

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 535**

51 Int. Cl.:

C07K 17/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015 PCT/EP2015/052656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118152**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015 E 15703093 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2024 EP 3102612**

54 Título: **Preparación de muestras proteómicas utilizando perlas paramagnéticas**

30 Prioridad:

07.02.2014 EP 14154326

19.02.2014 EP 14155853

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2025

73 Titular/es:

**EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY
LABORATORY (100.00%)
Meyerhofstrasse 1
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**KRIJGSVELD, JEROEN;
STEINMETZ, LARS y
HUGHES, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 998 535 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

Preparación de muestras proteómicas utilizando perlas paramagnéticas

- 5 La presente invención se refiere a un método para unir polipéptidos de forma reversible a una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en micropérlas o micropartículas, y en donde el método se lleva a cabo en un solo tubo, preferiblemente para su uso en proteómica basada en espectrometría de masas, kits que proporcionan reactivos para el método de la invención y los usos de dichos kits.

10 **Antecedentes de la invención**

La generación actual de proteómica se esfuerza por obtener una caracterización completa del proteoma para una variedad de sistemas, tipos y subtipos celulares (Lamond, A.L. y col., 2012). Esto incluye, pero no se limita a, el examen, la síntesis, la degradación, la abundancia y las modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación de todas las proteoformas (Smith, L. M. y col., 2013). Los rápidos avances en el hardware y el software han hecho que la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) se convierta en uno de los principales métodos de detección utilizados en proteómica (Yates, J.R. y col., 2009). La diversidad y la complejidad de los proteomas celulares han impulsado el desarrollo de una amplia gama de protocolos para respaldar su análisis mediante MS. Estos métodos están optimizados para mejorar la profundidad de la cobertura del proteoma mediante la generación de condiciones que son favorables para la digestión proteolítica y la recuperación de muestras. Ya sea que se experimente *in vivo*, *in vitro* o con extractos purificados, un punto en común entre todos los protocolos de soporte es la selección cuidadosa de las soluciones y los métodos de enriquecimiento durante la preparación de la muestra para garantizar la compatibilidad con los flujos de trabajo posteriores y las plataformas de detección. A pesar del hecho de que la mayoría de los detergentes (p. ej., el SDS) son incompatibles con las digestiones enzimáticas y los análisis de MS posteriores, frecuentemente se utilizan para lograr la solubilización de las proteínas. Ultrafiltración (preparación de muestras asistida por filtro, FASP) (Wisniewski, J.R. y col., 2009) o protocolos basados en perlas (Hengel, S.M. y col., 2012; Bereman, M.S. y col., 2011) son eficientes para la eliminación de detergentes, pero tienen una flexibilidad mínima y requieren una manipulación significativa de las muestras (filtración, centrifugación, concentración), lo que resulta en pérdidas de muestras y una reducción de la eficiencia general. Por lo tanto, el desarrollo de una plataforma adaptable que mejore estas propiedades colectivas sería un avance considerable en el campo de la proteómica. La rápida expansión de la secuenciación de próxima generación ha impulsado el desarrollo de protocolos aptos para la preparación de bibliotecas genómicas de alto rendimiento, facilitada en gran medida por la aplicación de perlas paramagnéticas en plataformas manuales y robotizadas (Hawkins, T.L. y col., 1994; DeAngelis, M.M. y col., 1995; Wilkening, S. y col., 2013). La flexibilidad y la facilidad de manejo que ofrecen las perlas paramagnéticas promueven la generación de protocolos simplificados que obtienen una extendida utilidad. El uso de perlas paramagnéticas en proteómica está mucho menos extendido, y las aplicaciones principales se centran en enfoques específicos, como las estrategias de inmovilización y desplegables basadas en la afinidad para proteínas recombinantes o enzimas proteolíticas. Recientemente, se han desarrollado métodos basados en partículas de nanodiamantes funcionalizadas, que facilita la eliminación de sustancias contaminantes (p. ej., detergentes) y la mejora del análisis proteómico específico de los compartimentos (Chen, W.-H. y col., 2006). Sin embargo, las limitaciones relacionadas con las condiciones requeridas para la unión ($\text{SDS} < 0,5 \%$) limitan la universalidad de este enfoque. Basándonos en los desarrollos tecnológicos pioneros por la inmovilización reversible en fase sólida (SPRI, por sus siglas en inglés) para la limpieza de ácidos nucleicos y las tecnologías de nanodiamante, hemos desarrollado una plataforma universal y simplificada basada en perlas paramagnéticas, denominada en la presente memoria SP3 (preparación de muestras mejorada en fase sólida en un solo recipiente). El SP3 se basa en la inmovilización imparcial de proteínas y péptidos en perlas funcionalizadas con carboxilato recubiertas con una superficie hidrófila. Las perlas utilizadas en SP3 están disponibles comercialmente y no requieren tratamiento previo en condiciones oxidantes, tales como con partículas de nanodiamantes. La inmovilización se promueve atrapando proteínas y péptidos en una capa acuosa de solvatación sobre la superficie de la perla hidrófila mediante el aumento de la concentración de aditivo orgánico en solución. Una vez en la superficie de la perla, las proteínas y los péptidos se pueden procesar y enjuagar en un formato flexible para eliminar los contaminantes, como los detergentes. utilizando SP3, demostramos con éxito que las proteínas pueden inmovilizarse en perlas paramagnéticas de forma imparcial en presencia de una variedad de compuestos, tales como detergentes (hasta un 10 % de SDS), agentes reductores (DDT y BME, $> 1 \text{ M}$), urea (8 M), y una variedad de otras sales y reguladores. La tolerancia frente a altas concentraciones de detergente en el regulador de unión, p. ej., hasta un 10 % de SDS, representa una ventaja significativa para el método de los nanodiamantes. Además, el método permite la unión de proteínas de un modo no selectivo, al contrario de los métodos comúnmente utilizados en donde solo absorben las proteínas que muestran ciertas propiedades (p. ej., proteínas de unión a la membrana). Las sustancias contaminantes se pueden eliminar enjuagando con una combinación de solventes orgánicos. Las proteínas purificadas se pueden eluir de las perlas mediante la adición de una solución acuosa y digerirse enzimáticamente directamente. Los péptidos resultantes se pueden utilizar en métodos de fraccionamiento posteriores basados en HPLC. Alternativamente, los péptidos se pueden volver a inmovilizar en las perlas paramagnéticas para la limpieza de la muestra antes del análisis de MS, eliminando de este modo las etapas comunes de manipulación de las muestras, como la rotaevaporación. Además, los péptidos inmovilizados se pueden fraccionar de las perlas e inyectar directamente en una MS, por lo tanto permite un verdadero flujo de trabajo proteómico de un solo tubo. Además de reducir las pérdidas de muestras al minimizar la manipulación y la transferencia de las muestras, el flujo de trabajo establecido también es rápido, ya que solo requiere 15 minutos cada uno para la limpieza de proteínas y péptidos y

otros 15 minutos para el fraccionamiento. Aprovechando la sensibilidad que ofrece este flujo de trabajo de un solo tubo, podemos realizar de manera eficaz una caracterización profunda del proteoma de grandes cantidades de muestras, pero también detectar con confianza más de 3000 proteínas únicas mediante MS, a partir de solo 1000 células HeLa intactas. Esta profundidad de cobertura representa una mejora de 10 veces de los resultados publicados actualmente y, al mismo tiempo, subraya la utilidad de este flujo de trabajo cuando se trata de aplicaciones donde hay cantidades limitadas de muestra disponibles. Por lo tanto, este flujo de trabajo representa un avance significativo en el análisis proteómico convencional, así como en las aplicaciones ultrasensibles que utilizan tipos de células raras o limitantes.

10 El documento US 2008/220532 A1 describe la separación de solutos cargados mediante cromatografía de interacción hidrofílica por repulsión electrostática.

El documento WO 2008/138916 A1 describe el aislamiento de péptidos y la plataforma proteómica.

15 Calvano C D y col. describen en Journal of Proteomics, vol. 71, n.º 3, 21 de agosto de 2008, en las páginas 304-317, la evaluación de los protocolos de enriquecimiento basados en lectinas y HILIC para la caracterización de las glicoproteínas séricas mediante espectrometría de masas.

20 Serena Di Palma y col. describen en Journal of Proteomics, vol. 75, n.º 13, 23 de abril de 2012, en las páginas 3791-3813 los avances recientes en la separación de péptidos mediante cromatografía líquida multidimensional para el análisis de proteomas.

US 6 649 419 B1 método y aparato para la manipulación de proteínas.

25 Yeh Chia-Hao y col. describe in Journal of Chromatography A, vol. 1224, 2012, en las páginas 70-78, el enriquecimiento selectivo de glucopéptidos en un solo tubo utilizando microperlas paramagnéticas recubiertas con material HILIC zwitteriónico.

Resumen de la invención

30 La presente invención se define mediante las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para unir polipéptidos de forma reversible a una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas, y en donde el método se lleva a cabo en un único tubo, que comprende la etapa de:

a) poner en contacto dicha fase sólida, una solución que contiene dichos polipéptidos y una solución de deshidratación y/o una solución de precipitación, en donde

40 (i) la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado de acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o

45 (ii) la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro, y combinaciones de los mismos,

en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato, y un resto de fosfato.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende:

(i) una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas, y en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto de ácido carboxílico, y

55 (ii) una solución de deshidratación que comprende un disolvente orgánico polar en donde dicho disolvente orgánico polar se selecciona de acetonitrilo, acetona y alcohol

(iii) una proteasa.

60 En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de

a. una fase sólida, y

65 b.

- i) una solución para la deshidratación; y/o
- (ii) una solución de precipitación, en donde

5 la fase sólida comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas que comprenden la superficie hidrófila, en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato y un resto de fosfato;

10 la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado entre acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o

la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro y combinaciones de los mismos;

15 para el análisis, la identificación, la caracterización, la cuantificación, la purificación, la concentración y/o la separación de polipéptidos llevados a cabo en un único tubo.

Lista de figuras

20 A continuación, se describe el contenido de las figuras comprendidas en esta especificación. En este contexto, consulte también la descripción detallada de la invención anterior y/o posterior.

Figura 1: Enriquecimiento de proteínas y péptidos con SP3.

25 Las mezclas de proteínas y péptidos se pueden unir, enjuagar, y eluir de manera eficiente utilizando perlas paramagnéticas en el protocolo SP3. (a) Flujo de trabajo de preparación de muestras del SP3. Las mezclas de proteínas se unen mezclándolas con perlas paramagnéticas y agregando una cantidad específica de ácido fórmico y acetonitrilo (concentración final del 50 % v/v). Después de la incubación, las proteínas unidas a las perlas se pueden enjuagar con soluciones orgánicas para eliminar contaminantes tales como los detergentes. Las proteínas purificadas se pueden eluir mediante la adición de una solución acuosa a la mezcla de perlas. Las mezclas de péptidos se pueden unir de la misma manera que las proteínas, utilizando un ajuste al 95 % (v/v) de acetonitrilo. Todas las etapas del protocolo SP3 se pueden llevar a cabo en un solo tubo con un conjunto individual de perlas. (b) gel SDS-PAGE que muestra la recuperación de una mezcla de proteínas que no se trató (Control) o se trató con SP3. Los números en la parte superior de los carriles representan la cantidad total de material de partida en microgramos. El gráfico de la derecha ilustra la superposición de densitometría de bandas entre los carriles control de 37,5 µg y SP3. (c) Cromatogramas de picos base del análisis de una mezcla de péptidos inyectada directamente (control) o tratada con SP3 antes de la inyección en la MS. (d) La identificación única de proteínas se superpone entre conjuntos de datos proteómicos detallados obtenidos de muestras tratadas con los protocolos SP3 o FASP.

Figura 2: Proteómica ultrasensible con SP3.

45 El SP3 es compatible con el análisis de tipos de células raras o limitantes. Se lisaron diferentes números de células HeLa (500000, 50000, 5000 y 1000) con SDS, se trataron con SP3 a nivel de proteínas y péptidos y se fraccionaron utilizando una fase inversa de pH alto en una HPLC, una fase inversa de pH alto en una StageTip, o como una inyección de una sola aplicación. (a) Cromatogramas de picos base para inyecciones de una sola aplicación en las diferentes cantidades de células, donde (A) es de 50.000, (B) es de 5000 y (C) es de 1000. (b) Estimaciones de abundancia de proteínas basadas en los valores del IBAQ. Con 5000 células y una inyección de una sola aplicación, en el análisis se toman muestras de proteínas de un amplio rango de abundancia de proteínas. (c) Recuperación y reproducibilidad únicas de péptidos para diferentes tipos de fraccionamiento y número de células. La intensidad del color indica el mayor porcentaje de superposición entre réplicas basadas en secuencias peptídicas únicas. Los números indicados en cada recuadro representan el porcentaje de superposición entre réplicas (arriba) y el número total de péptidos únicos identificados a partir de réplicas combinadas (abajo).

Figura 3: Unión de proteínas con el protocolo SP3.

55 Las proteínas pueden capturarse y enjuagarse de manera eficiente utilizando perlas paramagnéticas modificadas con carboxilato en el protocolo SP3. Se trataron alícuotas equivalentes de un lisado de células enteras de levadura (~10 µg de proteína total) en regulador que contenía SDS en condiciones ácidas (nanodiamantes), acetonitrilo (SP3) y sal (SPRI). Las proteínas recuperadas se digirieron y los péptidos resultantes se procesaron en una MS con trampa de iones HCT. (a) Cromatogramas de picos base de MS de lisados de levadura digeridos. Las mezclas de proteínas y perlas se acidificaron con ácido fórmico o se ajustaron volumétricamente a una concentración de acetonitrilo (ACN, por sus siglas en inglés) al 50 %. Las proteínas unidas se enjuagaron, recuperaron, digirieron, e inyectaron de manera equivalente en la MS. (b) Cromatogramas de picos base de MS de lisados de levadura ajustados volumétricamente al 50 % de ACN con o sin ácido fórmico, o tratados con ácido fórmico en presencia de una alta concentración de perlas. (c) Cromatogramas de picos base de MS de lisados de levadura tratados con alto contenido de sal (SPRI), ACN (SP3)

o con FASP. Se inyectaron cantidades equivalentes de péptidos recuperados basándose en la cantidad de material de partida. (d) Ejecuciones cromatográficas prolongadas de lisados de levadura tratados con el protocolo optimizado para la proteína SP3 (50 % de ACN con ácido fórmico) y FASP.

5 Figura 4: Unión de péptidos con el protocolo SP3.

Los péptidos pueden capturarse y enjuagarse de manera eficiente utilizando perlas paramagnéticas modificadas con carboxilato en el protocolo SP3. Se trataron alícuotas equivalentes de un lisado de células enteras de levadura digerido con tripsina y rLysC en condiciones ácidas (nanodiamantes), acetonitrilo (SP3) y sales (SPRI). Los péptidos recuperados se ejecutaron en una MS con trampa de iones HCT. (a) Cromatogramas de picos base de MS de lisados de levadura digeridos. Las mezclas de péptido-perla se acidificaron con ácido fórmico o se ajustaron volumétricamente a una concentración del 20 % o 95 % de acetonitrilo (ACN). Los péptidos unidos se enjuagaron, recuperaron e inyectaron de manera equivalente en la MS. (b) Cromatogramas de picos base de MS de péptidos ajustados volumétricamente al 95 % de ACN, al 90 % de ACN con ácido fórmico o tratados con ácido fórmico en presencia de una alta concentración de perlas. (c) Cromatogramas de picos base de MS de lisados de levadura tratados con alto contenido de sal (SPRI), ACN (SP3) o inyectados directamente sin tratamiento (sin SP3). (d) Ejecuciones cromatográficas prolongadas de réplicas de péptidos tratadas con el protocolo peptídico SP3 optimizado (95 % de ACN) o StageTips (Control).

20 Figura 5: El SP3 puede enriquecer proteínas en diversas condiciones.

Las proteínas pueden capturarse y enjuagarse de manera eficiente utilizando perlas paramagnéticas modificadas con carboxilato en el protocolo SP3, en solución concentrada o diluida, o en presencia de detergentes. Se utilizaron cantidades específicas de BSA reducida y alquilada en un regulador de SDS al 1 % para determinar la capacidad de unión. Se utilizaron alícuotas equivalentes de un lisado de células de levadura para determinar la recuperación en soluciones diluidas y en presencia de detergentes. (a) La BSA (10 µg o 100 µg) se combinó con una cantidad equivalente de perlas (1 µg) y se trató con SP3. La proteína recuperada se digirió y los péptidos resultantes se diluyeron para normalizar la concentración entre las muestras en función de la cantidad inicial original antes de la inyección en la MS. (b) Se trataron cantidades equivalentes de lisado de levadura con SP3 directamente o después de la dilución hasta un volumen total de 100 µL. Se inyectó un volumen equivalente de los péptidos recuperados a la MS. (c) El lisado de levadura que contenía un 1 % o un 10 % de SDS (v/v) se trató con SP3. Las mezclas se enjuagaron, se digirieron y se inyectaron de manera equivalente en la MS. (d) El lisado de levadura que contenía SDS al 1 % (v/v) o 1x regulador Laemmli se trató con SP3. Las mezclas se enjuagaron, se digirieron y se inyectaron de manera equivalente en la MS.

35 Figura 6: SP3 es equivalente a FASP para una proteómica profunda.

Se prepararon alícuotas duplicadas de un lisado de células enteras de levadura con SP3 o FASP antes de la digestión con tripsina y RlysC. Los péptidos se fraccionaron con cromatografía de fase inversa de alto pH y se analizaron mediante MS. (a) Métricas de identificación de proteínas y péptidos a partir de los datos de FASP y SP3. (b) Gráfico de dispersión de la identidad entre los porcentajes de cobertura asignados a las proteínas coincidentes en los datos de FASP y SP3. Los datos se representan en una escala logarítmica. (c) Gráfico de dispersión de la identidad entre los números de PSM asignados a proteínas coincidentes en los datos de FASP y SP3. Los datos se representan en una escala logarítmica.

45 Figura 7: Características de los péptidos SP3 y FASP.

No hay ningún sesgo observable en los péptidos identificados con SP3 cuando se comparan con los del enfoque FASP. Se prepararon alícuotas duplicadas de un lisado de células enteras de levadura con SP3 o FASP antes de la digestión con tripsina y RlysC. Los péptidos se fraccionaron con cromatografía de fase inversa de alto pH y se analizaron mediante MS. Los gráficos representan histogramas del estado de carga (a), la masa molecular (b), el punto isoelectrónico (c) y el índice GRAVY (d) de los péptidos únicos identificados de cada método. Las propiedades de los péptidos se determinaron utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy llamada desde un script de Python desarrollado internamente.

55 Figura 8: Etiquetado químico de péptidos con SP3.

El SP3 es compatible con el etiquetado químico de péptidos utilizando enfoques de dimetilo o TMT. Las digestiones equivalentes derivadas de un lisado de células enteras de levadura se trataron con un protocolo de etiquetado de dimetilo a TMT por triplicado. (a) El etiquetado químico se aplica directamente después de la limpieza de la proteína SP3 en el mismo tubo. La limpieza del péptido SP3 se realiza sin modificación y se eluye antes del análisis de MS. (b) La eficiencia de etiquetado de los métodos de dimetilo y TMT cuando se combinan con el SP3, medida por el número de péptidos identificados con (cuantificados) o sin (identificados) el etiquetado esperado en mediciones por triplicado. (c) Reproducibilidad del etiquetado medida por la desviación de un cambio de log2 veces de 0. Las digestiones replicadas de un lisado de levadura tratado con el protocolo SP3 se etiquetaron en una reacción TMT 6-plex. Las proporciones representan los cálculos del nivel de proteína determinados en el software PEAKS.

Figura 9: Fraccionamiento con SP3.

Los péptidos se pueden fraccionar directamente de las perlas de SP3 utilizando condiciones de estilo HILIC y ERLIC. Las digestiones equivalentes de un lisado de células enteras de levadura se trataron con el péptido SP3. Los péptidos se eluyeron de las perlas utilizando un gradiente de ACN a pH 3 (HILIC) o pH 10 (ERLIC). (a) El fraccionamiento con SP3 se aplica directamente después de la unión del péptido a las perlas. Los péptidos se eluyen mediante el enjuague gradual de las perlas con un gradiente de fase móvil. (b) Cromatogramas de picos base de fraccionamiento y pH alto y bajo. Los números en la parte superior derecha de los cromatogramas representan el número de la fracción, siendo 1 la primera etapa de elución. (c) Superposición entre fracciones, como lo indica el número de fracciones en las que un péptido se identifica con éxito. Los valores de las tablas representan el número de péptidos completamente exclusivos de la fracción enumerada en el formato: único para la fracción (*número total identificado*). (d) Número acumulado de péptidos únicos identificados mediante la combinación de cada fracción que comienza con 1. Los números totales en el círculo superior representan la suma de los péptidos identificados mediante la combinación de las cinco fracciones.

Figura 10: Características del fraccionamiento con SP3.

Los péptidos identificados después del fraccionamiento con SP3 se eluyeron basándose en las propiedades de HILIC o ERLIC. Las propiedades de los péptidos únicos identificados en cada fracción se determinaron utilizando la herramienta ProtParam de ExPASy llamada a partir de un script de Python desarrollado internamente. Los gráficos representan histogramas del estado de carga (a), la masa molecular (b), el punto isoelectrico (c) y el índice GRAVY (d). Las tablas de la derecha de cada gráfico muestran los valores medios de todos los péptidos identificados para cada fracción para la propiedad específica de interés.

Figura 11: Fraccionamiento ERLIC isocrático con SP3.

La elución de péptidos en un modo isocrático en condiciones de pH alto no es tan eficaz en el fraccionamiento de los péptidos en comparación con una elución en gradiente. Las digestiones equivalentes de un lisado de células enteras de levadura se trataron con el péptido SP3. Los péptidos se eluyeron de las perlas utilizando enjuagues repetidos de un ACN al 90 % con una solución de ácido fórmico 10 mM a pH 10. (a) La elución se realiza directamente después de la unión de los péptidos a las perlas en SP3, en 6 fracciones separadas, donde la etapa final es una elución con agua. (b) Cromatogramas de picos base del fraccionamiento en condiciones isocráticas. Los números en la parte superior derecha de los cromatogramas representan el número de la fracción, siendo 1 la primera etapa de elución. (c) Superposición entre fracciones, como lo indica el número de fracciones en las que un péptido se identifica con éxito. Se incluyen gráficos separados para ilustrar la alta superposición entre las fracciones 1 a 5 y la diferencia con la fracción 6 (elución con agua). (d) Tabla que muestra el número de péptidos completamente exclusivos de la fracción enumerada en el formato: exclusivo de la fracción (*número total identificado*). Además está el número acumulado de péptidos únicos identificados mediante la combinación de cada fracción que comienza con 1. Los números totales en el círculo superior representan la suma de los péptidos identificados mediante la combinación de las seis fracciones.

Figura 12: Materiales y productos químicos compatibles con SP3.

El SP3 se puede realizar en una amplia variedad de condiciones con perlas de diferentes fabricantes. (a) Análisis en gel SDS-PAGE teñido con Coomassie de un lisado de células de levadura (~ 50 ug de proteína) que no se trató (A), o que se preparó con perlas de carboxilato de dos fabricantes distintos: Ampure XP de Beckman Coulter (B) y PCR Clean de CleanNA (C y D). Las perlas CleanNa se utilizan en dos condiciones distintas, con polietilenglicol (C) como un agente de precipitación o sulfato de amonio (D). (b) Cromatogramas de picos base de MS a partir del análisis de alícuotas de un lisado de células de levadura con dos tipos de perlas de Sera-Mag. (c) Tabla de concentraciones compatibles con SP3 de reactivos comunes utilizados en estudios de proteómica. Se puede utilizar una amplia variedad de enjuagues en combinación con el SP3 para promover la eliminación de sustancias contaminantes (datos no mostrados).

Descripciones detalladas de la invención

Debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de cualquier otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

En caso de conflicto entre las definiciones o enseñanzas de tales referencias citadas y las definiciones o enseñanzas citadas en la presente especificación, el texto de la presente especificación no tiene prioridad.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas. Cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe

considerarse descrita por la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique de cualquier otro modo.

Definiciones

5 A continuación, se proporcionan algunas definiciones de los términos utilizados con frecuencia en esta especificación. Estos términos tendrán, en cada caso de su uso, en el resto de la especificación el significado definido y los significados preferidos, respectivamente.

10 Tal como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “a”, “una”, y “el” incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente de cualquier otro modo.

15 En el contexto de la presente invención, el término “péptido” se refiere a un polímero corto de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Tiene los mismos enlaces químicos (peptídicos) que las proteínas, pero por lo general es más corto. El péptido más corto es un “dipéptido” que consiste en dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. También puede haber tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, etc. Un péptido tiene un extremo amino y un extremo carboxilo, a menos que sea un péptido cíclico.

20 El término “polipéptido” se refiere a una única cadena lineal de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos y comprende preferiblemente al menos cinco aminoácidos. Un polipéptido puede ser una cadena o puede estar compuesto por más de una cadena, que se mantienen unidas mediante enlaces covalentes, p. ej., enlaces disulfuro y/o enlaces no covalentes. Los polipéptidos que pueden purificarse con el método de la invención tienen preferiblemente una longitud de al menos cinco aminoácidos, más preferiblemente una longitud de al menos 10 aminoácidos, 15 aminoácidos, 20 aminoácidos, 25 aminoácidos, 30 aminoácidos, 35 aminoácidos, 40 aminoácidos, 45 aminoácidos o 50 aminoácidos o más.

25 Tal como se utiliza en esta especificación, el término “fase sólida” se utiliza para referirse a la fase heteróloga en contacto con la solución que comprende polipéptidos. La fase sólida permite la inmovilización de las fracciones cargadas negativamente. Esto se puede efectuar proporcionando a la fase sólida grupos de acoplamiento que pueden formar enlaces covalentes con las fracciones hidrófilas que se van a unir. Preferiblemente, la fase sólida incluye partículas en fase sólida, como microperlas, micropartículas o microperlas. Se prefiere que estas partículas en fase sólida se caractericen por la uniformidad de tamaño, preferiblemente por un diámetro promedio en el intervalo de 0,5 a 1,5 μm , es decir, el diámetro promedio puede ser de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 μm . Preferiblemente, la fase sólida comprende, consiste o consiste esencialmente en vidrio o un polímero orgánico. Los polímeros orgánicos incluyen, pero no se limitan a, poliestireno, polimetilmetacrilato, polietileno, y homólogos de los mismos, acrilato de polimetilo, acrilato de polietilo, metacrilato de polimetilo, metacrilato de polietilo y homólogos de los mismos, polimetilmetacrilato modificado con carboxilato de polimetilmetacrilato y materiales de poliestireno y no estireno modificados con carboxilato.

30 La fase sólida también comprende una sustancia paramagnética, que permite la concentración de una fase sólida dispersa heterológamente en una solución polipeptídica mediante un campo magnético. Preferiblemente, tal sustancia magnética o paramagnética está ubicada en el centro de una partícula en fase sólida y no entra en contacto con la solución polipeptídica, p. ej., debido a una capa de polímero que cubre la sustancia magnética o paramagnética. Por lo tanto, las microperlas o micropartículas paramagnéticas son fases sólidas para su uso en el método o kit de la presente invención. Las partículas en fase sólida muestran preferiblemente estabilidad coloidal en la ausencia de un campo magnético. La fase sólida es, preferiblemente, estable en sistemas reguladores fisiológicos y de lisis en un amplio intervalo de pH. Se pueden sonicar y termociclar a altas temperaturas (> 90 °C), p. ej., con el propósito de la lisis celular.

35 El término “superficie hidrófila” se refiere a una superficie a la que los compuestos hidrófilos están unidos covalentemente o no covalentemente o que está formada por un polímero que tiene propiedades hidrófilas. Preferiblemente, el polímero con propiedades hidrófilas es un polímero orgánico, los polímeros preferidos son poliacrilamida, ácido poliacrílico, poliacrilimida, polielectrolitos, polietilenimina, polietilenglicol, polietileno, alcohol polivinílico, ácido polivinilpirrolidón, poliestirenosulfónico, copolímeros de estireno y ácido maleico, copolímero de vinilmetil éter málico, y ácido polivinilsulfónico. Los ejemplos preferidos de compuestos hidrófilos que están unidos a una superficie, preferiblemente una superficie de polímero orgánico, comprenden metacrilato de aminoetilo, carbohidratos, hidrato de cucurbita[n]uril, metacrilato de dimetilaminometilo, ácido fumárico, ácido maleico, ácido metacrílico, isopropilacrilamida, ácido itacónico, N-vinilcarbazol, ácido 4-pentenoico, polialquilenglicoldiamina, pirol, metacrilato de t-butilaminoetilo, ácido undecilénico, ácido vinilacético, y vinilpíridina.

40 El término “fracciones cargadas negativamente”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto orgánico o inorgánico. Preferiblemente, el compuesto orgánico o el compuesto inorgánico lleva al menos una carga negativa. Los ejemplos de compuestos orgánicos cargados negativamente incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, preferiblemente ácidos monocarboxílicos saturados alifáticos como el ácido acético; ácidos monocarboxílicos insaturados alifáticos como el ácido acrílico; ácidos dicarboxílicos saturados alifáticos como ácido oxálico, ácido succínico; ácidos tricarboxílicos saturados alifáticos como el ácido cítrico; ácidos dicarboxílicos alifáticos

insaturados como ácido fumárico, ácido maleico; ácidos carboxílicos aromáticos como el ácido benzoico, el ácido salicílico; ácidos carboxílicos heterocíclicos como el ácido nicotínico, el ácido pirrolidina-2-carboxílico; ácidos monocarboxílicos cíclicos insaturados alifáticos como el ácido abiético; ácidos grasos como el ácido araquidónico, el ácido linoleico o el ácido oleico. Además, las fracciones cargadas negativamente incluyen derivados de ácido carboxílico tales como ésteres, amidas, aminas, haluros, anhídridos, hidrazidas, ácidos tiocarbónicos, ácidos peroxycarbónicos, y ácidos hidroxámicos. Los compuestos inorgánicos cargados negativamente incluyen, pero no se limitan a, ácido de sílice y derivados del mismo, sulfato, nitrato, fosfato, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido sulfuroso, ácido nítrico, ácido bórico y sus derivados tales como ésteres, amidas, aminas, haluros, anhídridos, hidrazidas. Además, una o más fracciones cargadas negativamente pueden inmovilizarse en la superficie de la fase sólida mediante un enlazador. Esto proporciona una interacción mejorada entre las fracciones cargadas negativamente y los polipéptidos en la solución. Preferiblemente, la molécula enlazadora puede ser un carbohidrato C₁-C₂₀ lineal o ramificado, preferiblemente alquilo, alquenilo o alquinilo. EL resto cargado negativamente se puede sintetizar en una reacción de una etapa, pero también puede requerir etapas de reacción adicionales, p. ej., una etapa de acoplamiento.

En el contexto de la presente invención, se utiliza una “solución de precipitación” para referirse a una solución que contiene sales que tienen la capacidad de precipitar proteínas o polipéptidos. Una solución de precipitación comprende iones con alta fuerza iónica que incluyen, pero no se limitan a, amonio, potasio, sodio, litio, magnesio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro, nitrato, bromuro, cloruro, yoduro y perclorato y combinaciones de los mismos. Se prefiere particularmente una solución que comprende iones amonio. Los iones con alta fuerza iónica aumentan las interacciones hidrófobas entre proteínas o polipéptidos y, por lo tanto, cambian la solubilidad de tales polipéptidos o proteínas. Si la solución de precipitación que contiene sales en una concentración adecuada se expone a una solución que contiene proteínas o polipéptidos, comienza la formación de agregados y se forman proteínas y polipéptidos y precipitados (Current Protocols in Protein Science, 1997). La concentración de los iones con alta fuerza iónica en la solución de precipitación es tal que la concentración en la mezcla resultante con la solución de proteína es suficiente para precipitar las proteínas. El experto en la técnica entiende que la concentración final después de la mezcla es decisiva y, por lo tanto, la concentración inicial requerida se determinará por las cantidades relativas de la solución de precipitación y la solución polipeptídica mezcladas. En general, se prefiere utilizar soluciones de precipitación con una concentración tan alta de iones de alta fuerza iónica como sea posible para agregar el menor volumen posible a la solución polipeptídica. Por consiguiente, la concentración del ion de alta fuerza iónica comprendido en la solución de precipitación está cerca o en la concentración de saturación en condiciones de almacenamiento regulares, p. ej., entre 4 °C y 30 °C de la solución de precipitación. Las soluciones de precipitación preferidas comprenden sulfato de amonio al 10 % en peso.

El término “solución de deshidratación” se refiere a una solución capaz de deshidratar la solución polipeptídica mediante la unión a las moléculas de agua que hidratan los polipéptidos en la solución. Esta eliminación del agua conduce a la agregación/precipitación de los polipéptidos. Preferiblemente, la solución de deshidratación comprende, esencialmente comprende o consiste en un disolvente orgánico polar y/o un polímero higroscópico. Como se estableció anteriormente con respecto a la solución de precipitación, la concentración del disolvente orgánico polar y/o el polímero higroscópico se determina por la concentración requerida para promover la interacción entre los polipéptidos y la superficie de la perla después de mezclarlos con la solución polipeptídica y variará con las cantidades relativas mezcladas en el método de la invención. En general, se prefiere utilizar una solución de deshidratación con la cantidad máxima de disolvente orgánico polar y/o polímero higroscópico comprendido en la misma, lo que conducirá a una solución estable.

El término “disolvente orgánico polar”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa un carbohidrato que disuelve un soluto líquido, sólido o gaseoso químicamente diferente en una cierta cantidad, lo que da como resultado una solución que es soluble en un cierto volumen de disolvente a una temperatura específica y una constante dieléctrica (también denominada “permitividad relativa”) a 25 °C de al menos 6, preferiblemente de al menos 10. El disolvente orgánico polar es preferiblemente aprótico o prótico, más preferiblemente el disolvente orgánico polar es aprótico. Los ejemplos de disolventes apróticos polares incluyen, pero no se limitan a, acetona, tetrahydrofurano (THF), acetato de etilo, acetona, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), sulfóxido de dimetilo y carbonato de propileno, un disolvente aprótico particularmente preferido es el ACN. Los ejemplos de disolventes próticos polares incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y ácido fórmico.

El término “polímero higroscópico”, tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a un polímero de carbohidratos que es capaz de unirse a moléculas de agua mediante la interacción de van der Waals. Los ejemplos preferidos de polímeros higroscópicos comprenden polietilenglicol (PEG), polielectrolitos sintéticos, polielectrolitos semisintéticos, protaminas y polisacáridos de origen natural o no natural (Current Protocols in Protein Science, 1997). Mediante la unión de agua que solubiliza los polipéptidos en la solución, los polímeros higroscópicos conducen a un precipitado reversible de polipéptidos a ciertas concentraciones. Los ejemplos de polielectrolitos sintéticos incluyen, pero no se limitan a, ácido poliacrílico, polímeros vinílicos tales como poliacrilato (PAA), polimetacrilato (PMA), sales ácidas (polianiones), y polietilenimina (PEI). Los polielectrolitos semisintéticos incluyen, pero no se limitan a, carboximetilcelulosa (CMC), celulosa sulfatada, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), dietilaminoetilcelulosa (DEAE-C), y dextranos sulfatados. Los polisacáridos de origen natural incluyen, pero no se limitan a, glucógeno, sulfato de heparina, sulfato de condroitina, alginatos, quitina y ácido hialurónico.

El término “concentración de polipéptido”, tal como se utiliza en la presente solicitud, describe la cantidad de polipéptido utilizada para los estudios presentes en esta solicitud y típicamente se indica como ng por ml. La determinación de las proteínas o péptidos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica, que incluyen, p. ej., el ensayo de Bradford. En este ensayo de determinación de proteínas, la muestra de interés (que contiene la solución de proteína o polipéptidica) se mezcla con una solución de Coomassie-Brilliant-Blue y la absorción se mide a una longitud de onda de 595 nm.

El término “solución de lavado”, tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a una solución que elimina los compuestos no polipeptídicos de los polipéptidos unidos sin disolver sustancialmente los polipéptidos. Preferiblemente, la solución de lavado comprende, consiste esencialmente en o consiste en un disolvente orgánico polar o una sal que comprende al menos un ion que aumenta las interacciones hidrófilas de los polipéptidos. El disolvente orgánico polar es preferiblemente aprótico o prótico, más preferiblemente prótico. Los ejemplos de disolventes apróticos polares incluyen, pero no se limitan a, DCM, THF, acetato de etilo, acetona, DMF, ACN, DMSO, carbonato de propileno. Los ejemplos de disolventes próticos polares incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol y ácido fórmico. La sal que comprende iones con alta fuerza iónica incluye, pero no se limita a, amonio, potasio, sodio, litio, magnesio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro, nitrato, bromuro, cloruro, yoduro y perclorato y combinaciones de los mismos, preferiblemente el ion es amonio.

El término “desnaturalizante de proteínas” se utiliza en la presente solicitud para indicar un compuesto que es capaz de alterar la estructura terciaria y, dependiendo de la concentración, también la secundaria de un polipéptido nativo sin cambiar la estructura primaria del polipéptido. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, detergentes aniónicos que comprenden carboxilatos, sulfonatos y sulfatos, preferiblemente dodecilsulfato de sodio. (SDS); detergentes catiónicos que comprenden compuestos de amonio cuaternario como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); detergentes zwitteriónicos que comprenden combinaciones de compuestos de amonio cuaternario y carboxilatos; urea, sales de guanidinio, sales de ácidos biliares, como el colato o el desoxicolato (DOC).

El término “etiquetado”, tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a un método para unir un resto detectable a polipéptidos o introducir un resto detectable en los polipéptidos. Se prefieren las etiquetas, marcadores o las marcas que proporcionan la cuantificación de los polipéptidos etiquetados en el análisis de espectrometría de masas. El método de etiquetado de isótopos estables implica reemplazar átomos específicos de los polipéptidos, p. ej., C, O, N o S, por sus isótopos. Esto incluye, pero no se limita a, métodos como el etiquetado de isótopos estables mediante aminoácidos en cultivo celular (SILAC), el etiquetado con ¹⁸O catalizado por tripsina, el etiquetado de afinidad codificado por isótopos (ICAT) y las marcas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Un método común en el campo del etiquetado con isótopos estables es el etiquetado con dimetilo, que comprende un reactivo para la generación de una base de Schiff con una amina primaria, un agente reductor y un regulador adecuado. Otro método muy extendido se denomina etiquetado de masa en tándem (TMT), que comprende un reactivo etiquetado, un regulador adecuado, un disolvente orgánico, un reactivo desnaturalizante, un reactivo reductor, un reactivo alquilante, un reactivo de extinción y una proteasa.

Realizaciones

En los siguientes pasajes se definen diferentes aspectos de la invención con más detalle. En el trabajo que condujo a la presente invención, se demostró sorprendentemente que los polipéptidos pueden agregarse en una fase sólida que comprende una superficie hidrófila.

Basándose en estos resultados, la presente invención proporciona en un primer aspecto un método para unir polipéptidos de forma reversible a una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en micropérlas o micropartículas paramagnéticas y en donde el método se lleva a cabo en un único tubo, que comprende además la etapa de poner en contacto la fase sólida con una solución que contiene los polipéptidos y una solución de deshidratación y/o una solución de precipitación.

En un primer aspecto de la invención, la superficie hidrófila de la fase sólida comprende o consiste en un polímero que tiene propiedades hidrófilas, en donde la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado entre acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro y combinaciones de los mismos, en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato y un resto de fosfato. El término “hidrófilo” se utiliza para referirse a la tendencia de un compuesto a interactuar con o a disolverse en agua y otras sustancias polares. Preferiblemente, el polímero con propiedades hidrófilas es un polímero orgánico. Los polímeros preferidos son poliácridamida, ácido poliácrido, poliácridamida, polielectrolitos, polietilenimina, polietilenglicol, polietilénóxido, alcohol polivinílico, ácido polivinilpirrolidona poliestirenosulfónico, copolímeros de estireno y ácido maleico, copolímero de vinilmetil éter málico, y ácido polivinilsulfónico. Los ejemplos preferidos de compuestos hidrófilos que se unen a una superficie para formar una superficie hidrófila comprenden metacrilato de aminoetilo, carbohidratos, hidrato de cucurbita[n]uril, metacrilato de dimetilaminometilo, ácido fumárico, ácido maleico, ácido

metacrílico, isopropilacrilamida, ácido itacónico, N-vinilcarbazol, ácido 4-pentenoico, polialquilenglicoldiamina, pirrol, metacrilato de t-butilaminoetil, ácido undecilénico, ácido vinilacético, y vinilpirdidina

En una realización preferida de la presente invención, la sal o las sales se aplican a la solución de proteína a una concentración que conduce a una concentración que precipita el polipéptido en la mezcla resultante. Las sales preferidas son sulfato de amonio, cloruro de amonio y cloruro de sodio. En realización preferida adicional, la concentración de amonio, preferiblemente sulfato de amonio, en la composición final que comprende el polipéptido está en el intervalo de 1-95 % de solución saturada. La concentración final de sodio, preferiblemente cloruro de sodio, en la composición que comprende el polipéptido varía de 100 mM a 3 M, es decir, preferiblemente 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1 M, 1,2, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 o 3,0 M.

La solución que contiene dichos polipéptidos también puede comprender un detergente. Los detergentes se utilizan típicamente cuando se preparan soluciones de proteínas para mejorar la solubilización de proteínas, en particular proteínas lipófilas. Sin embargo, la presencia de detergentes frecuentemente interfiere con la absorción posterior de las proteínas y, por lo tanto, con las etapas de purificación. Por ejemplo, la absorción de proteínas en nanocristalitos de diamante funcionalizados en la superficie se ve afectada significativamente si las concentraciones de detergente en la solución de proteína superan el 0,5 % de SDS (véase, p. ej., Chen, W.-H. y col., 2006, Anal. Química. 78: 4228). La tolerancia frente a altas concentraciones de detergente en el regulador de unión es una ventaja adicional del método de la presente invención. Por lo tanto, se prefiere que la solución que contiene un detergente comprenda al menos 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 %, 10,0 % o más de detergente. Los detergentes preferidos que pueden incluirse en la solución que comprende las proteínas son detergentes iónicos, detergentes no iónicos o mezclas de los mismos. Los detergentes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en carboxilatos, sulfonatos, sulfatos, preferiblemente dodecilsulfato de sodio (SDS); detergentes catiónicos que comprenden compuestos de amonio cuaternario como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); detergentes zwitteriónicos que comprenden combinaciones de compuestos de amonio cuaternario y carboxilatos; urea, sales de guanidinio, sales de ácidos biliares, como el colato o el desoxicolato (DOC); y detergentes no iónicos que comprenden copolímeros en bloque de polioxipropileno-polioxi-etileno, p. ej. Pluronic o tetrapolios, o detergentes de polisorbato que comprenden polisorbato 20 (Tween® 20) o detergentes que comprenden polioxi-etileno y un grupo hidrófobo, p. ej. Triton X-100 o NP-40. Si Triton®-X100 está comprendido en la solución de proteína, se prefiere que la solución de unión comprenda más del 1,0 % de Triton®-X100, más preferiblemente más del 1,5 % de Triton®-X100, aún más preferiblemente del 2,0 % de Triton®-X100, más del 3,0 % de Triton®-X100, más del 4,0 % de Triton®-X100 y con la máxima preferencia del 5,0 % o más de Triton X-100. Si el NP-40 está comprendido en la solución de proteína, se prefiere que la solución de unión comprenda más del 1,0 % de NP-40, más preferiblemente más del 1,5 % de NP-40, aun con mayor preferencia más del 2,0 % de NP-40, más del 3,0 % de NP-40, más del 4,0 % de NP-40 y, lo más preferiblemente, el 5,0 % o más de NP-40. Si el DOC está comprendido en la solución de proteína, se prefiere que la solución de unión comprenda más del 0,2 % de DOC, más preferiblemente más del 0,4 % de DOC, aun con mayor preferencia más del 0,6 % de DOC, más del 0,8 % y con la máxima preferencia 1,0 % o más de DOC. Con la máxima preferencia, la solución de proteína utilizada en la etapa a) del método de la presente invención comprende más del 2,0 %, más preferiblemente más del 2,5 % de SDS, aun con mayor preferencia más del 3,0 % de SDS, más del 4 %, más del 5 %, más del 6 %, más del 7,0 %, más del 8,0 %, más del 9,0 % y con la máxima preferencia el 10 % o más de SDS.

Las propiedades de unión de las proteínas en la solución también dependerán del pH de la solución. Para una recuperación máxima, se debe utilizar un valor de pH de la solución de 3 para maximizar la hidrofilia de las proteínas y los péptidos tripticos. En los casos donde se desee el fraccionamiento fuera de las perlas, se debe utilizar un valor de pH de 10 para promover la repulsión electrostática de las perlas. Por lo tanto, se prefiere que la solución comprenda un regulador que mantenga el pH en el valor deseado, preferiblemente el pH de la solución sea 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10.

Preferiblemente, el disolvente orgánico polar se agrega a la composición a una concentración final del 60 % (v/v) para los polipéptidos, más preferiblemente a una concentración final del 40 % (v/v) e incluso más preferiblemente a una concentración final del 50 % (v/v). Preferiblemente, el disolvente orgánico polar se agrega a la composición a una concentración final del 90 % (v/v) para los péptidos, más preferiblemente a una concentración final del 95 % (v/v).

En una realización preferida adicional del primer aspecto de la invención, la solución de deshidratación comprende opcionalmente un polímero higroscópico, que se utiliza para la precipitación de proteínas o polipéptidos, preferiblemente polietilenglicol. Más preferiblemente, el polietilenglicol utilizado posee un peso molecular en el intervalo entre 4000 y 8000 Da. Se agrega a la composición para conducir a una concentración final en el intervalo del 1 al 30 %.

Una vez precipitados y/o unidos a la fase sólida, los polipéptidos precipitados y/o unidos al polipéptido se lavan una vez o más con soluciones de lavado adecuadas. Estas soluciones de lavado pueden ser idénticas o de diferentes composiciones. El lavado se lleva a cabo típicamente separando la fase sólida de la solución y retirando la solución lo más completamente posible y aplicando la solución de lavado a la fase sólida. Si la fase sólida comprende partículas sólidas, las partículas se resuspenden en la solución de lavado. Las soluciones de lavado pueden comprender los

componentes de la solución de proteína indicados anteriormente, p. ej., detergentes y sales, en concentraciones iguales o superiores a las indicadas anteriormente.

En una realización preferida de la presente invención, la “solución de lavado” es etanol. Más preferiblemente, se utiliza en una concentración final del 70 % (v/v) y acetonitrilo en una concentración final de hasta el 100 %.

En una realización en la que la solución de lavado comprende una sal, se prefiere que la concentración de sal en la solución de lavado varíe de 1 a 3 M, es decir, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0. Se prefiere particularmente que la sal sea cloruro de sodio, más preferiblemente cloruro de sodio de 2,0 a 2,5 M. Un aumento en la concentración de sal aumenta la solubilización de los contaminantes que pueden adherirse a las proteínas.

En una realización preferida adicional, la solución de lavado comprende un caótropro o una sal que comprende al menos un ion que aumenta la interacción hidrófoba de los polipéptidos, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1 M a 8 M, preferiblemente 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 u 8,0. En una realización en la que la solución de lavado comprende un caótropro, se prefiere que este caótropro sea urea. Las cantidades particularmente preferidas de urea comprendidas en la solución de lavado están entre los intervalos de 6 a 9 M, preferiblemente 8 M.

En una realización preferida adicional, la solución de lavado comprende opcionalmente un desnaturalizante de proteínas, un detergente o una sal, que ayudan a eliminar los componentes no polipeptídicos del precipitado polipeptídico. Dado que la mayoría de los desnaturalizantes y detergentes (p. ej., el SDS) son incompatibles con las digestiones enzimáticas y los análisis de MS posteriores, se prefiere que estos se eliminen antes de la elución o el uso posterior de los polipéptidos precipitados y/o unidos. Para ello, al menos la última etapa de lavado se lleva a cabo en ausencia de detergente y/o desnaturalizante para eliminar el desnaturalizante y/o detergente residual del precipitado. Aunque la ultrafiltración (FASP); Wisniewski, J.R. y col., 2009) o protocolos basados en perlas (Hengel, S.M. y col., 2012; Bereman, M.S. y col., 2011) son eficientes para eliminar los detergentes, tienen una flexibilidad mínima y requieren una manipulación significativa de las muestras (filtración, centrifugación, concentración), que reduce su eficiencia general. Por lo tanto, la presente invención proporciona una manera fácil de eliminar los desnaturalizantes y/o detergentes de los polipéptidos unidos de forma reversible. Por consiguiente, el protocolo de precipitación de la presente invención es compatible con el uso de un lisado celular que contiene SDS y la digestión de los polipéptidos eluidos y el posterior análisis de MS. El protocolo de precipitación de la presente invención conduce a una mayor eficacia en la recuperación de polipéptidos en comparación con los protocolos estándar para la eliminación de detergentes. Además, el método de la presente invención conduce a un aumento en la intensidad del péptido de MS, es decir, a una recuperación mejorada, y al número de proteínas identificadas.

La “solución de elución acuosa” utilizada en el contexto del método de la presente invención comprende agua en una cantidad que es suficiente para redissolver la mayoría de los polipéptidos precipitados y/o unidos, preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 % y aun con mayor preferencia al menos el 90 % de los polipéptidos precipitados y/o unidos. La solución acuosa de elución comprende preferiblemente agua y sales/ácidos/bases que proporcionan un sistema regulador tal como, pero sin limitarse a, solución salina regulada con fosfato (PBS), ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetasulfónico (HEPES), regulador a base de potasio (KCl), tris (hidroximetil) metilamina (TRIS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), citrato de sodio salino (SSC), N-tris(hidroximetil)metilglicina (tricina), ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino]propanosulfónico (TAPS), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (bicina), ácido 3-[N-Tris(hidroximetil) metilamino] -2-hidroxipropanosulfónico (TAPSO), ácido 2-[[tris(hidroximetil)metil]amino]etanosulfónico (TES), y ácido dimetilarsínico (cacodilato).

Se prefiere que el pH esté entre 5 y 10, preferiblemente 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10. Más preferiblemente, para una recuperación máxima, se debe utilizar un valor de pH de la solución de 8 para minimizar la hidrofilia de las proteínas y los péptidos para promover la elución.

En esta realización, se prefiere agregar una proteasa a la “solución de elución acuosa”, más preferiblemente tripsina o LysC. La adición de una proteasa permite la digestión de los polipéptidos en presencia de la fase sólida. Posteriormente, pueden precipitarse nuevamente y/o unirse por unión a la fase sólida, lo que permite otra etapa de purificación, p. ej., antes de someter las digestiones de polipéptidos a un análisis de MS. Para ello, la solución de deshidratación o precipitación descrita anteriormente se puede agregar a las perlas y a la solución de elución acuosa que contiene los polipéptidos digeridos.

Si se utilizan perlas magnéticas, las perlas pueden concentrarse con un campo magnético, enjuagarse y posteriormente eluirse tras la adición de la solución de elución acuosa. En este caso, todo el flujo de trabajo de purificación solo requiere 15 minutos, lo que representa una mejora significativa en el rendimiento en comparación con otros protocolos de flujo de trabajo establecidos (p. ej., FASP).

En una realización adicional del método de la invención, la solución de elución acuosa que contiene los polipéptidos (digeridos) puede someterse a espectrometría de masas para la identificación, caracterización, cuantificación, purificación, concentración y/o separación de los polipéptidos sin etapas adicionales de preparación de la muestra. Si

bien la obtención de una cobertura proteómica profunda y confiable sigue siendo un objetivo central en muchos análisis proteómicos, esta tarea es un desafío para las muestras donde se dispone de una cantidad limitada de material (Altelaar, A. y col., 2012). Estos análisis se complican por las pérdidas durante las etapas de manipulación de las muestras presentes en prácticamente todos los flujos de trabajo proteómicos. Dado que todo el método de la invención para el enriquecimiento de polipéptidos se puede realizar en un solo tubo sin etapas de filtrado, precipitación o resolubilización, facilita el análisis eficiente de muestras limitadas por células.

La alta recuperación de los polipéptidos hace que el método de la invención sea adecuado para estudios exhaustivos del proteoma mediante análisis comparativos con FASP. Además, no hubo ningún sesgo observable relacionado con el enriquecimiento de proteínas. Por lo tanto, el método de la presente invención es adecuado para la generación de muestras donde el análisis de MA puede producir una cobertura proteómica profunda y reproducible. Esto permite una caracterización y cuantificación del proteoma en profundidad incluso de tamaños de muestra pequeños, lo que promete que la invención puede encontrar su lugar en aplicaciones clínicas.

En una implementación adicional de la presente descripción, los polipéptidos se pueden etiquetar para el análisis de espectrometría de masas. Preferiblemente, el etiquetado se lleva a cabo después de que los polipéptidos se unan, laven y liberen de forma reversible, es decir, se purifiquen. Un método preferido de etiquetado es el etiquetado isotópico estable. Más preferiblemente, los reactivos de etiquetado se seleccionan del grupo que comprende componentes adecuados para el etiquetado con dimetilo, como un reactivo para la generación de una base de Schiff con una amina primaria, más preferiblemente una solución de formaldehído al 1 %; un agente reductor, más preferiblemente una solución de cianoborohidruro 155 mM; un regulador adecuado, más preferiblemente ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)-etansulfónico (HEPES) 50 mM, pH 8 con ácido desoxicólico (DOC) al 1 %. En otra realización preferida del sexto aspecto, los péptidos se tratan adicionalmente mediante etiquetado masivo en tándem que comprende un reactivo etiquetado, un regulador adecuado, preferiblemente un regulador de bicarbonato de trietilamonio en una concentración 1 M; un disolvente orgánico, preferiblemente acetonitrilo; un reactivo desnaturizante, preferiblemente una solución de SDS al 10 %; un reactivo reductor, preferiblemente tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP); un reactivo alquilante, preferiblemente yodoacetamida; un reactivo de extinción, preferiblemente una solución de hidroxilamina al 50 % y una proteasa, preferiblemente tripsina.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende:

(i) una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas y en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto de ácido carboxílico, y

(ii) una solución de deshidratación que comprende un disolvente orgánico polar, en donde dicho disolvente orgánico polar se selecciona entre acetonitrilo, acetona y alcohol, y

(iii) una proteasa.

En el contexto del segundo aspecto de la invención, todos los reactivos descritos en detalle anteriormente en el contexto del método de la presente invención también pueden incluirse en el kit de la presente invención.

En una realización preferida, el kit comprende además:

(i) reactivos para etiquetar polipéptidos, que incluyen preferiblemente componentes de etiquetado isotópico estables;

(ii) reactivos para eluir polipéptidos, preferiblemente reguladores acuosos;

(iii) reactivos para la digestión de polipéptidos, preferiblemente proteasas y detergentes;

(iv) reactivos adecuados para el fraccionamiento de polipéptidos;

(v) reactivos para determinar la concentración de proteínas;

(vi) reactivos adecuados para el enriquecimiento de glucopéptidos o fosfopéptidos, y/o

(vii) reactivos adecuados para la lisis celular.

En una implementación preferida de la descripción, los reactivos para etiquetar polipéptidos se seleccionan del grupo que consiste en:

(i) componentes adecuados para el etiquetado con dimetilo, preferiblemente un reactivo para la generación de una base de Schiff con una amina primaria, un agente reductor, un regulador adecuado y/o

(ii) componentes adecuados para el etiquetado químico de masa isobárica, preferiblemente un reactivo etiquetado, un regulador adecuado, un disolvente orgánico, un reactivo desnaturizante, un reactivo reductor, un reactivo alquilante, un reactivo de extinción y una proteasa y/o

5 (iii) componentes adecuados para el etiquetado químico codificado por neutrones.

En un tercer aspecto, la presente invención comprende el uso de

a. una fase sólida, y

b.

(i) una solución para la deshidratación; y/o

15 (ii) una solución de precipitación, en donde

la fase sólida comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas que comprenden la superficie hidrófila, en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato y un resto de fosfato, la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado entre acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro, y combinaciones de los mismos; para el análisis, la identificación, la caracterización, la cuantificación, la purificación, la concentración y/o la separación de polipéptidos realizados en un único tubo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la perla

En todos los experimentos con SP3 utilizamos perlas disponibles comercialmente que portan un resto carboxilato. Hemos probado y verificado los protocolos utilizados en este estudio con perlas de Beckman Coulter (Ampure XP, n.º de CAT A63880), CleanNA (Clean PCR, n.º de CAT CPCR1300), y Thermo Fisher (Sera-Mag Speed Beads, n.º de CAT 09-981-121, 09-981-123) (Figura complementaria 9). En todos los casos, las perlas tienen un diámetro promedio de 1 µm y están recubiertas con una superficie hidrófila. Para todos los experimentos de SP3 de este manuscrito se utiliza una combinación 1:1 de los dos tipos de perlas rápidas Sera-Mag. Las perlas se enjuagan con agua antes de su uso y se almacenan a 4 °C. Las rejillas magnéticas utilizadas en todos los experimentos se prepararon internamente.

Ejemplo 2: Cultivo celular.

La cepa de levadura YAL6B (MATa, his3Δ leu2Δ met15Δ lys1::KanMX6 arg4::KanMX4)¹ se cultivó en medio rico (YPD) para todos los experimentos. Los cultivos replicados se recolectaron a una densidad óptica (DO600) de ~ 0,8. Las células se recolectaron mediante centrifugación, se enjuagaron con PBS enfriado con hielo y se congelaron rápidamente hasta su uso. Las células HeLa Kyoto se cultivaron en DMEM con Glutamax suplementado con suero bovino fetal al 10 % y 1x con aminoácidos no esenciales. Las células se cultivaron a 37 °C en un ambiente de CO₂ al 5 %. Las células se recolectaron mediante incubación con una solución de tripsina-EDTA al 0,05 % y se centrifugaron. Las células recuperadas se enjuagaron y se contaron antes de dividir las en alícuotas hasta el número de células deseado por tubo. Los recuentos celulares aproximados se adquirieron utilizando un hemocitómetro. Los sedimentos de células siempre se lisaron directamente sin congelación instantánea. Todos los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies a menos que se indique de cualquier otro modo.

Ejemplo 3: Preparación de muestras y FASP (protocolo de separación asistida por filtro)

Los sedimentos de células de levadura congeladas se lisaron utilizando una combinación de enfoques de disrupción mecánicos y basados en soluciones. El regulador de lisis estaba compuesto por SDS al 1 % (Bio-Rad), ditiotretol (DTT) (Bio-Rad) 5 mM, 1x cóctel completo de inhibidores de proteasa (EDTA) (Roche), preparado en regulador HEPES 50 mM a pH 8,5 (Sigma). Se combinó un sedimento equivalente a 50 ml de - 0,8 células OD 600 con 500 µl de regulador de lisis en un tubo con tapón de rosca de 2 ml que contenía un equivalente de 500 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido (Sigma, 425 a 600 µm, n.º de CAT G8772). Los tubos se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y posteriormente se colocaron en hielo durante 5 minutos. Los tubos se agitaron vigorosamente en un instrumento Fast-Prep (MP Biomedical) durante 45 segundos a velocidad 5. Después, los viales se sonicaron en un Bioruptor (Diagenode) durante 15 ciclos (30 segundos encendidos, 30 segundos apagados) en la configuración "alta" con un enfriamiento ajustado a 4 °C. Los lisados se recuperaron después en tubos de 2 ml perforando el fondo del tubo con tapón de rosca con una jeringa calentada y centrifugando durante 1 minuto a 3000 g. Los restos celulares se sedimentaron con centrifugación adicional a 15.000 g durante 10 minutos. Los lisados recuperados se almacenaron a

-80 °C hasta su uso. Las células HeLa se lisaron utilizando un procedimiento basado en solución sin interrupción mecánica. Un número específico de células recolectadas se diluyó en solución salina regulada con fosfato (PBS) de tal modo que la concentración no superara las 25.000 células en 5 µl. El regulador de lisis estaba compuesto por SDS al 1 % (Bio-Rad), 1x cóctel completo de inhibidores de proteasa EDTA (Roche), preparado en regulador HEPES 50 mM a pH 8,5 (Sigma). La lisis se indujo mediante la adición de un volumen igual de regulador de lisis. Las mezclas se calentaron durante 5 minutos a 95 °C y posteriormente se colocaron en hielo durante 5 minutos. A cada tubo, se agregaron 25 unidades de nucleasa benzonasa (Novagen, n.º de CAT 70664) por cada 500.000 células para degradar la cromatina. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en un termociclador. Este es una etapa crítica en el protocolo de lisis, ya que el exceso de cromatina en el lisado interrumpirá el protocolo SP3. Las proteínas en las soluciones de levadura, HeLa y drosophila se redujeron mediante la adición de 5 µl de DTT 200 mM (Bio-Rad) por 100 µl de lisado. Los tubos se incubaron a 45 °C durante 30 minutos en un termociclador para facilitar la reducción del disulfuro. La alquilación se realizó mediante la adición de 10 [µM] I de yodoacetamida (IAA) 400 mM por cada 100 [µM] I de lisado. Los tubos se incubaron a 24 °C en la oscuridad durante 30 minutos en un termociclador. Las reacciones se interrumpieron mediante la adición de 10 [µM] I de DTT 200 mM por cada 100 [µM] I de lisado. La FASP se llevó a cabo como se describió anteriormente con modificaciones menores (Wisniewski, J., Zougman, A., Nagaraj, N. y Mann, M. Método universal de preparación de muestras para el análisis de proteomas. *Nat. Métodos* 6, 3 - 7, 2009). Brevemente, cada mezcla de proteínas reducidas y alquiladas se diluyó hasta un volumen final de 30 µl con HEPES 50 mM a pH 8. A esto, se agregaron 200 µl de urea 8 M a la muestra de proteína y se centrifugaron en filtros de corte de peso molecular Vivacon (Sartorius) de 30 kDa durante 10 minutos a 14.000 g. Esta etapa se repitió 3 veces más. Después, los filtros se enjuagaron 3 veces con 100 µl de HEPES 50 mM, pH 8, mediante centrifugación. La proteólisis se llevó a cabo durante la noche en un filtro en una cámara húmeda a 37 °C con una mezcla de tripsina de Rlysc en una proporción de enzima a sustrato de 1:25. Los péptidos se eluyeron con enjuagues secuenciales de HEPES 50 mM (2 veces) y NaCl 200 mM (1 vez). Los péptidos eluidos se desalaron utilizando SepPaks (Waters) antes del análisis de MS.

Ejemplo 4: Optimización de SP3: Proteínas

La mezcla de perlas Sera-Mag SP3 que se había enjuagado se diluyó hasta una concentración de trabajo final de 10 µg/µl. A cada mezcla de proteínas a tratar, se agregaron 2 µl de esta mezcla de perlas y se mezclaron para generar una solución homogénea. En los métodos de optimización donde se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), se preparó una solución madre de 50 mg/ml en SDS al 1 % (Bio-Rad), 1 x cóctel completo de inhibidores de proteasa (EDTA) (Roche), preparado en regulador HEPES 50 mM a pH 8,5 (Sigma). La BSA se calentó a 95 °C durante 5 minutos, se colocó en hielo, se redujo con DTT y se alquiló con IAA como anteriormente. En los métodos de optimización donde se utilizó el lisado de células enteras de levadura, se utilizaron 5 µl (~10 µg de proteína) de la mezcla reducida y alquilada en todos los casos. Para determinar las condiciones óptimas para la unión a proteínas, el lisado de células enteras de levadura se trató con una variedad de condiciones. En las muestras de control, se procesaron cantidades equivalentes de lisado directamente con SDS-PAGE o se trataron con FASP. Para determinar el entorno óptimo para la unión, el lisado de levadura (~10 µg de proteína) se mezcló con 2 µl de un stock de perlas de 10 µg/µl y se trató con una de las siguientes condiciones: 1. Se agregó un volumen igual de una solución de ácido fórmico al 5 % para acidificar la mezcla (condiciones de nanodiamantes), 2. Se agregó un volumen predeterminado de acetonitrilo al 100 % para lograr una solución porcentual final específica, 3. Se agregó un pequeño volumen de ácido fórmico al 5 % en combinación con un volumen predeterminado de acetonitrilo al 100 % para lograr una solución porcentual final específica, 4. Se agregó un volumen equivalente de una solución de NaCl 2,5 M y sulfato de amonio al 20 % (condiciones SPRI). Las condiciones de enjuague en el SP3 son las mismas que las que se describen a continuación. En las condiciones 2 y 3, se debe alcanzar una concentración específica de acetonitrilo. Para determinar estos niveles, se probó la recuperación del lisado de levadura en un intervalo de concentraciones de acetonitrilo (del 20 al 95 %). Como resultado de la recuperación en estos experimentos, las proteínas eluidas de las perlas se digirieron directamente y se procesaron en MS. La intensidad de la señal y la complejidad entre las ejecuciones se compararon para determinar el porcentaje óptimo de acetonitrilo. Estas curvas se completaron tanto en presencia como en ausencia de ácido fórmico (datos no mostrados). Se encontró que una concentración final del 50 % de acetonitrilo en condiciones ácidas proporcionaba la recuperación más alta y reproducible. Para determinar la capacidad de unión, se preparó 1 µg de perlas de una solución madre de 10 µg/µl con 1 µg, 100 µg, 200 µg y 400 µg de BSA reducida y alquilada en SDS que contenía regulador de lisis. Las mezclas se trataron con SP3 utilizando acetonitrilo al 50 % en condiciones ácidas. La proteína recuperada se digirió y los péptidos resultantes se diluyeron de tal modo que la concentración fuera igual en función de la cantidad inicial de BSA. La recuperación se midió utilizando la intensidad de MS y la coincidencia de picos entre las muestras. Para probar la unión en presencia de sustancias contaminantes, se utilizaron lisados de levadura reducidos y alquilados. Antes del tratamiento con SP3, los lisados se enriquecieron con la sustancia contaminante específica (p. ej., SDS al 10 %). Las proteínas recuperadas se digirieron y los péptidos resultantes se inyectaron en MS. La recuperación se comparó utilizando la intensidad de MS y la complejidad del cromatograma entre las muestras.

Ejemplo 5: Protocolo SP3: Proteínas

La mezcla de perlas Sera-Mag SP3 que se había enjuagado se diluyó hasta una concentración de trabajo final de 10 µg/µl. A cada mezcla de proteínas a tratar, se agregaron 2 ml de esta mezcla de perlas y se mezclaron para generar una solución homogénea. A menos que se indique de cualquier otro modo, las mezclas de proteínas se ajustaron a

acetónitrilo al 50 % en condiciones ácidas en todas las muestras. Las soluciones de perlas y proteínas se mezclaron para garantizar una distribución homogénea de las perlas y se incubaron durante un total de 8 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, los tubos se colocaron en una rejilla magnética durante 2 minutos. Mientras estaba en el imán, el sobrenadante se retiró y se desechó. Las perlas se enjuagaron mediante la adición de 200 ml de etanol absoluto al 70 %. Esta etapa se repitió una vez más, y en ambos casos se desechó el etanol. Después, las perlas se enjuagaron una vez más con 180 μ l de acetónitrilo al 100 % y se desechó el sobrenadante. Todos los enjuagues se llevaron a cabo en la rejilla magnética. Las perlas enjuagadas se reconstituyeron en regulador acuoso para eluir las proteínas que dependían del experimento posterior.

Ejemplo 6: Optimización de SP3: Péptidos

La mezcla de perlas Sera-Mag SP3 que se había enjuagado se diluyó hasta una concentración de trabajo final de 10 μ g/ μ l. A cada mezcla de péptidos a tratar, se agregaron 2 ml de esta mezcla de perlas y se mezclaron para generar una solución homogénea. Para determinar las condiciones óptimas para la unión a las proteínas, se trataron alícuotas de las derivadas de una sola digestión del lisado de células enteras de levadura con una variedad de condiciones. En las muestras de control, se procesaron cantidades equivalentes de lisado directamente con SDS-PAGE o se trataron con FASP. Para determinar el entorno óptimo para la unión, los péptidos de levadura (~1 μ g de péptido) se mezclaron con 2 μ l de un stock de perlas de 10 μ g/ μ l y se trataron con una de las siguientes condiciones: 1. Se agregó un volumen igual de una solución de ácido fórmico al 5 % para acidificar la mezcla (condiciones de nanodiamantes), 2. Se agregó un volumen predeterminado de acetónitrilo al 100 % para lograr una solución porcentual final específica, 3. Se agregó un pequeño volumen de ácido fórmico al 5 % en combinación con un volumen predeterminado de acetónitrilo al 100 % para lograr una solución porcentual final específica, 4. Se agregó un volumen equivalente de una solución de NaCl 2,5 M y sulfato de amonio al 20 % (condiciones SPRI). Las condiciones de enjuague en el SP3 son las mismas que las que se describen a continuación. En las condiciones 2 y 3, se debe alcanzar una concentración específica de acetónitrilo. Para determinar estos niveles, se probó la recuperación de la mezcla de péptidos en un intervalo de concentraciones de acetónitrilo (del 20 al 95 %). A medida que se leía la recuperación, los péptidos eluidos de las perlas después del tratamiento se procesaron directamente en MS. La intensidad de la señal y la complejidad entre las ejecuciones se compararon para determinar el porcentaje óptimo de acetónitrilo. Estas curvas se completaron tanto en presencia como en ausencia de ácido fórmico (datos no mostrados). Se encontró que una concentración final del 95 % de acetónitrilo en condiciones de pH neutro proporcionaba la recuperación más alta y reproducible.

Ejemplo 7: Protocolo SP3: Péptidos.

Las soluciones de péptido-perla se mezclaron para volver a suspender las perlas que se habían sedimentado durante el procedimiento de digestión. A cada tubo, se agregó acetónitrilo al 100 % para lograr una concentración final > 95 % (p. ej., 5 μ l de proteína digerida, 195 μ l de acetónitrilo al 100 %). Las mezclas se incubaron durante 8 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se colocaron en una rejilla magnética durante 2 minutos más. El sobrenadante se desechó y las perlas se enjuagaron una vez con 180 μ l de acetónitrilo al 100 %. Las perlas enjuagadas se reconstituyeron para eluir los péptidos en un volumen de DMSO al 4 % apto para el análisis de MS. Las mezclas se mezclaron con pipeta y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se colocaron en una rejilla magnética y se recuperaron los péptidos eluidos. Antes del análisis con MS, las soluciones de péptidos se acidificaron con ácido fórmico.

Ejemplo 8: Etiquetado de dimetilo SP3.

Se prepararon soluciones de trabajo de formaldehído al 1 % (Thermo Scientific) y cianoborohidruro de sodio 155 mM (Sigma) en agua. Las soluciones peptídicas derivadas de las digestiones con SP3 estaban contenidas típicamente en un volumen total de 5 μ l de regulador de digestión. A cada tubo, se agregó 1 μ l de formaldehído al 1 % (ligero). Además, se agregó 1 μ l adicional de cianoborohidruro de sodio 155 mM y se mezcló con una pipeta de reacción. Las reacciones de etiquetado se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las reacciones se interrumpieron mediante la adición de 1 μ l de una mezcla de lisina 10 mM (Sigma) y 50 mM de bicarbonato de amonio (Sigma). Los péptidos etiquetados se trataron directamente con la limpieza del péptido SP3 antes del análisis de MS.

Ejemplo 9: Etiquetado TMT SP3.

Los kits de etiquetado TMT se obtuvieron de Thermo Scientific. Cada etiqueta de TMT (0,8 mg por vial) se reconstituyó en 40 μ l de acetónitrilo. Las soluciones peptídicas derivadas de las digestiones con SP3 estaban contenidas típicamente en un volumen total de 5 μ l de regulador de digestión. Las reacciones de etiquetado se llevaron a cabo mediante la adición de 20 μ g de etiquetado TMT por cada 10 μ g de péptido en dos etapas volumétricamente iguales de 1 μ g, con 30 minutos de diferencia. Las reacciones de etiquetado con TMT se llevaron a cabo en la cremallera magnética en todo momento para evitar posibles interacciones entre los péptidos y las perlas debido a la adición de acetónitrilo. Las reacciones se interrumpieron mediante la adición de 1 ml de una mezcla de lisina 10 mM (Sigma) y 50 mM de bicarbonato de amonio (Sigma). Los péptidos etiquetados se trataron directamente con la limpieza del péptido SP3 antes del análisis de MS.

Ejemplo 10: Fraccionamiento de fase inversa de alto pH.

El análisis de fase inversa de alto pH se realizó en un sistema de HPLC Agilent 1200 equipado con un detector de longitud de onda variable (254 nm) o en StageTips. En la HPLC, el fraccionamiento se realizó en una columna XBridge BEH C18 (1 x 100 mm, 3,5 μ m, 130 Å, Waters). La elución se realizó a una velocidad de flujo de 0,1 ml por minuto utilizando un gradiente de fase móvil A (formiato de amonio 20 mM, pH 10) y B (acetonitrilo), del 1 % al 37,5 % durante 61 minutos. Las fracciones se recogieron cada 2 minutos a lo largo de toda la longitud del gradiente y se concatenaron en 10 muestras finales como se describió anteriormente (Yang, F. & Shen, Y. y col., 2012). Las fracciones se secaron en una centrífuga SpeedVac y se reconstituyeron en ácido fórmico al 0,1 % antes del análisis de MS. Para el fraccionamiento StageTip, las puntas se enjuagaron 2 veces con metanol al 100 % y 2 veces con formiato de amonio 20 mM (pH 10) antes de cargar la muestra. Las fracciones se eluyeron por etapas a concentraciones de acetonitrilo del 11,1 %, 14,5 %, 17,4 %, 20,8 % y 85 % en formiato de amonio 20 mM (pH 10). Las fracciones 1 y 5 se combinaron antes del análisis. Cada fracción se secó en un SpeedVac y se reconstituyó en ácido fórmico al 0,1 % antes del análisis de MS.

Ejemplo 11: Análisis de espectrometría de masas.

Para la optimización del protocolo SP3, las muestras se procesaron en una trampa de alta capacidad (HCT, por sus siglas en inglés) Ultra Ion Trap MS (Bruker Daltonics). Los espectros MS de escaneo completo se adquirieron con un rango de masa de 350 a 1500 m/z en modo perfil. El tiempo máximo de llenado se estableció en 200 milisegundos con un valor objetivo de 2e5. Los espectros de Fragment-MS se adquirieron en el rango de masas de 100 a 2000 m/z con un tiempo de llenado máximo de 30 milisegundos. Todos los datos del HCT se procesaron manualmente sin conexión utilizando scripts internos. Para el análisis utilizando el QExActive MS (Thermo Scientific) con fragmentación por disociación por colisión (HCD, por sus siglas en inglés) de mayor energía, las muestras se introdujeron utilizando un sistema Ultimate 3000 LC (Dionex). Los péptidos inyectados quedaron atrapados en columnas PepMap C18 de Acclaim (75 μ m x 20 mm, 3 μ m, 100 Å, Dionex). Después la captura, la elución en gradiente de los péptidos se realizó en una columna C18 (Reprosil-Pur, Dr. Maisch, con un tamaño de partícula de 3 μ m) empaquetada internamente en capilares de 100 μ m de diámetro interno, donde se tiró de un extremo con un extractor láser para que funcionara como nano-emisor. La elución se realizó con un gradiente de fase móvil A (99,9 % de agua y 0,1 % de ácido fórmico) a 25 % de B (99,9 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico) durante 50 minutos, y a 40 % de B durante 15 minutos, para una duración final de 90 minutos. Alternativamente, el gradiente se incrementó hasta un 25 % de B durante 100 minutos, y un 40 % de B durante 24 minutos, durante una duración final de 145 minutos. Para las muestras etiquetadas con TMT, el gradiente se ajustó para alcanzar una concentración del 27 % de fase móvil B en la etapa de 100 minutos. La adquisición de datos en el QExActive MS se llevó a cabo utilizando un método dependiente de los datos. Los 12 precursores principales se seleccionaron para el análisis en tándem-MS/MS (MS2) después de la fragmentación del HCD. Los escaneos topográficos que cubrían un rango de masa de 300 a 1600 se adquirieron con una resolución de 35.000 (a m/z 200), con un tiempo de llenado máximo de 30 milisegundos, y un valor objetivo de control automático de ganancia (AGC, por sus siglas en inglés) de 1e6. Los escaneos MS2 se adquirieron con una resolución de 17.500 (a m/z 200), con un tiempo de llenado máximo de 200 milisegundos, y un valor objetivo de AGC de 5e4. En todos los experimentos se aplicó una ventana de aislamiento de 2,0 m/z con una primera masa fija de 110,0 m/z. La fragmentación del HCD se indujo con una energía de colisión normalizada (NCE, por sus siglas en inglés) de 25 para las muestras no etiquetadas y de 33 para los péptidos TMT. La proporción de llenado insuficiente se estableció en el 40 % para lograr un umbral de intensidad de 1e5. La exclusión dinámica se configuró para excluir los precursores previamente seleccionados durante un total de 30 o 60 segundos, dependiendo de la longitud del gradiente. La exclusión del estado de carga se configuró para ignorar los cargos no asignados, de 1, 5 a 8, y >8. Se habilitó la exclusión de isótopos y se deshabilitó la coincidencia de péptidos. Todos los datos se adquirieron en modo perfil. Los experimentos que implicaban el análisis de cantidades limitadas de material (HeLa y drosophila) se llevaron a cabo en un sistema Orbitrap Velos Pro MS (Thermo Scientific) equipado con un sistema de cromatografía líquida NanoAcquity (Waters). Los péptidos inyectados quedaron atrapados en columnas Symmetry C18 (180 μ m x 20 mm). Después del atrapamiento, la elución en gradiente de los péptidos se realizó en una columna C18 (NanoAcquity BEH130 C18, 75 μ m x 200 mm, 1,7 μ m). Para las muestras de una sola aplicación donde se usó un análisis prolongado, la elución se realizó con un gradiente de fase móvil A (99,9 % de agua y 0,1 % de ácido fórmico) hasta 25 % de B (99,9 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico) durante 190 minutos, y hasta 40 % de B durante 40 minutos, durante una duración final de 265 minutos. Para las muestras fraccionadas con fase inversa de pH alto, se utilizaron ejecuciones de gradiente de 145 minutos, como se ha descrito anteriormente. La adquisición de datos en el Orbitrap Velos Pro MS se llevó a cabo utilizando un método dependiente de los datos. Los 15 principales precursores se seleccionaron para el análisis de la MS2 después de la fragmentación inducida por colisiones (CID, por sus siglas en inglés). Los escaneos topográficos que cubrían el intervalo de masa de 300 a 1500 se adquirieron con una resolución de 30.000 (a m/z 400) con un tiempo de llenado máximo de 500 milisegundos y un valor objetivo de AGC de 1e6. Los escaneos MS2 se adquirieron con una resolución de 7500 (a m/z 400) con un tiempo de llenado máximo de 50 milisegundos y un valor objetivo de AGC de 1e4 con una ventana de aislamiento de 2,0 m/z. La fragmentación del CID se indujo con una NCE de 40, un tiempo de activación de 10 milisegundos, y una Q de activación de 0,250. La exclusión dinámica se configuró para excluir los precursores previamente seleccionados durante un total de 6 a 90 segundos, dependiendo de la longitud del gradiente. La exclusión del estado de carga se configuró para ignorar los cargos no asignados, 1 y 4 y superiores. Los datos de la MS 1 se adquirieron en modo perfil, mientras que los de la MS2 se obtuvieron en formato centroide.

Ejemplo 12: Análisis de datos proteómicos

Los datos dependientes de los datos se analizaron utilizando el software PEAKS (ver. 7) (soluciones bioinformáticas) o MaxQuant (ver. 1.4.1.2). Con PEAKS, los datos sin procesar se importaron y refinaron mediante los siguientes ajustes: Fusión de escaneos - verdadero, ventana de tiempo de retención - 1 minuto, tolerancia m/z del precursor - 5 ppm, precursor correcto - verdadero, solo en masa, escaneos de filtro: -verdadero, valor de calidad superior a 0,65. Los datos se secuenciaron *de novo* utilizando ventanas de tolerancia de masa de precursores y fragmentos de 20 ppm y 0,06 dalton, respectivamente, para los datos de QExActive. Con el Orbitrap Velos Pro MS, se utilizaron ventanas de tolerancia de 20 ppm y 0,6 dalton para la masa de precursores y fragmentos. En ambos casos, la especificidad enzimática se estableció como tripsina, con la carbamidometilación como una modificación fija y la oxidación de la metionina como una modificación variable. La modificación postraduccion variable (PTM, por sus siglas en inglés) máxima permitida por péptido se estableció en 3, con hasta 5 candidatos reportados por espectro. Las búsquedas en la base de datos PEAKS se realizaron utilizando las mismas tolerancias de masa de precursores y fragmentos que con la secuenciación *de novo*. La especificidad enzimática se estableció como tripsina, con 2 escisiones omitidas permitidas y una escisión no específica en un extremo del péptido. Las modificaciones fueron como en la secuenciación *de novo*, con 5 PTM variables por péptido. La identificación y cuantificación se realizaron en MaxQuant (Cox, J. y Mann, M. MaxQuant permite altas tasas de identificación de péptidos, precisiones de masa individualizadas en el rango de p.p.b.) y cuantificación de proteínas en todo el proteoma, Nat. Biotechnol. 26, 1367-72, 2008). Los datos sin procesar se buscaron utilizando una tolerancia inicial de 20 ppm y, posteriormente, se volvieron a buscar a 6 ppm tras la recalibración. En todas las búsquedas se utilizó una tolerancia a los iones de fragmentos de 20 ppm. Los datos se buscaron utilizando el motor Andrómeda integrado en MaxQuant (Cox, J. y col. Andrómeda: un buscador de péptidos integrado en el entorno MaxQuant. J. Proteome Res. 10, 1794-805, 2011). La carbamidometilación de la cisteína se especificó como una modificación fija, con la oxidación de la metionina y la acetilación del extremo N de la proteína como variables. En las búsquedas con muestras etiquetadas con TMT y dimetilo, se especificaron modificaciones variables del extremo N y la lisina para masas de +28,0313 (dimetilo) y +229,1629 (TMT). En las muestras que requerían cuantificación, se habilitó la recuantificación. Se habilitó la coincidencia entre ejecuciones en todas las búsquedas con ventanas de coincidencia y tiempo especificadas de 2 y 20 minutos, respectivamente. Las bases de datos buscadas eran proteomas completos que incluían isoformas de UniProt (Human: 88933, Drosophila: 41509, levadura: 6767 secuencias en total). Se adjuntó a todas las bases de datos una lista de contaminantes comunes (CrAP, The GPM). La tasa de error se estimó utilizando una estrategia de base de datos concatenada de objetivo y señuelo en PEAKS y una base de datos invertida en MaxQuant. Los datos se filtraron hasta una tasa máxima de falsos descubrimientos de 0,01 para proteínas y péptidos. Se requirió que cada proteína estuviera emparejada por un mínimo de 2 péptidos únicos. Los conjuntos de datos resultantes se exportaron y analizaron con una combinación de scripts creados en Python y R diseñados internamente.

Referencias

1. Lamond, A. I. y col., Molecular & Cellular Proteomics, 11 (3) (2012).
- 5 2. Smith. L.M. y col., Nature Methods, 10 (3): 186-187 (2013).
3. Yates, J.R. y col., Annual review of biomedical engineering, 11:49-79 (2009).
- 10 4. Geier, T. y col., Molecular & Cellular Proteomics, 11 (3) (2012).
5. Nagaraj, N. y col., Molecular & Cellular Proteomics, 11(3) (2012).
6. Zhou, F. y col., Nature Communications, 4, (2013).
- 15 7. Wisniewski, J.R. y col., Nature methods 6 (5) 359-362 (2009).
8. Hengel, S.M. y col., Proteomics 12 (21) 3138-3142 (2012).
- 20 9. Bereman, M.S., Proteomics 11 (14) 931-2935 (2011).
10. Hawkins, T.L. y col., Nucleic acids research 22 (21) 4543 (1994).
11. DeAngelis, M.M. y col., Nucleic acids research 23 (22) 4742-4743 (1995).
- 25 12. Wilkening, S. y col., BMC genomics 14(1) 90 (2013).
13. Chen, W.-H. y col., Analytical Chemistry, 78:4228, (2006).
- 30 14. Current Protocols in Protein Science, Suplemento 7, uni 4.5, capítulo 4.5.5 “Selective precipitation by salting out”, Wiley publishing company, (1997).
15. Altelaar, A. y col., Opinión actual en biología química 16 (1) 206-213, 2012.
- 35 16. Yang, F. y col., Expert Review of Proteomics 9 (2) 129-134, (2012).
17. Cox, J. y col., Nature Biotechnology 26, 1367-72, 2008).
18. Cox, J. y col. Journal of Proteome Res. 10, 1794-805, (2011).
- 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para unir polipéptidos de forma reversible a una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas y en donde el método se lleva a cabo en un único tubo, que comprende la etapa de:

poner en contacto dicha fase sólida con una solución que contiene dichos polipéptidos y una solución de deshidratación y/o una solución de precipitación, en donde

(i) la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado de acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o

(ii) la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro, y combinaciones de los mismos,

en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato, y un resto de fosfato.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la fase sólida consiste en microperlas paramagnéticas carboxiladas.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la fase sólida consiste en microperlas paramagnéticas carboxiladas y en donde la solución de deshidratación comprende acetonitrilo.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la solución de deshidratación o la solución de precipitación se agrega en una cantidad que da como resultado la unión reversible de al menos el 90 % de los polipéptidos de dicha solución.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la solución que contiene dichos polipéptidos se selecciona de un extracto de células enteras, una digestión de extracto de células enteras, proteínas derivadas de tejidos, proteínas purificadas recombinantes, proteínas purificadas, una digestión de proteínas, una digestión de proteínas purificadas y una biblioteca de péptidos.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la fase sólida que comprende polipéptidos unidos de forma reversible se separa de la solución.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la fase sólida se lava con una solución de lavado que comprende un disolvente orgánico polar o una sal que comprende al menos un ion o un caótropro que comprende al menos un ion que aumenta la interacción hidrófoba de los polipéptidos, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1 M - 8 M.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la etapa adicional de agregar una proteasa.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los polipéptidos se liberan de la fase sólida con una solución de elución acuosa.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, que comprende la etapa adicional de someter la solución acuosa a espectrometría de masas.

11. Un kit que comprende

a. una fase sólida que comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas y en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto de ácido carboxílico; y

b. una solución de deshidratación que comprende un disolvente orgánico polar, en donde dicho disolvente orgánico polar se selecciona entre acetonitrilo, acetona y alcohol; y

c. una proteasa.

12. El kit de la reivindicación 11, en donde dicho kit comprende además uno o ambos de los siguientes:

a. un polímero higroscópico que es polietilenglicol; y

b. una solución de precipitación que comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados entre amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro o combinaciones de los mismos.

5 13. Uso de

a. una fase sólida, y
b.

10 (i) una solución para la deshidratación; y/o
(ii) una solución de precipitación, en donde

15 la fase sólida comprende una superficie hidrófila, en donde la fase sólida consiste en microperlas o micropartículas paramagnéticas que comprenden la superficie hidrófila, en donde dicha superficie hidrófila comprende además un resto cargado negativamente seleccionado del grupo que consiste en un resto de ácido carboxílico, un resto de sílice, un resto de sulfato y un resto de fosfato;
la solución de deshidratación comprende un disolvente orgánico polar seleccionado entre acetonitrilo, acetona y alcohol y/o un polímero higroscópico, siendo dicho polímero higroscópico polietilenglicol; y/o

20 la solución de precipitación comprende iones de alta fuerza iónica seleccionados del grupo que consiste en amonio, potasio, sodio, fluoruro, sulfato, hidrogenofosfato, acetato, cloruro y combinaciones de los mismos;
para el análisis, la identificación, la caracterización, la cuantificación, la purificación, la concentración y/o la separación de polipéptidos llevados a cabo en un único tubo.

Figura 1

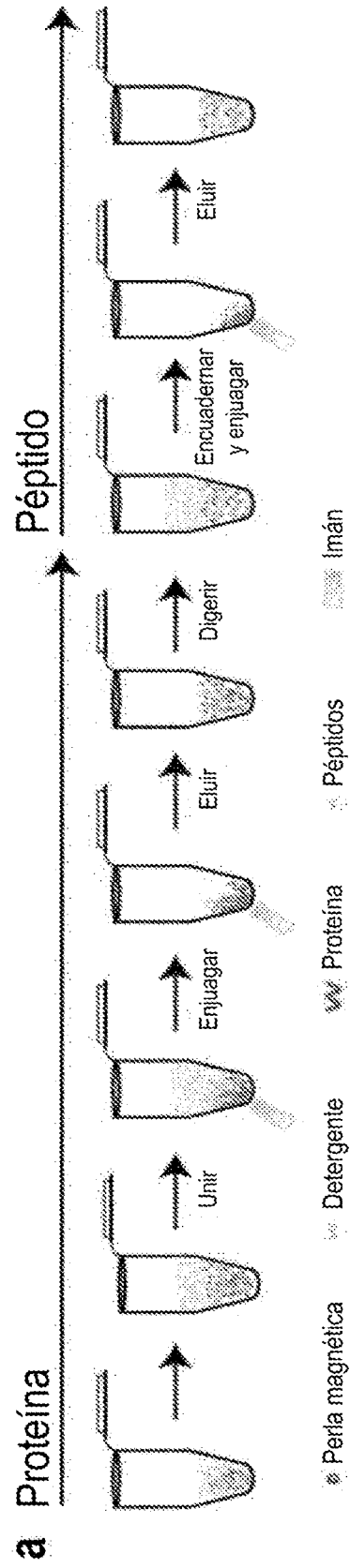


Figura 1 continuación

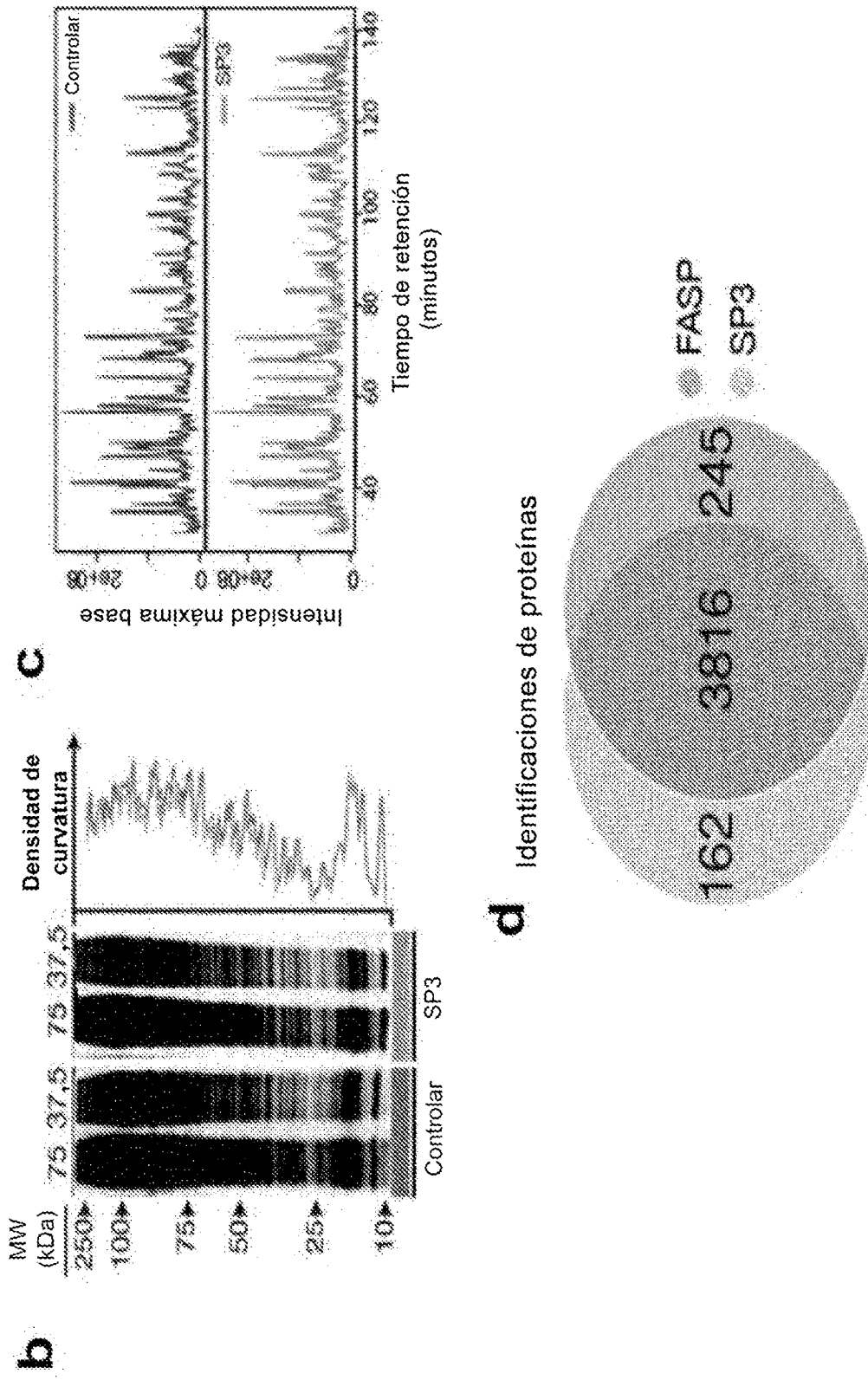


Figura 2

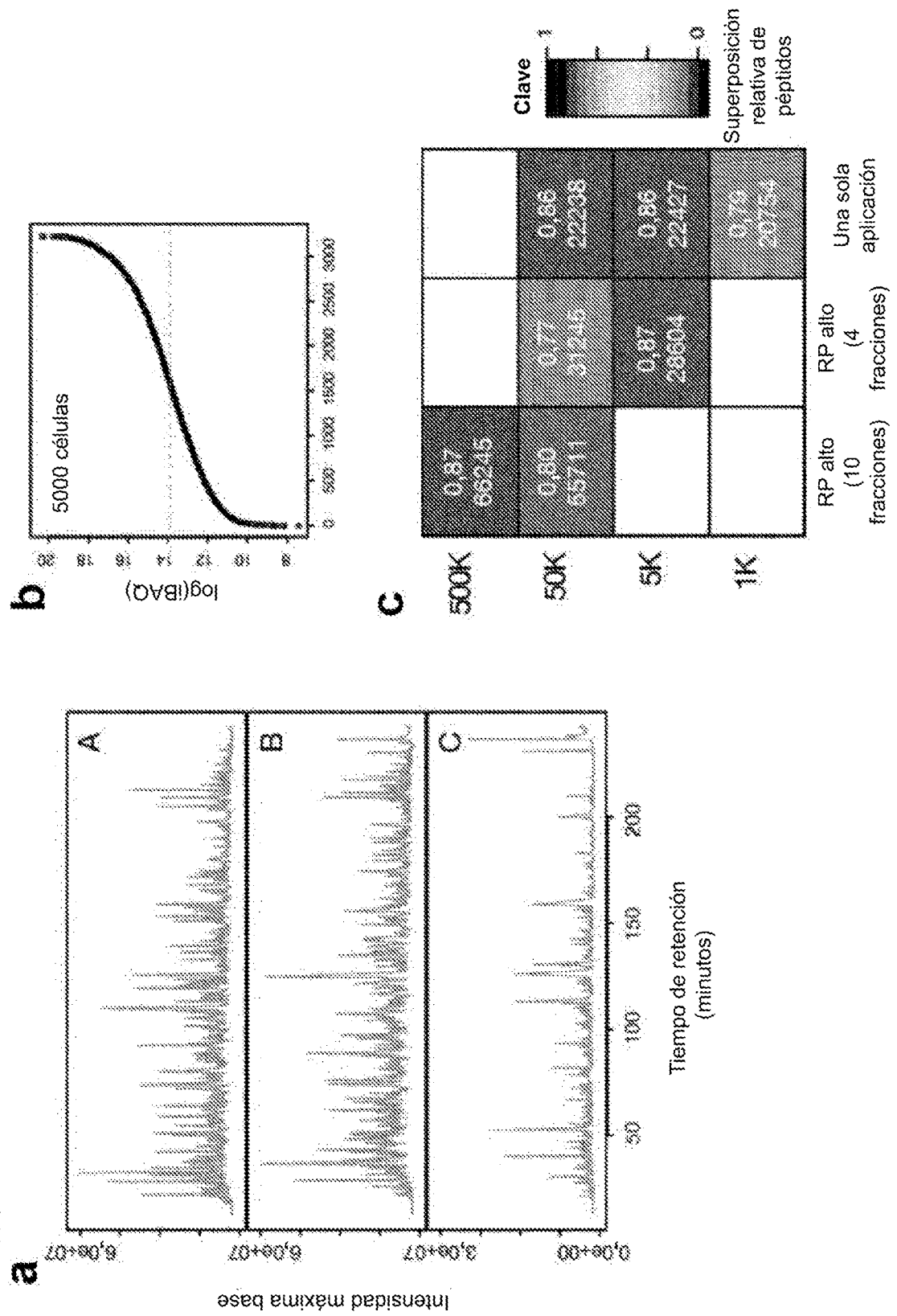


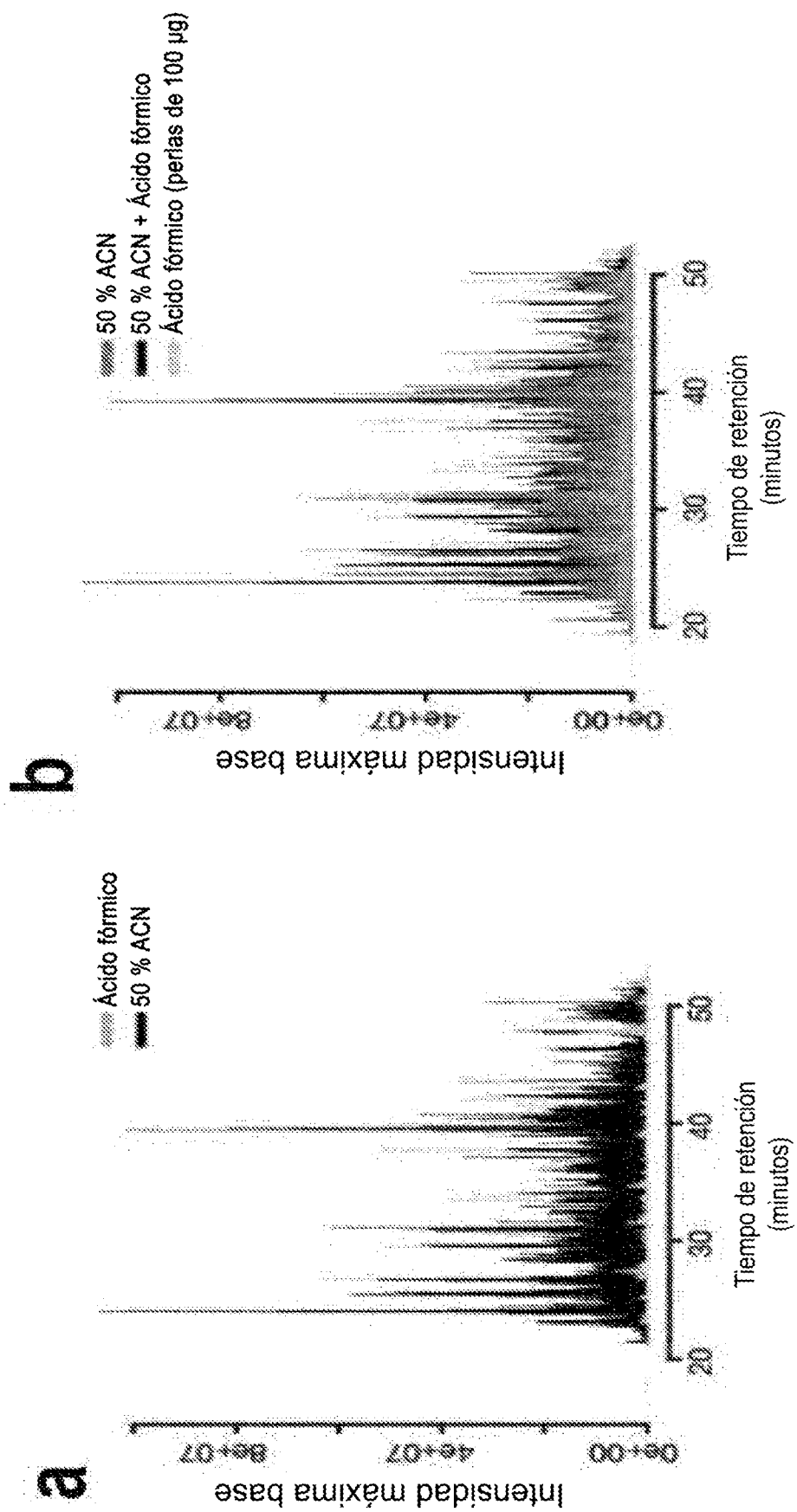
Figura 3

Figura 3 continuación

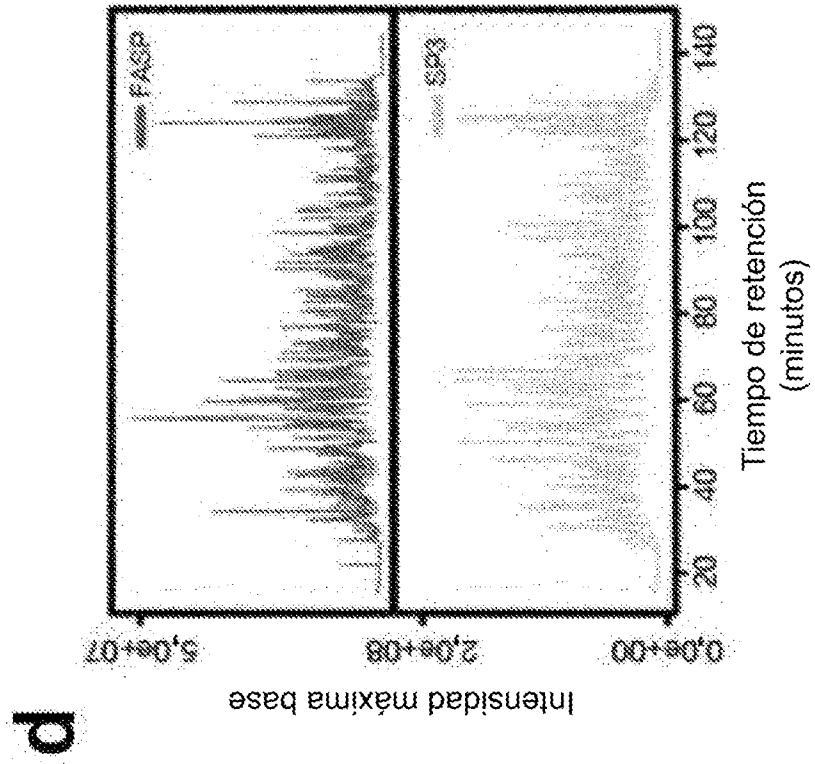
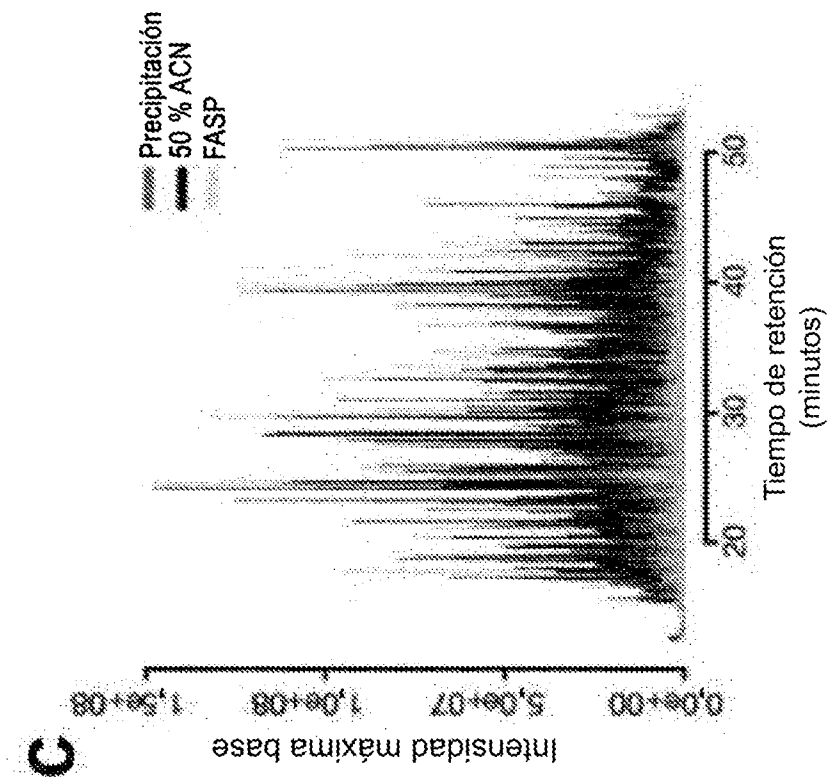


Figura 4

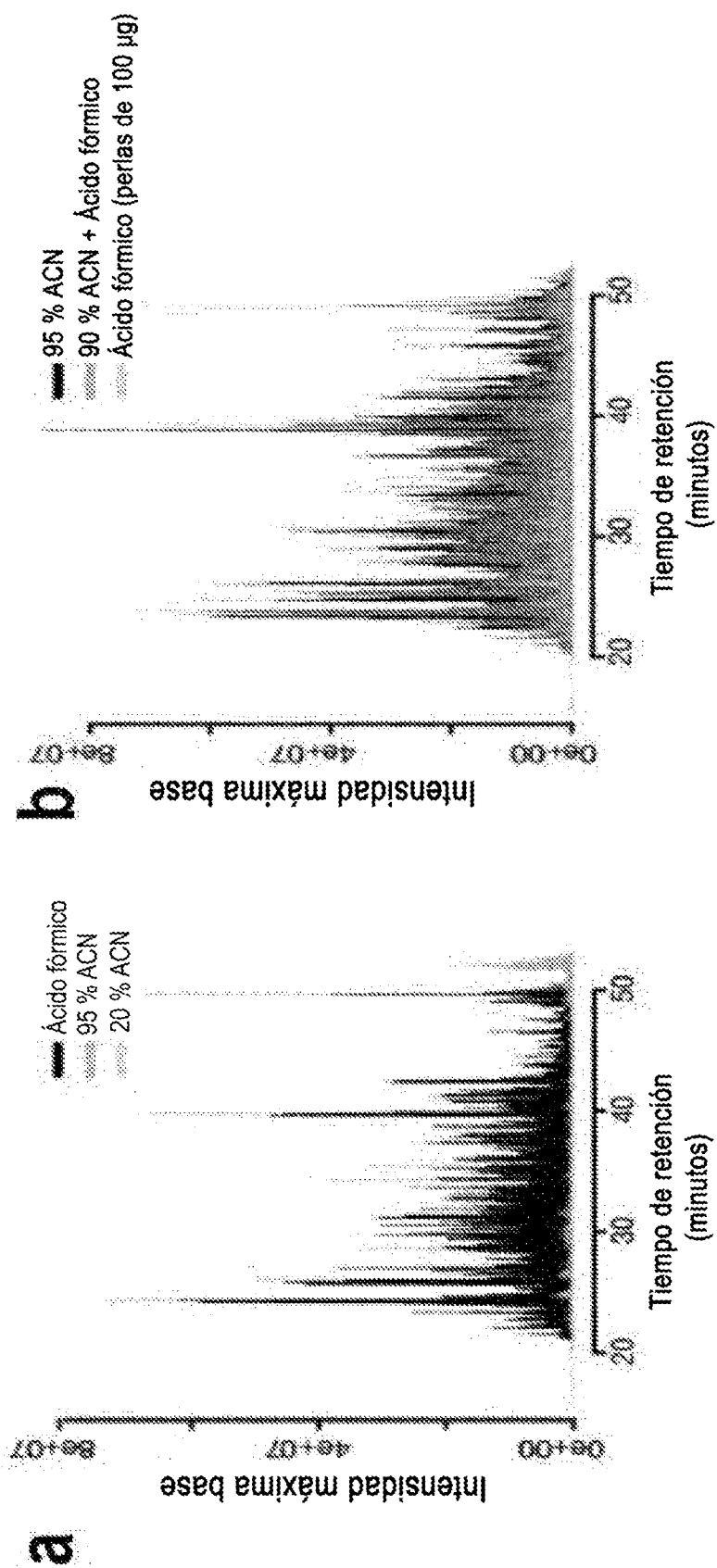


Figura 4 (continuación)

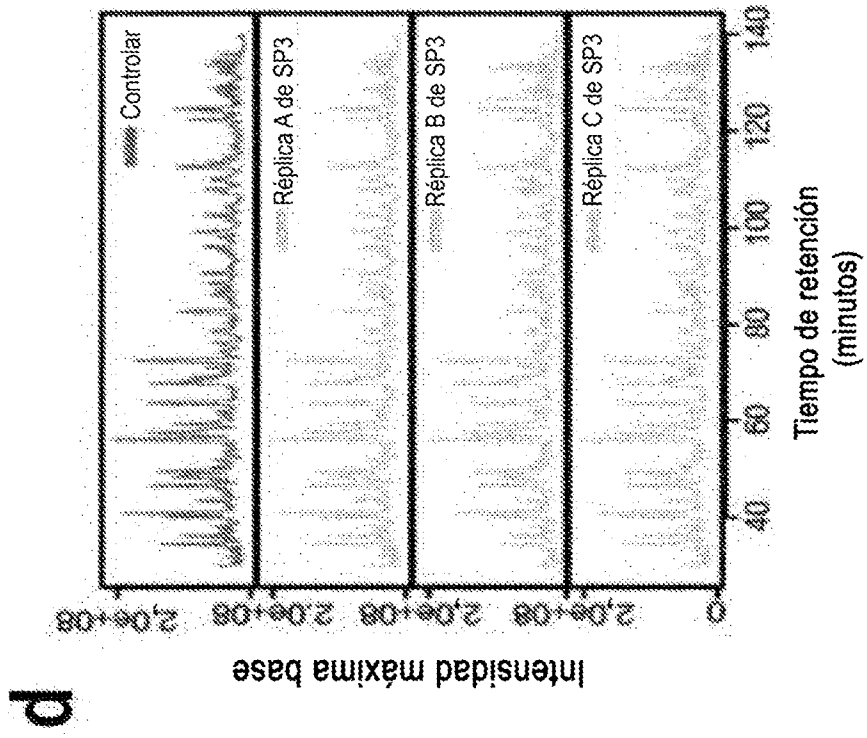
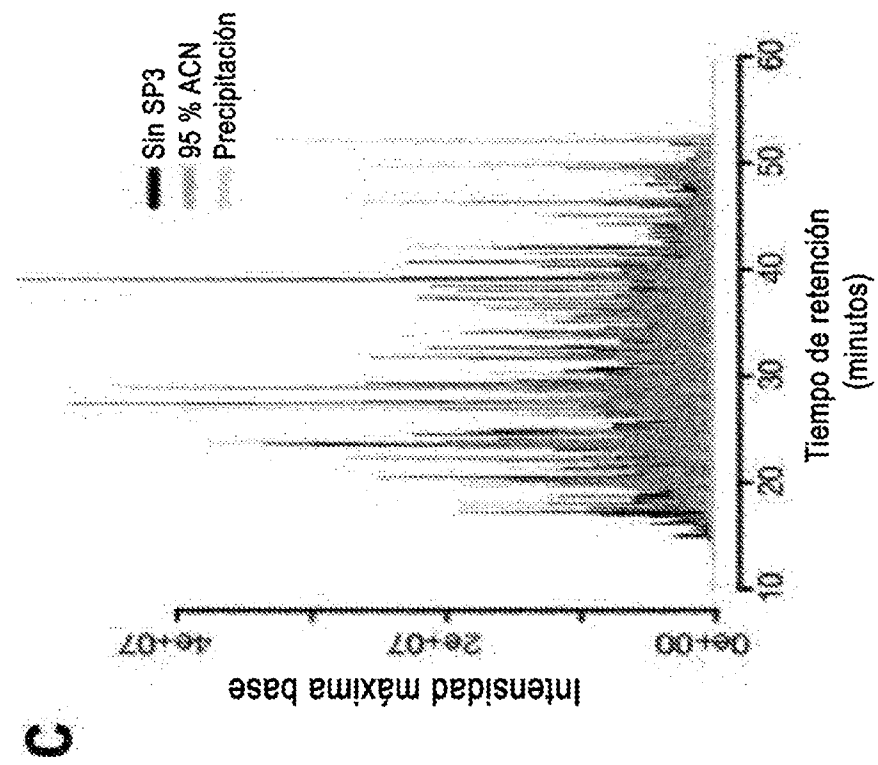


Figura 5

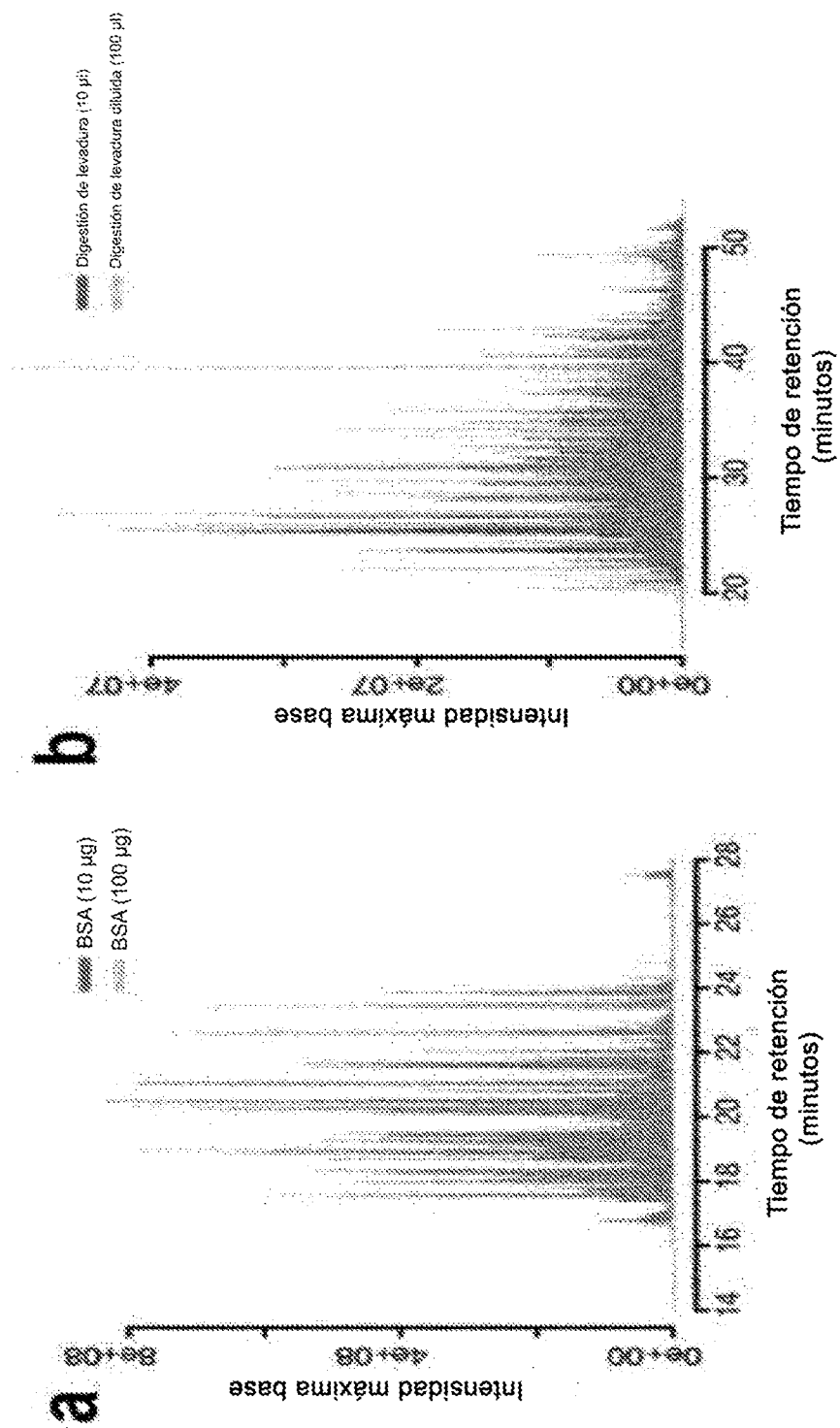


Figura 5 (continuación)

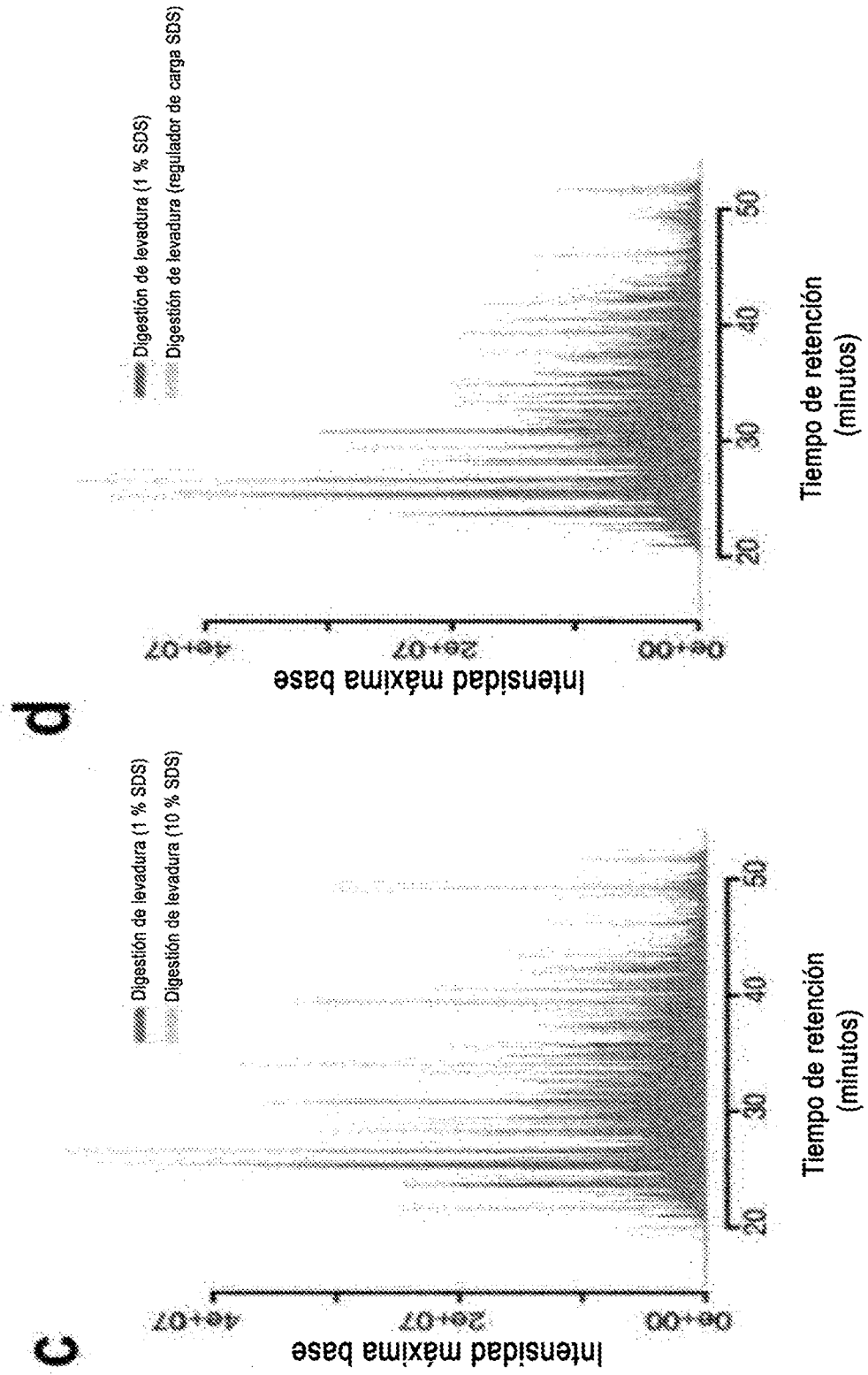


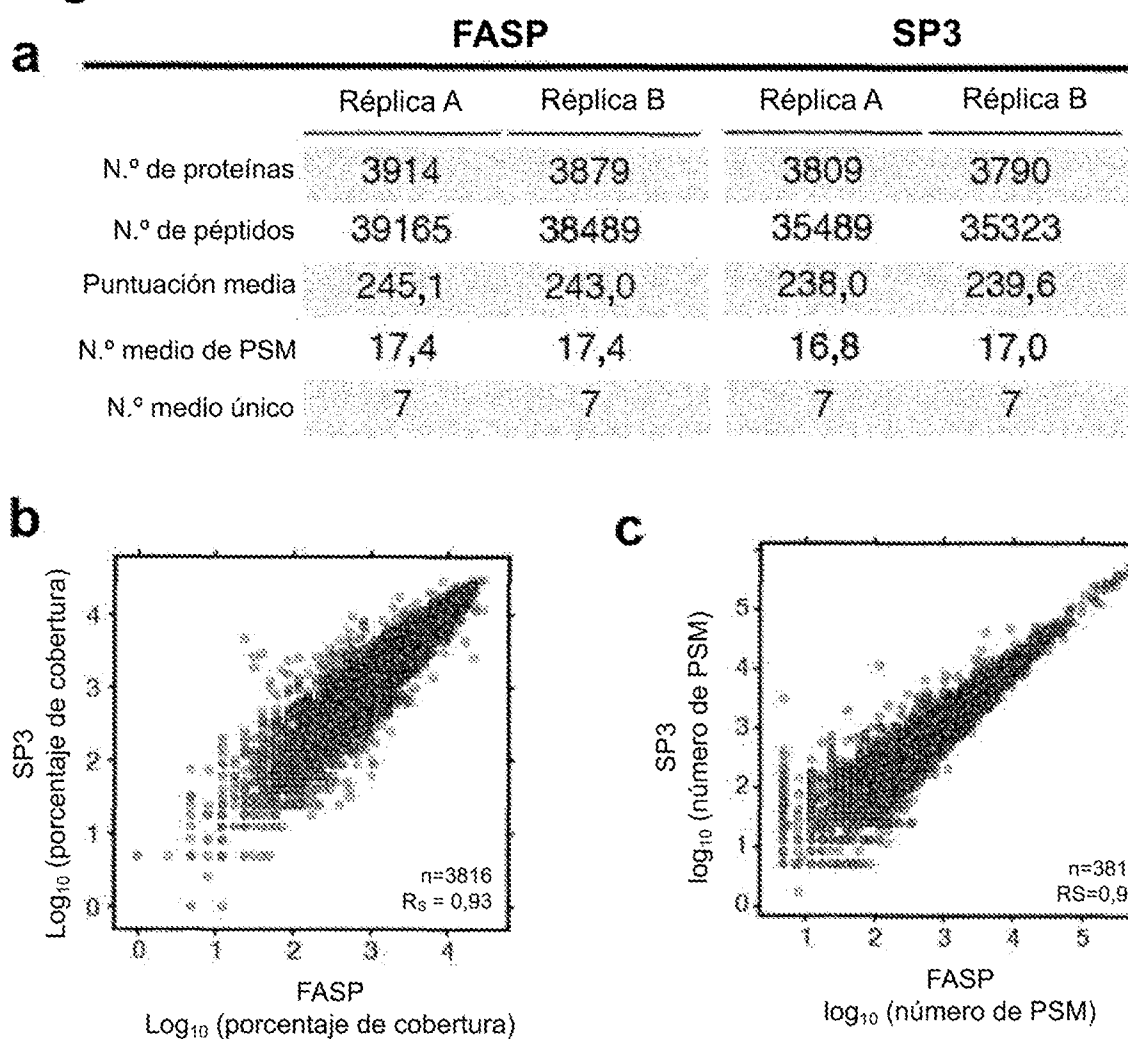
Figura 6

Figura 7

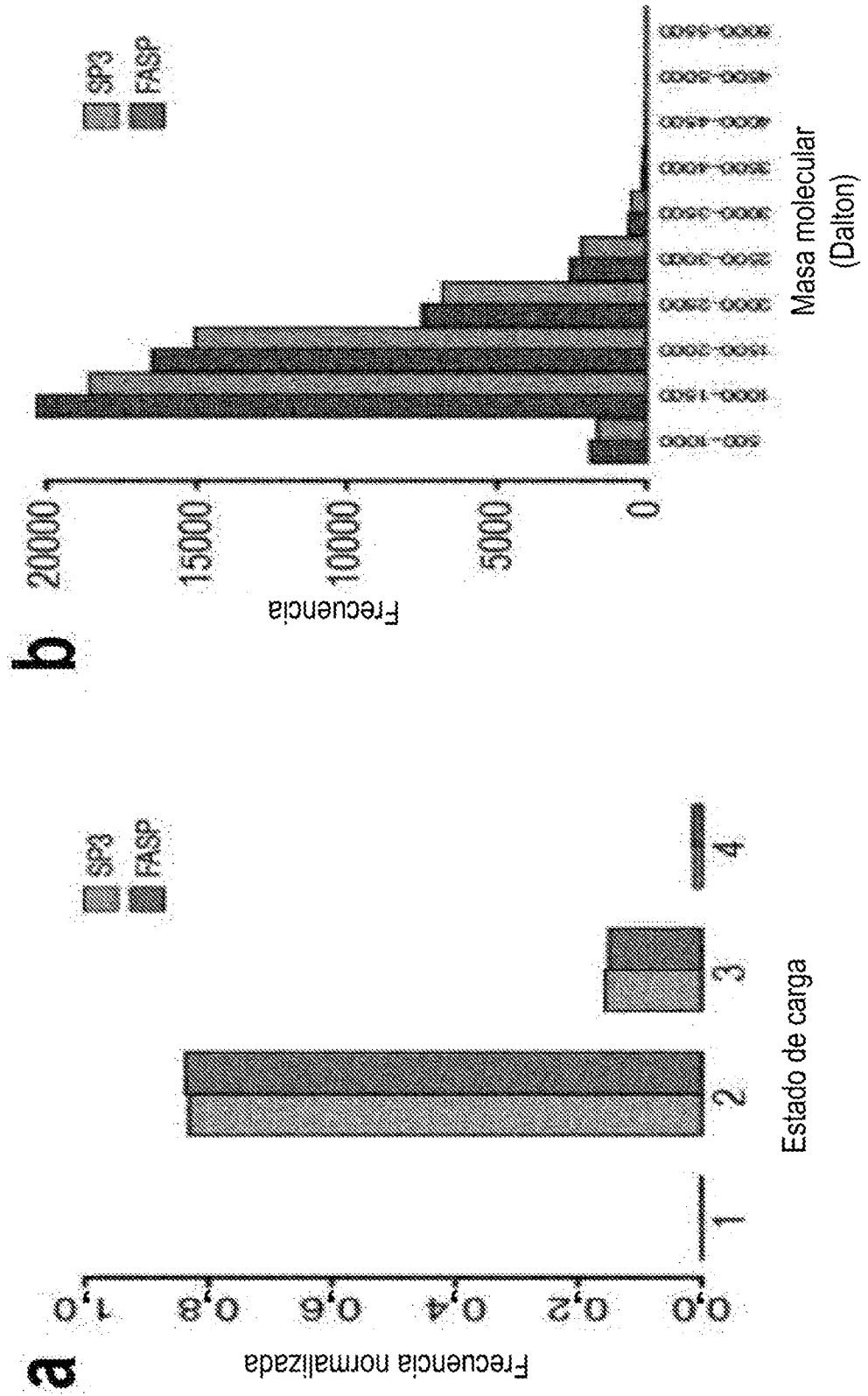


Figura 7 continuación

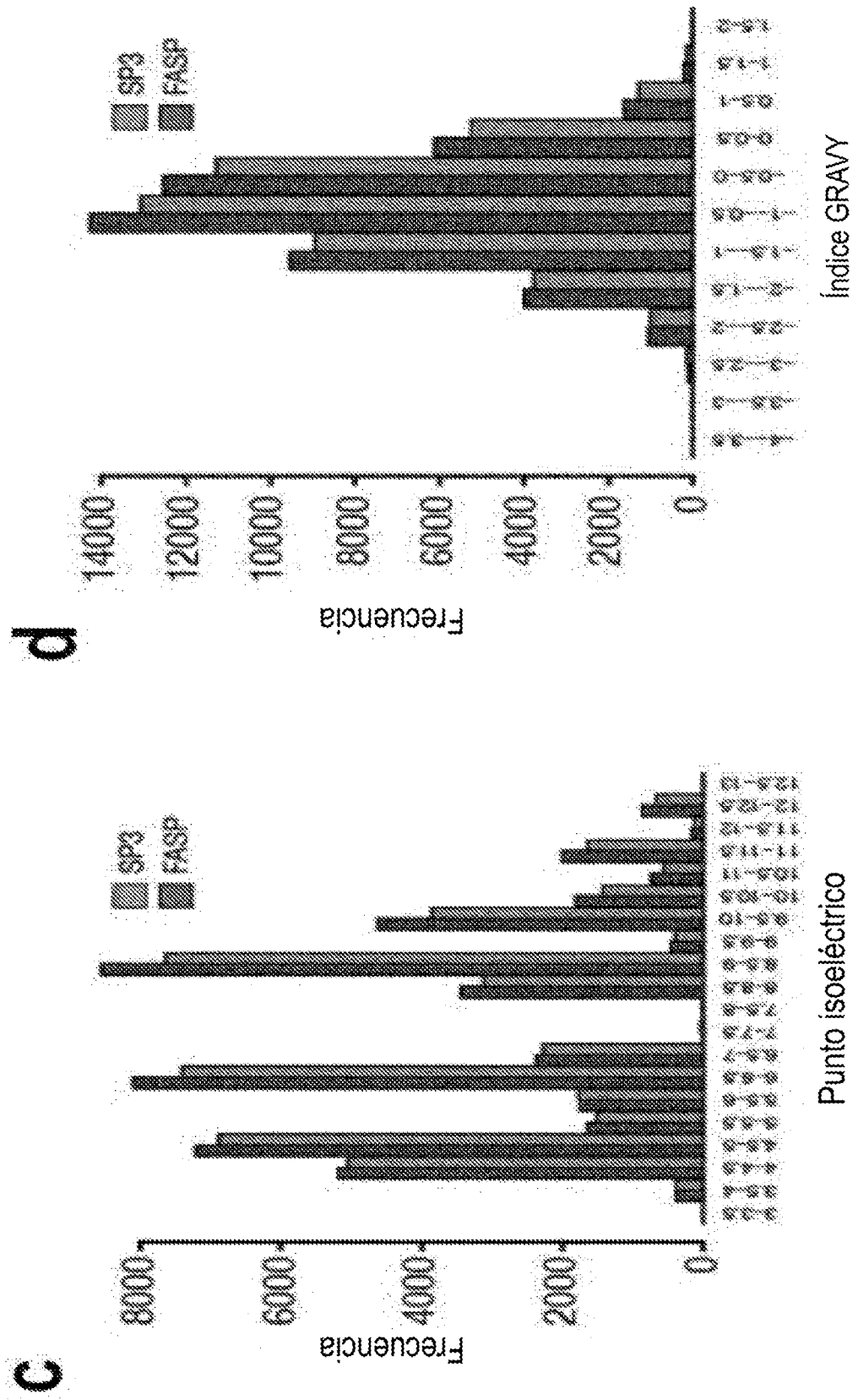


Figura 8

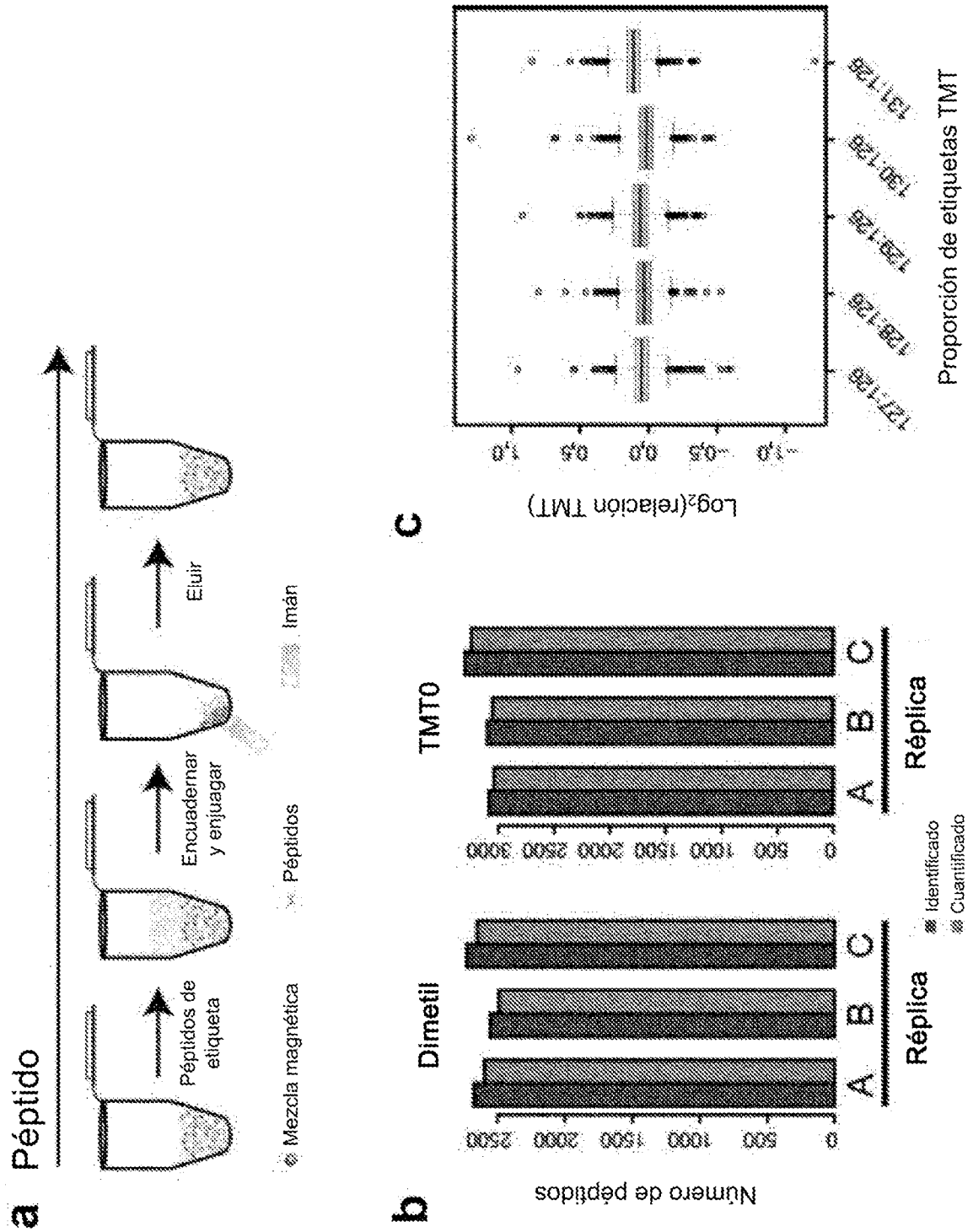


Figura 9

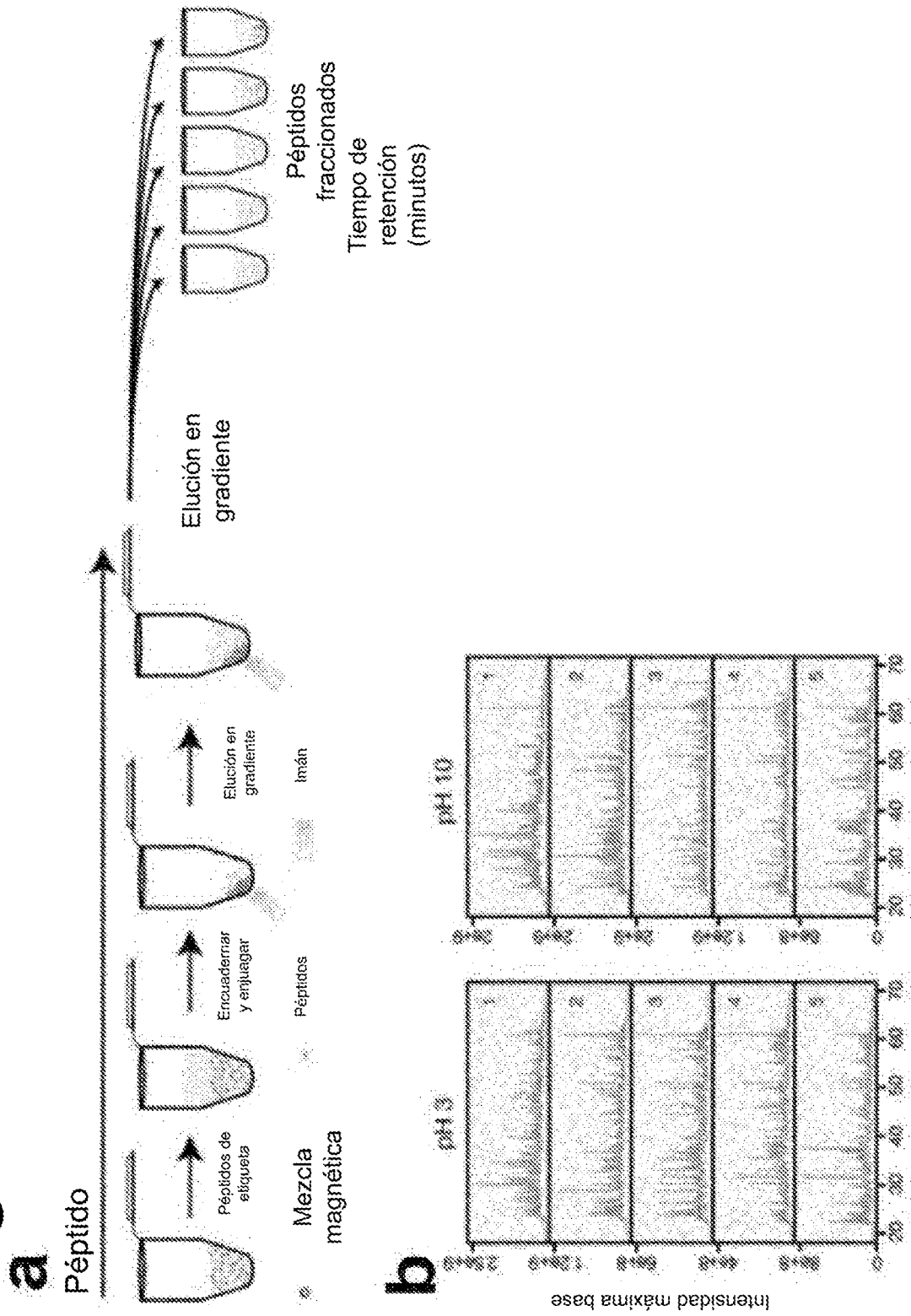
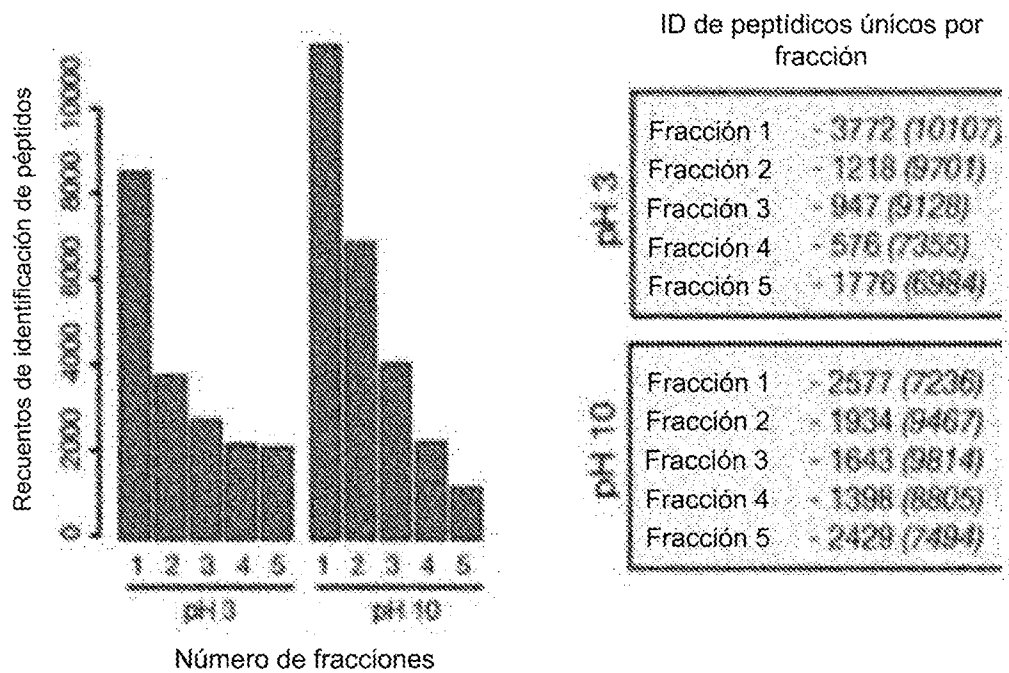


Figura 9 continuación

C



d

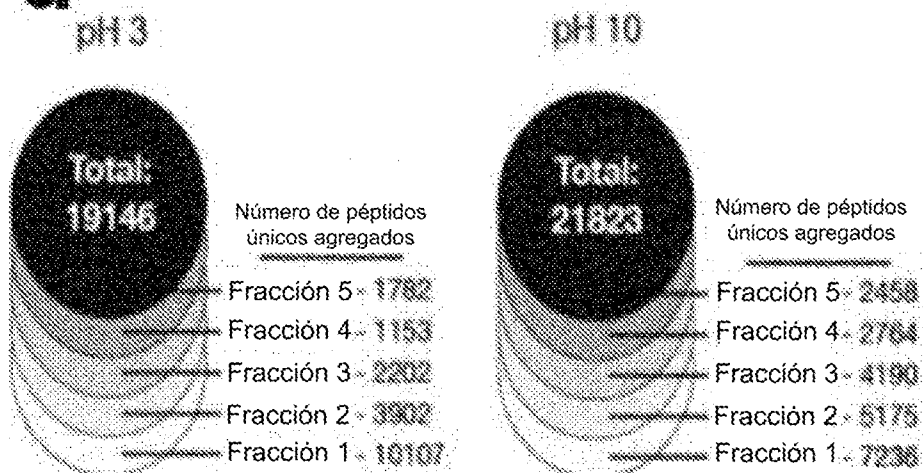


Figura 10

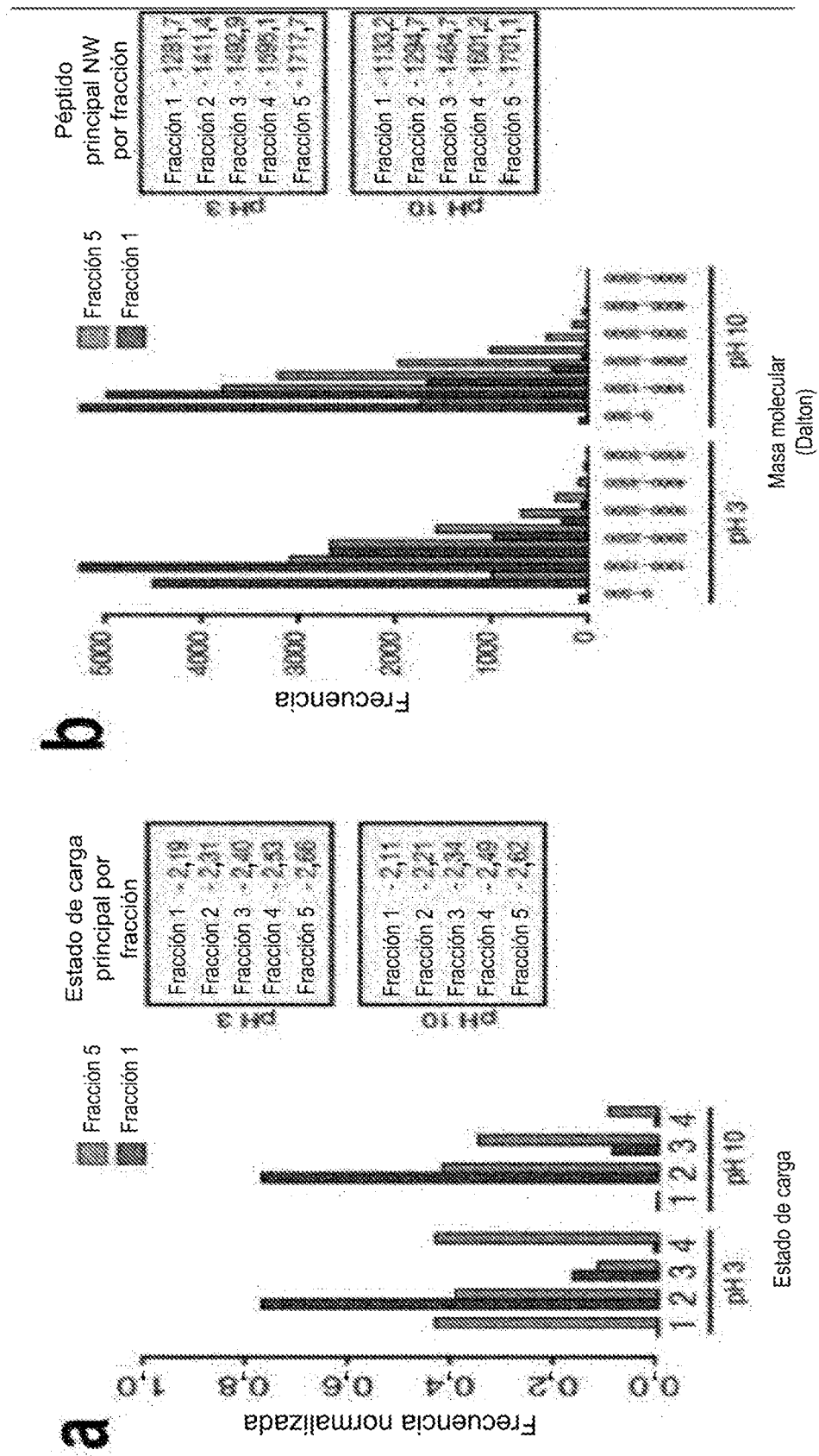


Figura 10 continuación

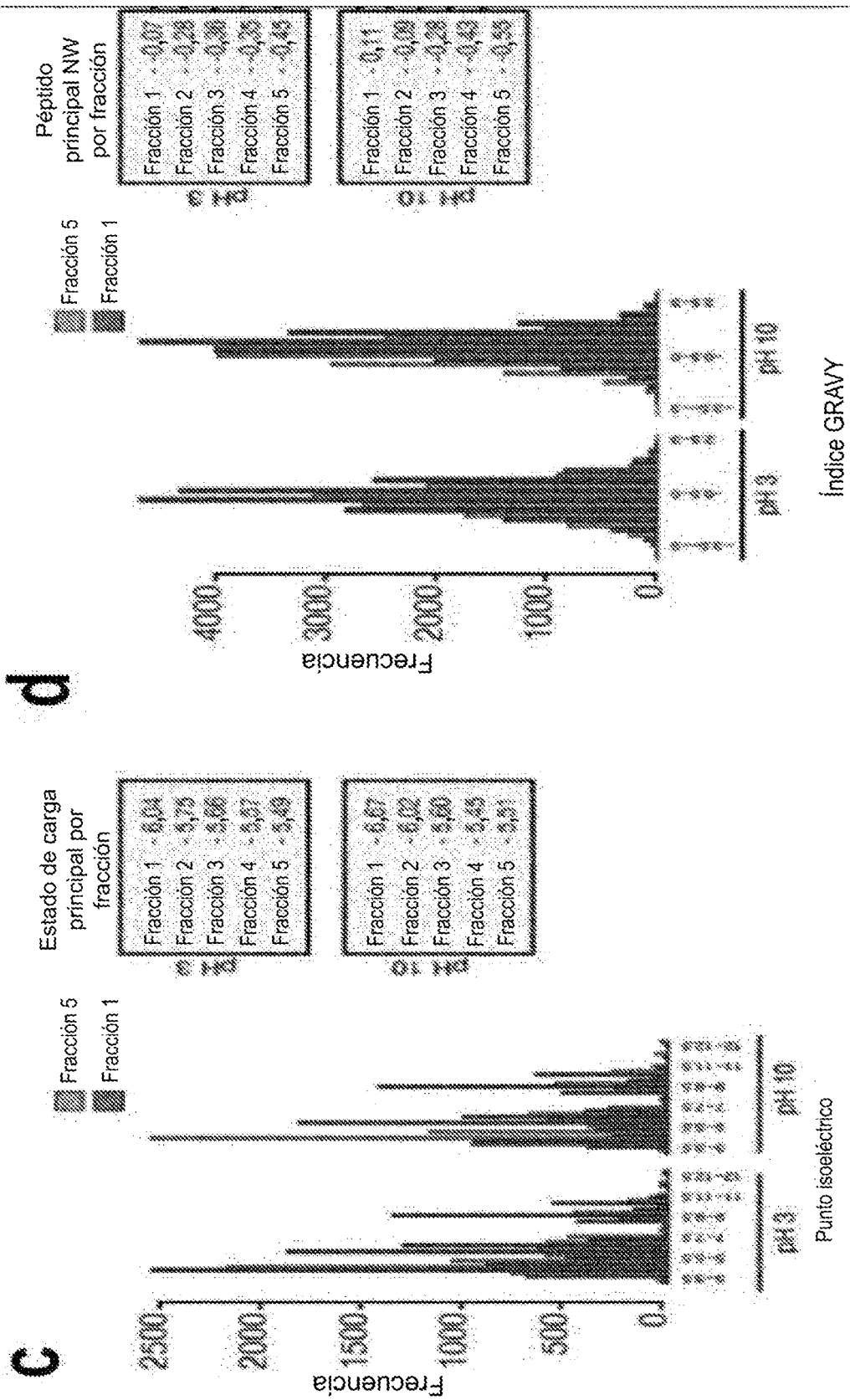


Figura 11

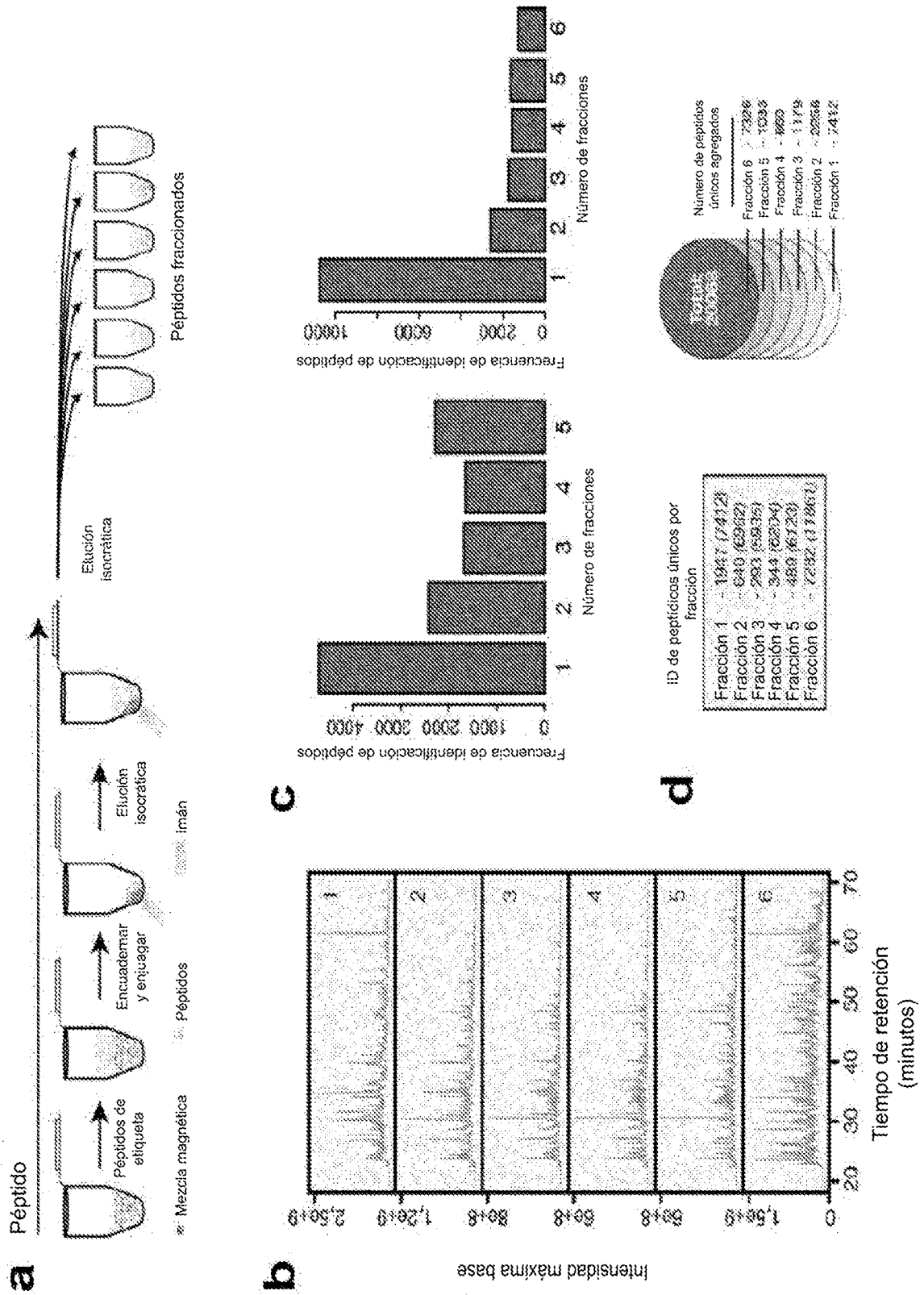


Figura 12

