en células completas, que se encuentran en una capa de líquido.

Aunque mediante microscopía electrónica se posibilita determinar las posiciones de proteínas con suficiente precisión, este tipo de microscopía está limitada actualmente por la disponibilidad de marcadores específicos.

Por lo tanto, muchos estudios emplean marcadores de inmuno-oro, pero fijándose los marcadores de nanopartículas en las proteínas de interés a través de engarces bastante largos (conectores). El engarce, por ejemplo constituido por uno o dos anticuerpos, es flexible y tiene una longitud típica de 30 nm. Como consecuencia directa de la longitud del engarce no se puede determinar la posición exacta de la proteína con una exactitud mayor que 30 nm. Esto limita la aplicación en gran medida.

El marcador de inmuno-oro proporciona informaciones sobre la presencia de una especie proteica determinada, por ejemplo en un orgánulo, pero no puede mostrar informaciones sobre el lugar preciso de la proteína con una exactitud mayor que 30 nm. Por consiguiente, no es posible extraer conclusiones sobre la estequiometría del complejo proteico, lo que es, no obstante, una información importante que se requiere para analizar funciones proteicas.

Un segundo procedimiento que se emplea en la microscopía electrónica es el marcaje a través de un ligando natural para una proteína receptora. El ligando es típicamente una molécula pequeña, que se une específicamente a un receptor determinado. Éste se une a una nanopartícula a través de un engarce relativamente corto (5 - 10 nm de longitud). Debido al tamaño reducido del ligando y del engarce es posible extraer conclusiones sobre el estado de dimerización de la proteína. Sin embargo, también este procedimiento tiene sus límites. El enlace del ligando desencadena frecuentemente un proceso en la célula, que conduce generalmente a modificaciones conformacionales y, por consiguiente, a una variación del estado estequiométrico. Aunque este método es interesante para determinados estudios, en muchos otros casos es deseable registrar la proteína en su estado inicial (antes del enlace del ligando). En el empleo de ligandos naturales también es desfavorable que el grupo de proteínas receptoras disponibles con ligandos (adecuados) esté limitado, por lo cual un gran grupo de proteínas relevantes no se pueden marcar mediante este método.

Un tercer procedimiento que se emplea en la microscopía electrónica utiliza marcadores fluorescentes codificados genéticamente, que se emplean para precipitar una coloración metálica en un punto de una proteína cuando éstos se irradian con luz de una determinada longitud de onda. No obstante, también este método está limitado, ya que requiere que la célula se modifique genéticamente y que el proceso de precipitación funcione solo para células muertas y fijadas.

El documento WO2004020453A2 describe el enlace de DNA o CNTs para la creación de estructuras electrónicas.

WATANABE SHIGEKI ET AL: ("Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy", NATURE METHODS, tomo 8, N° 1, página 80) describen un procedimiento para la correlación de microscopía STED y PALM con muestras de tejidos, para localizar proteínas y correlacionar éstas con microscopía electrónica. Para la orientación de los registros se emplean nanopartículas de sílice fluorescentes o nanopartículas de oro. Por lo tanto, la tarea de la invención consiste en poner a disposición un procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas por medio de microscopía electrónica, para eliminar los inconvenientes citados anteriormente.

El procedimiento emplea un marcador de proteínas específico, comprendiendo el marcador de proteínas específico dos unidades, una primera unidad y una segunda unidad,

- 5
- comprendiendo la primera unidad una molécula pequeña para la unión específica a una proteína, así como al menos una molécula acoplada químicamente para el enlace con la segunda unidad, y
 - comprendiendo la segunda unidad una nanopartícula modificada superficialmente, presentando la nanopartícula modificada superficialmente un revestimiento superficial, que comprende al menos una molécula para el enlace con la primera unidad.

10 En este caso está previsto que ambas unidades se presenten separadas antes de su empleo. Además está previsto que la molécula pequeña (para la unión específica a una proteína) de la primera unidad esté constituida por una secuencia peptídica, una secuencia de ADN o una molécula química pequeña.

La molécula (pequeña) para la unión específica a una proteína se forma a partir de una secuencia peptídica, que está constituida a lo sumo por 60 aminoácidos, una secuencia de ARN o ADN, que está constituida a lo sumo por 70 nucleótidos, o una molécula química cuyo peso molecular asciende a lo sumo a 12 kDa. La afinidad de enlace de la molécula (pequeña) se sitúa en el intervalo micromolar inferior a picomolar medio.

15 Un posible empleo del marcador proteico específico podría consistir, a modo de ejemplo, en el empleo del marcador para la detección de la proteína HER2, nuevos medicamentos para el cáncer, así como a modo de posible candidato para el diagnóstico de cáncer. HER2 es especialmente significativo para cáncer de mama, ya que está sobreexpresado en aproximadamente un tercio de todos los tumores de mama malignos, y esto se correlaciona significativamente con un tiempo de supervivencia reducido. En este caso se puede emplear un péptido que se puede unir específicamente a HER2 y que está relacionada con el dominio de la proteína estafilococal A (SPA), que presenta aproximadamente 1-13 mutaciones de sustitución.

20 Una configuración de la invención prevé que la nanopartícula esté constituida por un material con número atómico elevado (Z).

25 En este caso son preferentes elementos del período IV y los elementos del grupo secundario, incluyendo lantánidos y actínidos.

En especial corresponde a la invención que la nanopartícula esté constituida por oro (Au), platino (Pt), otro metal noble o seleniuro de cadmio (CdSe), sulfuro de cinc (ZnS) o seleniuro de plomo (PbSe).

A modo de ejemplo, también se podían emplear nanopartículas de plata (Ag).

Además es ventajoso que la nanopartícula sea esférica, elipsoidal o alargada.

30 En el ámbito de la invención está previsto igualmente que el diámetro de la nanopartícula se sitúe en el intervalo de 0,5 a 15,0 nm.

Para el enlace de la primera unidad con la segunda unidad es ventajoso que el revestimiento contenga al menos una proteína de estreptavidina y la molécula acoplada químicamente sea una proteína de biotina.

35 Otros posibles compuestos moleculares de adherencia pueden ser, a modo de ejemplo, enlaces amida, enlaces oro-azufre, y también enlaces de van der Waals.

Otra configuración de la invención prevé que las nanopartículas sean nanopartículas fluorescentes.

A modo de ejemplo es concebible el empleo de nanopartículas de CdSe, ZnS, InP o PbSe de aproximadamente 10 nm de tamaño, los denominados quantumdots (QDs). También son concebibles y corresponden a la invención quantumdots de otros materiales.

40 El empleo de nanopartículas fluorescentes es ventajoso cuando también se realiza una determinación de fluorescencia en un microscopio óptico, además de un microscopio electrónico, para la detección. Los marcadores con la nanopartícula fluorescente se pueden emplear también exclusivamente por medio de microscopio óptico. En el caso de empleo exclusivo de un microscopio óptico se mejorarían ya la eficacia de marcador y la especificidad de marcador.

45 Además, ventajosamente está previsto que el revestimiento superficial sea un revestimiento de agente tensioactivo. Éste es el caso, por ejemplo, en el revestimiento superficial de nanopartículas con moléculas de estreptavidina.

Un revestimiento tensioactivo es especialmente ventajoso para el comportamiento en disolución de las nanopartículas modificadas superficialmente en disoluciones acuosas.

La tarea se soluciona mediante un procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células bajo empleo del marcador de proteínas específico según la reivindicación 1:
5 procedimientos para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células que comprenden los pasos:

- a) cultivo de las células en un medio apropiado,
- b) incubación de las células con una primera unidad, que comprende una molécula para la unión específica a una proteína, así como al menos una molécula acoplada químicamente para el enlace a una segunda
10 unidad, comprendiendo la segunda unidad una nanopartícula modificada superficialmente, que presenta un revestimiento superficial que comprende al menos una molécula para el enlace a la primera unidad, formándose la molécula para la unión específica a partir de una secuencia peptídica que está constituida a lo sumo por 60 aminoácidos, formándose a partir de una secuencia de ADN o ARN, que está constituida a lo sumo por 70 nucleótidos, o siendo una molécula química cuyo peso molecular asciende a lo sumo a 12
15 kDa, en el medio apropiado,
- c) lavado de las células,
- d) fijación química o térmica de las células,
- e) incubación de las células fijadas con la segunda unidad, encontrándose la segunda unidad en un medio apropiado,
- 20 f) lavado de las células,
- g) registro de imágenes de microscopía electrónica por medio de un microscopio electrónico,
- h) valoración estadística de los registros para verificar si las proteínas marcadas con nanopartículas se presentan separadas o en un complejo proteico.

El procedimiento para la detección de la posición de una proteína es el siguiente: las células, o bien la célula, se
25 cultiva/n bajo empleo de procedimientos conocidos por técnicos cualificados. La primera unidad del marcador de proteínas específico, que contiene el péptido de enlace específico, la secuencia de ADN o ARN o una molécula química pequeña, se incuba con las células en un medio apropiado. La concentración de marcador de proteínas específico y el tiempo de incubación se optimizan para una detección eficiente y específica. El marcador de
30 proteínas específico se aplica típicamente con una concentración que es mayor que la afinidad de enlace del ligando con la proteína de interés en dos a tres órdenes de magnitud. El tiempo de incubación asciende habitualmente a algunos minutos. Después se eliminan por lavado las moléculas excedentes de la primera unidad del marcador de proteínas específico, y las células se fijan por vía química, térmica o física.

Una variación de este método prevé que las células se incuben en un medio apropiado, que contiene sustancias, por
35 ejemplo albúmina de suero bovino, y los enlaces inespecíficos se bloqueen en las unidades de marcador empleadas a continuación. La incubación con el medio apropiado tiene lugar preferentemente entre paso a) y paso b), es decir, antes de la incubación de las células con las moléculas (molécula pequeña y molécula acoplada químicamente) de la primera unidad en el medio apropiado.

Las células se fijan químicamente, a modo de ejemplo, con paraformaldehído y una baja concentración de
40 glutaraldehído para obtener una reticulación de las proteínas, detener los procesos celulares y obtener el estado celular. En lugar de la fijación química, también es posible retrasar los procesos celulares con otros procedimientos, a modo de ejemplo mediante descenso de la temperatura (fijación térmica).

En el procedimiento es igualmente concebible que las células se fijan con la primera parte del marcador de proteínas
específico ya antes de la incubación.

Tras la incubación de las células con la primera unidad del marcador proteico específico, las células se incuban con
45 la segunda unidad del marcador, la nanopartícula modificada superficialmente. La unión de las nanopartículas a los puntos de enlace no es generalmente tan eficiente como la de los péptidos a la proteína. Esto se justifica por medio del tamaño y la masa de las nanopartículas. Otros factores en ensayos prácticos son que la concentración de nanopartículas está limitada frecuentemente por motivos de costes, y las nanopartículas pueden formar enlaces
50 inespecíficos a concentraciones más elevadas. No obstante, si las células están fijadas según la invención, la incubación con la segunda unidad del marcador de proteínas específico se puede optimizar en el sentido de un marcador eficiente, a modo de ejemplo mediante el aumento del tiempo de incubación a 30 minutos y/o mediante adición de sustancias, que cubren posibles puntos de enlace inespecíficos para las nanopartículas.

El marcador de proteínas específico del procedimiento según la invención se une a las células mediante ambas
unidades, la primera y la segunda unidad, durante el desarrollo del experimento.

Una vez el marcador de proteínas específico se ha unido a las células, las células se pueden representar por medio de microscopía electrónica. Mediante las informaciones de localización de las proteínas individuales obtenidas es posible determinar sin mayor problema si las proteínas se presentan en un complejo proteico o no. En este caso es posible que las proteínas se presenten como proteínas aisladas, como dímeros o en clusters de un orden superior.

5 Mediante la valoración de imágenes de microscopía electrónica, o bien análisis de localización de muchas proteínas, es posible obtener entonces informaciones estadísticas sobre la distribución estequiométrica de las proteínas.

Una ventaja del marcador de dos pasos descrito anteriormente es la consecución de una eficacia de marcador y una especificidad óptimas.

10 Otra ventaja importante consiste en que mediante el procedimiento según la invención se posibilita realizar el marcador con una nanopartícula, que presenta varias moléculas de adherencia, sin generar artefactos de agrupación.

15 Esto se explica a continuación mediante un contraejemplo: los marcadores que se generan a partir de péptidos pequeños se acoplan con nanopartículas modificadas superficialmente, que presentan varias moléculas de enlace en su revestimiento modificado superficialmente. Éstas se incuban con las células en un procedimiento de un paso. Si un marcador con varios puntos de enlace se incuba con células vivas, el marcador induce la agrupación, ya que, tras la formación inicial de una nanopartícula en una proteína, las proteínas adyacentes se acoplan mediante procesos de difusión, igualmente en los puntos de enlace disponibles de la nanopartícula, de modo que una nanopartícula concentra un número de proteínas. Esta formación de clusters impide un análisis fiable de la distribución estadística de la estequiometría de la especie proteica objetivo.

20 En el caso de empleo del marcador según la invención y del procedimiento de dos etapas, el péptido se une en primer lugar a la proteína objetivo. La segunda unidad del marcador específico de la proteína, que presenta la nanopartícula modificada superficialmente, se aplica solo tras el paso de procedimiento de fijación, de modo que no puede tener lugar una agrupación. Por consiguiente, el marcaje según la invención se puede emplear para detectar la estequiometría.

25 Una ventaja adicional de las unidades del marcador específico de la proteína aplicadas sucesivamente es que se obtiene una gran flexibilidad en los experimentos.

La tarea planteada se soluciona igualmente mediante un procedimiento preferente según la reivindicación dependiente 2:

30 Procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células según la reivindicación 1, incubándose en el paso b) las células con al menos dos primeras unidades diferentes en el medio apropiado, e incubándose en el paso e) las células con al menos dos segundas unidades diferentes, encontrándose las segundas unidades en un medio apropiado, y comprendiendo cada una de las segundas unidades al menos una molécula que se adhiere a una de las primeras unidades.

35 Según la invención está previsto que, en esta solución de la tarea, dos o más proteínas diferentes estén marcadas específicamente con diferentes marcadores en cada caso. Corresponde asimismo a la invención que cada una de las segundas unidades comprenda al menos una molécula, que se enlaza específicamente con la primera unidad.

En el diagnóstico de cáncer son conocidas diferentes secuencias peptídicas pequeñas, adicionalmente a aquellas que enlaza el HER2. A modo de ejemplo, son conocidas secuencias peptídicas que forman un enlace con EGFR o HER3. Las tres proteínas presentan una relevancia elevada para el diagnóstico de cáncer y la terapia de cáncer.

40 La segunda unidad de marcadores específicos de la proteína se puede identificar por medio del tipo de nanopartículas empleado en imágenes de microscopía electrónica. Las nanopartículas pueden presentar, a modo de ejemplo, un tamaño de 1,4 nm, 5 nm o 10 nm, ser esféricas, elipsoidales o alargadas, o ser producidas a partir de diferentes materiales, como por ejemplo oro, platino, CdSe/ZnS o PbSe. Mediante las diferencias en las nanopartículas (tamaño, forma, material, etc.) en los diferentes marcadores de proteínas específicos se pueden
45 identificar y localizar las proteínas objetivo. Adicionalmente, en el caso de empleo de nanopartículas fluorescentes, por ejemplo puntos cuánticos (quantumdots, QDs), se dispone de una firma fotoóptica.

50 Mediante una combinación de marcadores de proteínas específicos se posibilita identificar y valorar la estequiometría de complejos proteicos, que están constituidos por diversos tipos de proteínas. De este modo se puede aclarar una cuestión importante de investigación biológica sobre los mecanismos que desempeñan un papel en el desarrollo de cáncer de mama, es decir, en qué concentración se efectúa la hetero-dimerización de EGFR-HER2 y la hetero-inhibición de dímeros de EGFR-HER2.

5 La fijación en el paso d) se puede efectuar por vía química o térmica. Las células se fijan químicamente, a modo de ejemplo con paraformaldehído y una baja concentración de glutaraldehído, para obtener una reticulación de proteínas, detener los procesos celulares y obtener el estado celular. En lugar de la fijación química, también es posible retrasar los procesos celulares con otros procedimientos, a modo de ejemplo mediante el descenso de la temperatura (fijación térmica).

Una variación de este método es la elaboración secuencial de las diferentes unidades, es decir, incubación con la primera unidad de una etiqueta, lavado, incubación con la primera unidad de un segundo marcador, fijación, etc. Es igualmente concebible que la fijación tras la incubación se efectúe con la primera unidad.

10 A modo de ejemplo, el dímero de EGFR se puede estudiar con diferentes marcadores, empleándose un marcador de nanopartículas de oro, que está fijado al ligando EGF, y como marcador adicional un péptido de enlace pequeño, que está unido a un quantumdot (QD).

15 En primer lugar se efectúa la incubación de las células con EGF y el péptido de enlace. Después se fijan las células. Después se acoplan nanopartículas a los ligandos, por ejemplo mediante el empleo de EGF-biotina y nanopartículas de estreptavidina. A modo de ejemplo, la nanopartícula se puede acoplar al EGF también antes de la incubación. Ahora se emplea como segundo marcador el marcador proteico específico, constituido por dos unidades, empleándose sucesivamente las dos unidades, pero empleándose como nanopartícula una nanopartícula diferente a la acoplada a los ligandos en este caso, para que los ligandos y las proteínas se puedan detectar por separado.

20 Por ejemplo, en el ligando EGF se acopla un QD, y por medio del marcador de proteínas específico constituido por dos unidades se acopla una nanopartícula de oro a la proteína EGFR. Ya que la unión del ligando activa la proteína EGFR, por medio de los QD se pueden localizar los receptores que se activaron. Por el contrario, las nanopartículas de oro localizan todos los EGFRs.

Por lo tanto, se posibilita responder a la cuestión biológica importante de que todos los dímeros contengan EGFRs activados o los EGFRs – y en caso afirmativo cuantos – estén presentes como dímeros ya en forma inactiva.

25 En otras variaciones de este método se pueden emplear también otros órdenes de pasos de trabajo citados anteriormente. Por ejemplo, en primer lugar se marca con el marcador de proteínas específico constituido por dos unidades, seguido del marcaje por medio del ligando natural. No obstante, en el ámbito de la invención también está previsto que se empleen simultáneamente ligandos naturales y la primera unidad del marcador de proteínas específico.

30 Además, corresponde a la invención que se registren imágenes de células, en las que diferentes proteínas están marcadas con los marcadores de proteínas específicos constituidos por dos unidades.

El microscopio electrónico empleado puede ser un microscopio electrónico de transmisión, un microscopio electrónico de transmisión por barrido o un microscopio electrónico de barrido.

35 Además, corresponde a la invención que los registros de imágenes de microscopio electrónico se realicen por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), empleándose un detector de STEM con sensibilidad para número atómico, el denominado contraste Z. El detector STEM asegura que el marcador, o bien los marcadores, sean visibles con contraste claramente más elevado que el material celular circundante en las imágenes.

40 Además, corresponde a la invención que los marcadores se puedan detectar manualmente o por medio de un procedimiento automático en las imágenes, de modo que se puedan obtener informaciones sobre la posición y el tipo de proteínas marcadas. Estas informaciones se pueden valorar para varios experimentos diferentes y comparar entre sí a continuación. Por consiguiente, a modo de ejemplo se puede identificar si la presencia de dímeros de EGFR se modifica tras adición de un medicamento para el cáncer.

Además, corresponde a la invención que se elaboren imágenes de microscopía electrónica de las células en cuestión.

45 Esta información se puede referir a las posiciones de marcador y tipos, es decir, correlacionar con los mismos, mediante lo cual se puede analizar en qué zonas se presenta un patrón de marcador determinado.

50 Además, corresponde a la invención que, para los marcadores de proteínas específicos constituidos por dos unidades, se combinen imágenes de microscopio de fluorescencia con imágenes de microscopio electrónico. Por ejemplo, las posiciones exactas de proteínas marcadas con QD se pueden comparar con la presencia de fluorescencia de la longitud de onda correspondiente al tipo QD en imágenes de microscopio de fluorescencia. A partir de estas informaciones se puede comprobar en qué células o regiones celulares se presenta una proteína

determinada. Además, de este modo se puede analizar si hay variaciones locales en la densidad/frecuencia de dímeros, tanto entre diferentes células como también dentro de una célula individual.

5 Además, por medio de microscopía óptica y de fluorescencia se puede analizar una célula viva con resolución temporal. Por lo tanto, se pueden analizar procesos celulares. Tan pronto un proceso determinado se encuentra en una etapa determinada, se puede iniciar una fase determinada de marcaje o fijación, para que la información de marcaje esté correlacionada temporalmente con un proceso celular. De este modo se puede determinar también el momento exacto de marcaje tras adición de un principio activo, por ejemplo de un medicamento inhibidor de cáncer.

10 Además, corresponde a la invención que los registros de imágenes de microscopio electrónico se realicen por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) y la microscopía óptica correlativa, combinándose un detector de STEM con una lente fotoóptica.

15 Este dispositivo de detección combina la detección eficaz por medio de microscopía STEM de materiales con número atómico elevado, a modo de ejemplo marcadores de nanopartículas específicos en una muestra en un líquido, como una célula, con microscopía electrónica simultánea, a modo de ejemplo a través de contraste de fluorescencia en marcadores proteicos fluorescentes en células, o a través de contraste de dispersión del material celular. Mediante el empleo de tal dispositivo se posibilitan una detección altamente eficaz de materiales con número atómico elevado en la muestra con la máxima resolución posible, y una microscopía óptica correlativa temporalmente por completo.

Una configuración preferente para el dispositivo consiste en que el detector de STEM esté integrado en una lente fotoóptica.

20 En este contexto es ventajoso que el detector de STEM esté integrado en una cavidad en la lente fotoóptica.

El dispositivo también puede estar configurado de modo que la cavidad presente un orificio con diámetro reducido en el lado de la muestra, a la que sigue un espacio de acumulación de electrones de forma cónica, en cuyo extremo inferior está dispuesto el detector de STEM.

25 En este caso, a continuación se remite a la dirección del haz de electrones de arriba hacia abajo. Es posible cualquier dirección de haz, dependiendo de la disposición del dispositivo. Esto significa que en el lado de la lente orientado al soporte de muestras está dispuesto el orificio al que sigue el espacio de acumulación de electrones que se ensancha hacia abajo cónicamente, en cuyo extremo inferior está dispuesto el detector de STEM.

La señal del detector de STEM puede ser realizable en el lado de la lente hacia fuera.

30 En el lado de la lente fotoóptica orientado a la muestra, el dispositivo puede presentar un soporte de muestras, pudiendo estar configurado el soporte de muestras como membrana delgada permeable a electrones, que presenta configuración permeable a electrones.

Para los registros de imágenes de microscopio electrónico, que se realizan por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) y la microscopía óptica, el espacio alrededor del soporte de muestras y el espacio de acumulación de electrones debe poseer la propiedad de ajustar un vacío.

35 Para los registros de imágenes de microscopio electrónico, que se realizan por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido y la microscopía óptica, puede estar previsto además que esté dispuesta una fuente de haz de electrones en el lado del soporte de muestras opuesto al detector de STEM.

El dispositivo de detección puede presentar también una lente, estando unida a la lente una fuente lumínica y un agente de detección fotoóptico.

40 La lente con detector de STEM integrado se puede incorporar en diferentes microscopios electrónicos, por ejemplo un ESEM con una energía electrónica típica de 30 keV o un STEM de alta resolución con una energía electrónica típica de 200 keV.

45 Es ventajoso que el dispositivo de detección para la microscopía electrónica de transmisión por barrido y la microscopía óptica correlativa presente uno o varios pasos de haz fotoópticos diferentes para la detección o para la iluminación.

Para los registros de imágenes de microscopio electrónico, que se realizan por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido y la microscopía óptica, es igualmente posible que la fuente

lumínica esté dispuesta del lado del detector de STEM, el haz de luz se solape con el haz de electrones en el foco, y la vía de detección fotoóptica se solape con la haz de iluminación.

5 No obstante, también para los registros de imágenes de microscopio electrónico, que se realizan por medio de un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido y la microscopía óptica correlativa, se podría emplear un dispositivo en el que el detector de STEM está dispuesto entre la lente óptica y la muestra. Del mismo modo es posible que el detector de STEM se pueda desplazar en la zona entre la lente óptica y la muestra.

A continuación se explica el estado de la técnica, así como un ejemplo de realización de la invención.

Muestran

- 10 Fig. 1 una representación parcialmente esquemática para la distancia de interacciones de proteínas de un dímero (en este caso EGFR),
- Fig. 2 una representación parcialmente esquemática del empleo de una nanopartícula de oro, que está unida a una proteína objetivo (dímero de EGFR) a través de un engarce,
- 15 Fig. 3 el marcador de proteínas específico según la invención en representación esquemática parcial, que está unida a un dímero de EGFR.

20 En las Fig. 1 A) y 1 B) se representa un receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor, EGF) dímero (EGFR) en la membrana de plasma. En este caso, la Fig. 1 A) muestra un EGFR no activado, así como un factor de crecimiento epidérmico no enlazado (EGF). La Fig. 1 B) muestra un dímero de EGFR activo con ligandos EGF no enlazados. A modo de ejemplo, la escala de longitud en la que tienen lugar las interacciones proteicas para la formación de dímeros del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se muestra en la Fig. 1 B). El receptor del factor de crecimiento epidérmico desempeña un papel crítico en la patogénesis y el desarrollo de muchos tipos de cáncer diferentes.

25 La Fig. 2 describe un dímero de EGFR, que está unido a una nanopartícula de oro (NP) a través de un engarce de anticuerpo, constituido por un anticuerpo primario (PA) y un anticuerpo secundario (SA). El anticuerpo primario (PA) se une específicamente a la proteína (EGFR) y el anticuerpo secundario (SA) a una nanopartícula de oro (NP), que presenta como modificación superficial (OM) al menos una molécula química para la unión con el anticuerpo. La distancia (flecha) entre la nanopartícula (NP) y la proteína (dímero de EGFR) puede ascender hasta a 30 nm.

30 Muchos estudios emplean estos marcadores de inmuno-oro, pero fijándose los marcadores de nanopartículas con las proteínas objetivo a través de un engarce bastante largo (véase la Fig. 2, SA + PA). El engarce es flexible y tiene una longitud típica de 30 nm. Como consecuencia directa de la longitud del engarce, la posición exacta de la proteína (EGFR), o bien de ambos componentes proteicos en el caso de un dímero de EGFR, no se puede determinar con una exactitud mayor que 30 nm, o bien 60 nm para el dímero, lo que limita esta aplicación en gran medida. El marcador de inmuno-oro proporciona informaciones sobre la presencia de una determinada especie proteica, por ejemplo en un orgánulo, pero no puede mostrar ninguna información sobre el lugar preciso de la proteína con una exactitud mayor que 30 nm. En caso extremo, incluso dos nanopartículas adyacentes (NP) representarían dos EGFRs, que presentan una distancia entre sí de 60 mm como máximo. Esta distancia sería sensiblemente mayor que la distancia de un complejo proteico. Por lo tanto, a partir de los datos no es posible concluir si dos marcadores adyacentes observados representan un dímero o, por ejemplo, dos proteínas que tienen una distancia considerable. No obstante, existen anticuerpos de engarce más cortos, menores en un factor de dos, pero se emplean con poca frecuencia, ya que la distancia es todavía demasiado grande para la identificación de la estequiometría.

45 La Fig. 3 describe el marcador proteico específico según la invención (1). En este caso se representa, a modo de ejemplo, un dímero de EGFR, al que se une el marcador de proteínas específico según la invención (1), para identificar el dímero por medio de microscopía electrónica. La secuencia peptídica (2a) está unida a una molécula pequeña (2b), que se une al revestimiento superficial (3b) de una nanopartícula modificada superficialmente (3a). El marcador de proteínas específico (1) está constituido por dos partes: el péptido de enlace (2a) y la molécula pequeña (2b) forman una primera parte (zona punteada 2), y la nanopartícula modificada superficialmente (3a) con su revestimiento superficial (3b) forma la segunda parte (zona a trazos 3).

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células, que comprende los pasos:

- 5 a) cultivo de las células en un medio apropiado,
 b) incubación de las células con una primera unidad (2), que comprende una molécula (2a) para la unión específica a una proteína, así como al menos una molécula acoplada químicamente (2b) para el enlace a una segunda unidad (3), comprendiendo la segunda unidad (3) una nanopartícula modificada superficialmente (3a), que presenta un revestimiento superficial (3b) que comprende al menos una molécula para el enlace a la primera unidad (2), formándose la molécula (2a) para la unión específica a partir de una
 10 secuencia peptídica que está constituida a lo sumo por 60 aminoácidos, formándose a partir de una secuencia de ADN o ARN, que está constituida a lo sumo por 70 nucleótidos, o siendo una molécula química cuyo peso molecular asciende a lo sumo a 12 kDa, en el medio apropiado,
 c) lavado de las células,
 d) fijación química o térmica de las células,
 15 e) incubación de las células fijadas con la segunda unidad (3), encontrándose la segunda unidad en un medio apropiado,
 f) lavado de las células,
 g) registro de imágenes de microscopía electrónica por medio de un microscopio electrónico,
 20 h) valoración estadística de los registros para verificar si las proteínas marcadas con nanopartículas se presentan separadas o en un complejo proteico.

2.- Procedimiento para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células según la reivindicación 1, incubándose en el paso b) las células con al menos dos primeras unidades diferentes (2) en el medio apropiado, e incubándose en el paso e) las células con al menos dos segundas unidades diferentes (3), encontrándose las segundas unidades (3) en un medio apropiado, y comprendiendo cada una de las segundas
 25 unidades (3) al menos una molécula que se adhiere a una de las primeras unidades (2).

3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que las células se incuban en un medio apropiado antes de la incubación con la primera unidad (2), conteniendo el medio apropiado sustancias que bloquean la unión inespecífica de la segunda unidad (3) empleada.

4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el microscopio electrónico comprende un detector de STEM.
 30

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que se emplea un microscopio óptico, o bien un microscopio fluorescente, para el registro de imágenes de microscopía óptica, o bien imágenes de fluorescencia.

6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que, durante el procedimiento, se registra al menos una serie de imágenes de microscopía óptica y/o de microscopía de fluorescencia de resolución temporal, mediante lo cual se puede correlacionar temporalmente al menos un momento de al menos uno de los
 35 pasos del procedimiento con la información de microscopía óptica y/o de microscopía de fluorescencia.

7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que, para el registro de imágenes de microscopio electrónico, se emplea un dispositivo para la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) y la microscopía óptica correlativa, combinándose un detector de STEM con una lente fotoóptica.
 40

8.- Empleo de un marcador de proteínas específico (1) para la identificación de la distribución estadística de la estequiometría de proteínas en células, que comprende dos unidades (2, 3), una primera unidad (2) y una segunda unidad (3),

- 45 - comprendiendo la primera unidad (2) una molécula (2a) para la unión específica a una proteína, así como al menos una molécula acoplada químicamente (2b) para el enlace con la segunda unidad (3), y
 - comprendiendo la segunda unidad (3) una nanopartícula modificada superficialmente (3a), presentando la nanopartícula (3a) un revestimiento superficial (3b), que comprende al menos una molécula para el enlace con la primera unidad (2), formándose la molécula (2a) para la unión específica a partir de una secuencia peptídica que está constituida a lo sumo por 60 aminoácidos, formándose a partir de una secuencia de
 50 ADN o ARN, que está constituida a lo sumo por 70 nucleótidos, o siendo una molécula química cuyo peso molecular asciende a lo sumo a 12 kDa, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7.

Fig. 1

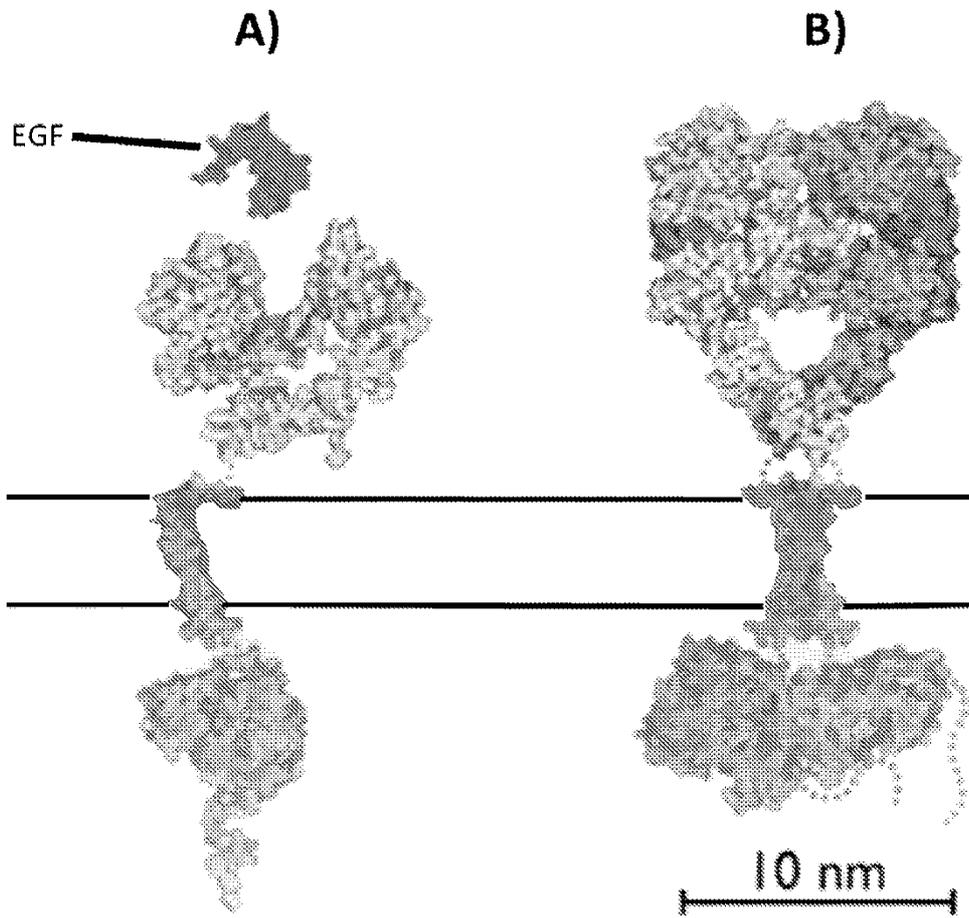


Fig. 2

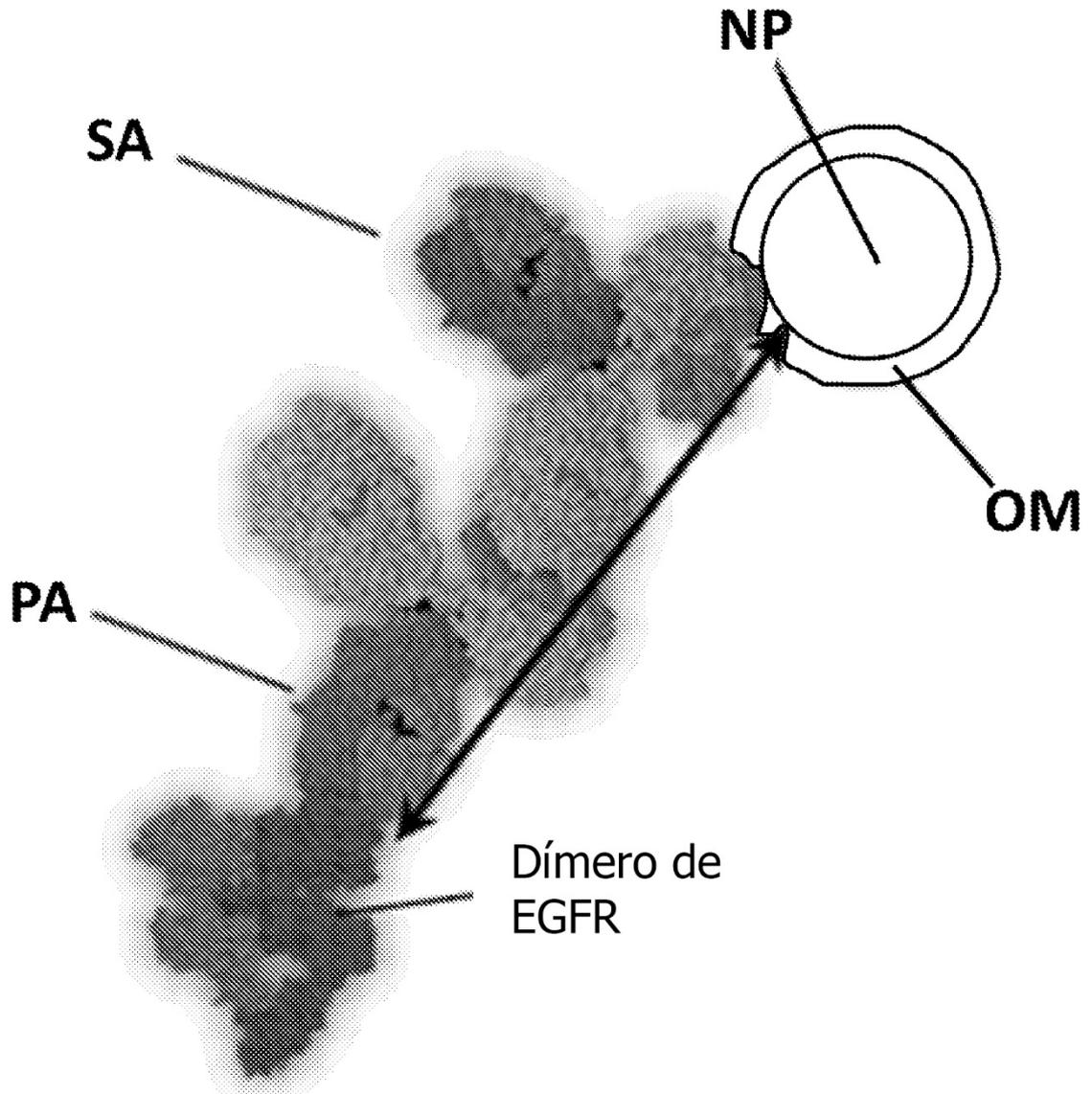


Fig. 3

