



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01336**

(22) Data de depozit: **13/12/2010**

(41) Data publicării cererii:
29/07/2016 BOPI nr. **7/2016**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD.CAROL I NR.11, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• DROCHIOIU GABI, STR.PETRU RAREȘ
NR. 19, C 15, TÂRGU FRUMOS, IS, RO;
• MURARIU MANUELA,
STR. PETRU RAREȘ NR. 19, C 15,
TÂRGU FRUMOS, IS, RO

(54) **METODĂ DE DETERMINARE MAS-SPECTROMETRICĂ A
LEGĂRII IONILOR METALICI DE CĂTRE PEPTIDE LA
VALORI ÎNALTE DE pH**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare a legării ionilor metalici la peptide și proteine la valori înalte ale pH-ului, prin utilizarea unor soluții tampon conținând etanolamină și derivații săi. Metoda conform invenției constă în efectuarea unor măsurători de spectrometrie de masă, în domeniul m/z 200...2000, pe un spectrometru de masă cu ionizare cu electrospray și capcană de ioni, temperatura de uscare a gazului purtător fiind de 300°C, introdus cu o viteză de 5 l/min, cu valoarea tensiunii în capilară de 195,5 v și valoarea skim de 62,4 v, toți reactivii fiind de grad analitic, și toate soluțiile preparate cu apă de puritate milliQ cu $R = 18,2 \text{ M } \omega \text{ cm}$, s-au utilizat acetonitril, acid acetic, săruri de Cu, bicarbonat de amoniu, etanolamină, dietanolamină și trietanolamină, împreună cu Oligopeptida Gly-Gly-Gly- Gly(Gly4) 97%, care a fost utilizată fără purificare suplimentară; Gly4 se dizolvă inițial în amestecul de solvenți acetonitril-apă, 1:1, care conține acid acetic 0,1%, concentrația peptidei fiind de 10 ng/ μL , raportul molar Gly4:Cu variind de la 1:0,1 la 1:10, iar corecțiile pH-ului au fost măsurate cu un pH-metru CG837 înainte și după tratamentul cu ioni de Cu, și au fost efectuate cu acid acetic, etanolamină și derivatele sale, atunci când a fost necesar, iar adăugarea de etanolamină în locul bicarbonatului de amoniu îmbunătățește gama de pH până la $\text{pH} = 11,8$, care scade la $\text{pH} = 11,4$ prin diluarea amestecului de reacție Gly4:Cu de 10 ori, până la concentrația finală a peptidei de 10 ng/ μL .

Revendicări: 2
Figuri: 2

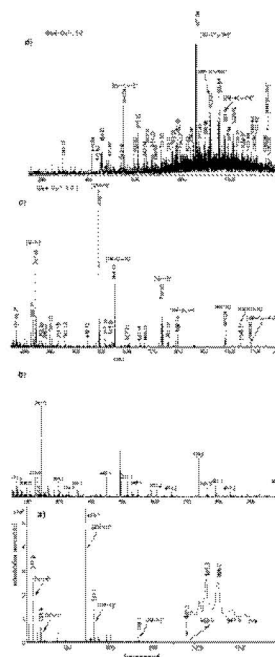


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



Descrierea invenției

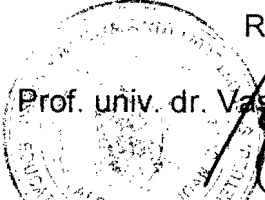
METODA DE DETERMINARE MAS-SPECTROMETRICA A LEGARII IONILOR METALICI DE CATRE PEPTIDE LA VALORI INALTE DE pH

Invenția se referă la un procedeu de determinare a legării ionilor metalici de către peptide și proteine la valori înalte de pH în soluții apoase, utilizând etanolamina și derivații săi ca agenți de alcalinizare. Cercetările anterioare au arătat că măsurarea masei biopolimerilor se poate realiza cu spectrometre de masă de tip MALDI-ToF la pH acid, în prezență de acid formic sau acetic [1-3]. Spectrometria de masă are capacitatea de a furniza informații cu privire la complexii metalo-proteici implicați în procesele biochimice [4]. Spre deosebire de procedeul MALDI-ToF MS, procesul de ionizare cu electrospray și captură de ioni (ESI-Ion Trap MS sau ESI-MS) este mai blând și permite vizualizarea în spectrul de masă obținut a unor complexi intacti de proteine și peptide cu ionii metalici [5]. O dată cu creșterea pH-ului de la valori acide (soluțiile de analiză conținând acid acetic, acid formic, etc.) spre valori fiziologice (pH 7,4) și, mai ales, alcaline (pH mai mare decât 8,0, mergând chiar peste 10,0), ionii metalici se leagă, de regulă, mult mai intens la proteine și peptide [6]. La valori de pH mai mari de 12,0 are loc formarea complexului biuret al proteinelor cu ionii de cupru. Tendința de legare mai puternică a ionilor metalici de către proteine și peptide nu poate fi evidențiată prin tehnicile spectrometrice de masă actuale, cum ar fi ESI-MS, deoarece bicarbonatul de amoniu nu poate atinge valori foarte înalte de pH, iar utilizarea unor soluții de baze tari ar conduce la formarea de complexi cu ionii acestora, complicând mult spectrele și alterând rezultatele. La pH înalt poate apare coroziunea datorată hidroxizilor, în timp ce fluiditatea soluțiilor poate scădea conducând la înfundarea capilarelor.

În literatura de specialitate nu am întâlnit niciun procedeu de măsurare a maselor la valori de pH mai mari de 7,8, deoarece bicarbonatul de amoniu (50 mM, pH 7.8), considerat un tampon ideal pentru spectrometria de masă cuplată cu cromatografia de lichid la pH ridicat [7], nu poate atinge nici valorile de pH de 8,5 din mitocondrii.

Ipoteza de lucru a prezentei invenții se bazează pe faptul că ionii metalici se leagă la proteine și peptide în mod diferit la diferite valori de pH, iar tamponurile actuale nu permit măsurători la valori de pH peste valoarea 8,0. În aceste condiții a fost necesară introducerea unei substanțe care să genereze valori înalte de pH, dar care să nu interfereze cu determinările maselor peptidelor sau complexurilor acestora. Pe de altă parte, fluiditatea soluțiilor obținute trebuie să se mențină în limitele admise de curgerea soluțiilor prin capilarele spectrometrelor de masă și să se volatilizeze la formarea electrospray-ului. De aceea, am ales etanolamina ce conține o grupare amino ce poate genera în soluții apoase un pH mai mare de 8,0 și care poate ajunge și la valori de pH

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN



11,0, dar care conține și gruparea OH alcoolică ce-i permite să fie solubilă în apă și să nu scadă fluiditatea soluțiilor obținute.

Spectrele obținute la valori mari de pH, diferă mult de cele realizate cu metodele obișnuite. De aceea, este necesară interpretarea acestora, iar prezenta invenție propune realizarea unor spectre suplimentare în cazul soluțiilor de complecși peptido-metalici cu valori înalte de pH, în așa fel încât să se observe evoluția formării complecșilor la pH crescând. De asemenea, se propune calculul valorii m/z (masă supra sarcina electrică a ionului complexului investigat) și identificarea sa în spectru. În continuare, aceste valori fiind atribuite, se identifică celelalte semnale din spectru și se atribuie altor ioni sau impurităților, după caz.

Metoda de măsurare a maselor complecșilor peptido-metalici la valori înalte de pH conform invenției prezintă o serie de avantaje:

- permite identificarea directă a speciilor moleculare ale complecșilor peptido-metalici sau proteino-metalici rezultate la amestecarea soluțiilor de peptide sau proteine cu soluții de ioni de metale grele la valori înalte de pH;

- permite descifrarea spectrelor complexe obținute la valori înalte de pH, fie prin utilizarea unor spectre suplimentare mai simple, fie prin calcul cu ajutorul programului de calculator instalat pe spectrometrul de masă cu capcană de ioni și ionizare cu electrospray;

- se aplică ușor la utilizarea unui instrument ESI-MS obișnuit, prin simplă modificare a pH-ului cu ajutorul etanolaminei și derivaților săi, fără consum suplimentar de energie, reactivi sau dispozitive anexe;

- tehnica de lucru este facilă și permite examinarea modului de legare a ionilor metalici la proteine sau peptide, permițând abordarea problemelor complexe ale proprietăților proteinelor și determinarea structurii acestora.

- se poate aplica la peptidele cu masă moleculară mică fără calcule suplimentare privind masele complecșilor formați;

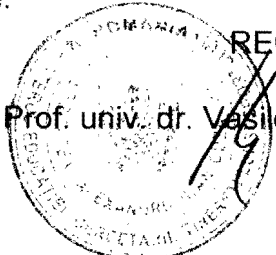
- se poate aplica și peptidelor cu masă moleculară mai mare sau proteinelor și complecșilor acestora, în care caz este necesară deconvoluția spectrelor ca în exemplele menționate;

- sunt evidențiați în spectrul de masă, în mod direct, complecșii formați la pH înalt, lucru imposibil cu soluțiile tampon uzuale;

- soluțiile alcaline pe bază de etanolamine nu sunt corozive pentru spectrometrele de masă și nu interferă cu măsurătorile.

Caracterul de noutate al metodei descrise constă în introducerea unui tampon pe bază de etanolamină și derivații acesteia, care permite măsurători de masă la pH înalt, chiar mai mare de pH 8,0, în vederea evidențierii modului de legare a ionilor metalici la peptide și proteine. Procedeu descris nu necesită instalații și utilaje suplimentare, în afara celor utilizate la determinările cu instrumentele obișnuite.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN



7

Soluțiile sunt ușor de preparat, nu sunt corozive și nu interferă cu determinările. Deconvoluția spectrelor peptidelor mici se face în mod obișnuit, iar în cazul peptidelor mai mari sau în cazul măsurătorilor la valori foarte înalte de pH, se recurge la calcule suplimentare. Astfel, se calculează valorile m/z la care pot apărea diferiți complecși în spectru și se identifică aceste semnale în spectrul de masă. În continuare, cu ajutorul opțiunii "state charge ruler" din programul "data analysis", instalat deja pe instrument, se identifică semnalele acestor complecși având și alte sarcini electrice. De exemplu, se calculează masa complexului $[P+Me+nH]^{(n-me)+}$, în care P este masa peptidei, Me , masa metalului, iar me este sarcina ionului metalic. În continuare se identifică semnalele $[P+Me+(n\pm i)H]^{(n-me\pm i)+}$, care memorează pentru a nu fi atribuite altor complecși, peptide pure sau impurități. Gradul de tehnicitate al invenției este conferit de metoda de determinare a maselor cu spectrometrele de masă cu electrospray, utilizarea unor tamponi cu compoziții pe bază de etanolamină, di- și trietanolamină, precum și de modul de prelucrare a spectrelor. Acesta presupune deconvoluția obișnuită a spectrelor obținute la pentru peptide mici (2-4 resturi de aminoacizi) la pH slab bazic și utilizarea unor spectre suplimentare pentru pH înalt, iar pentru complecșii peptidelor mai complicate cu ioni metalici la pH foarte înalt se recurge și la utilizarea opțiunii "state charge ruler" din programul "data analysis". Gradul de tehnicitate poate crește mult în funcție de biopolimerul analizat, multitudinii de ioni din soluția de analizat sau valoarea pH-ului.

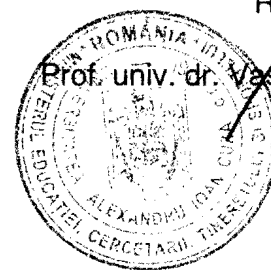
Aplicarea metodei descrise în prezenta invenție la două peptide și la complecșii acestora cu ioni de cupru a condus la spectre inedite, care au indicat că modul de legare a ionilor metalici la peptide diferă mult cu modificarea pH-ului. Acest lucru este de foarte mare interes pentru biochimistii care analizează efectul soluțiilor alcaline asupra celulelor vii, legarea metalelor de proteine în mitocondrii, pentru medicii care studiază bolile Wilson, Alzheimer, Parkinson, bolile prionice în care legarea ionilor metalici de peptide joacă un rol esențial. De asemenea, studiul interacțiunii metalelor cu alte substanțe, la valori înalte de pH ar putea interesa chimștii și alte categorii de specialiști.

În continuare se dau 2 exemple de realizare a invenției.

Exemplu 1. Experimentele de spectrometrie de masă cu ionizare cu electrospray și capcană de ioni (ESI-Ion Trap MS) au fost efectuate pe un spectrometru de masă Esquire 3000plus de la Daltonics Bruker (Bremen, Germania). Spectrele au fost acumulate în domeniul m/z 200-2000 iar temperatura de uscare a gazului purtător a fost de 300 °C, introdus cu o viteză de 5.0 l/min. Valoarea tensiunii în capilară a fost de 197.5 V, iar valoarea skim de 62.4 V. Instrumentul a fost folosit atât în modul pozitiv cât

RECTOR,

Prof. univ. dr. Vasile ISAN



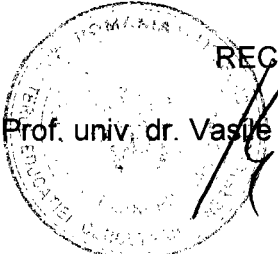
și în cel negativ, programul de calculator utilizat a fost DataAnalysis de la firma Bruker, Germania, care este de regulă instalat pe instrument. Toți reactivii chimici au fost de gradul analitic și toate soluțiile preparate cu apă de puritate milliQ cu $R = 18.2 \text{ M}\Omega$. Acetonitril, acid acetic, sărurile de cupru, bicarbonat de amoniu, și glutation au fost achiziționate de la Merck (Darmstadt, Germania). Etanolamina, dietanolamina și trietanolamina au fost achiziționate de la Merck (Schuchardt-Hohenbrun, Germania). Oligopeptida Gly-Gly-Gly-Gly 97% (Gly4) a fost produs de EGA Chemie (Steinheim, Albuch, Germania) și utilizată fără purificare suplimentară. Gly4 a fost dizolvată inițial în amestecul de solvenți acetonitril-apă, 1:1 (v/v), care conține acid acetic 0,1%. Concentrația peptidei a fost de $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, iar raportul Gly4:Cu²⁺ a variat de la 1:0.1 la 1:10. Valorile pH-ului din toate soluțiile au fost măsurate cu un pH-metru CG 837-Schott înainte și după tratamentul cu ioni de cupru. Corecțiile pH-ului au fost efectuate cu acid acetic, acetat de amoniu, bicarbonat de amoniu, și etanolamine și derivatele sale, atunci când a fost necesar.

Adăugarea de etanolamină în locul bicarbonatului de amoniu îmbunătățește gama de pH-ului pentru analiza prin spectrometrie de masă. O soluție 0,4 molar de etanolamină a avut pH 11,8, care a scăzut la 11,4 prin diluare de 10 ori.

Figura 1 arată că peptida apare la m/z 247 sub forma ionului $[M+H]^+$, iar adăugarea de etanolamină pentru a realiza un pH de 10,6, conduce la agregarea peptidei cu formare de dimeri ($[2M+H]^+$), trimeri ($[3M+H]^+$) și chiar tetrameri ($[4M+H]^+$), la m/z 493, 739 și, respectiv, 985. La adăugarea ionilor de cupru se formează complecși care sunt ușor de recunoscut la concentrații mici (Fig. 1, c), și foarte greu de identificat la pH 10,6. Utilizând programul instrumentului au fost atribuite valorile m/z tuturor ionilor complecși.

Exemplu 2. Se procedează ca în exemplul 1, dar se analizează complecșii glutationului, o tripeptidă γ -glutamyl-cisteinil-glicină care conține gruparea chimică SH, ce poate lega puternic ionii metalelor grele. Glutationul a avut concentrația de $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$, iar raportul molar cupru/glutacion a fost 1/1. O soluție apoasă de 2,5% etanolamină cu pH-ul 11.89 a fost adăugată în proporție de 10% pentru a crește pH-ul soluției de glutacion-ioni de cupru de la pH 6.0 la pH 11.23. Alte soluții au avut pH-ul 11.4 (etanolamină 0,25%) și pH-ul 10,9 (etanolamină 0,025%). Din figura 2 se remarcă faptul că soluția alcalină induce oxidarea parțială a grupărilor SH, iar în prezența ionilor de cupru, spectrul devine mai complicat în raport cu acela realizat la pH 4.0. Aceasta demonstrează capacitatea acestei metode de a pune în evidență fenomenele care se petrec între proteine și ionii metalici pe măsură ce pH-ul crește. La valori mari de pH se remarcă formarea complecșilor cu legături între gruparea CONH și metal, în timp ce grupele SH sunt transformate în legături disulfidice -S-S-. Aceste procese pot fi evidențiate numai prin această metodă, anterior nefiind descrisă în literatură observarea directă a oxidării grupărilor SH în mediu alcalin sau în prezența ionilor metalici.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN

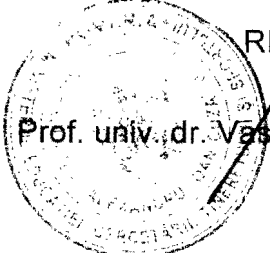


Revendicări

1. Metodă de determinare a legării ionilor metalici la peptide și proteine la valori înalte de pH **caracterizat prin aceea că**, la soluțiile de analizat se adaugă proporții diferite de etanolamină, di- sau trietanolamină pentru creșterea pH-ului până la valoarea dorită și efectuarea măsurărilor de masă cu un spectrometru de masă cu capcană de ioni și ionizare cu electrospray.

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** spectrele obținute pentru complecșii metalelor cu peptidele și proteinele la valori înalte de pH sunt descifrate fie prin utilizarea unor spectre suplimentare realizate la concentrații mai reduse în ioni metalici și la valori mai scăzute de pH, fie prin calculul m/z al complecșilor prevăzuți, identificarea lor în spectru și utilizarea opțiunii "state charge ruler" din programul "data analysis" pentru stabilirea valorilor m/z ale tuturos complecșilor apăruți în spectrul de masă.

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN



Rezultatele prezintă importanță deosebită pentru studiile de biochimie și medicină, deoarece glutationul este un agent de detoxifiere a celulelor vii.

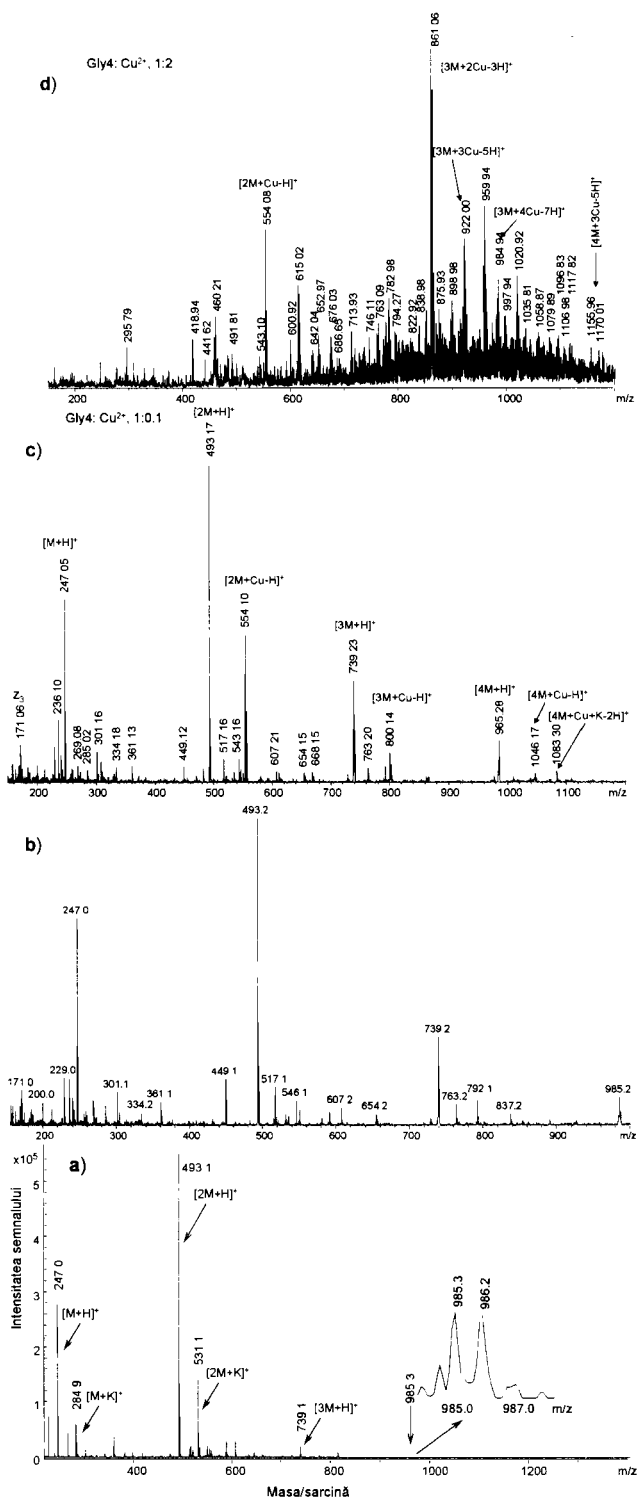


Figura 1. Spectrele de masă ESI ion trap MS ale tetrapeptidei Gly4 (GGGG) în mediu acid (a), alcalin, pH 10,6 (b), în prezența ionilor de cupru (c și d).

RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN

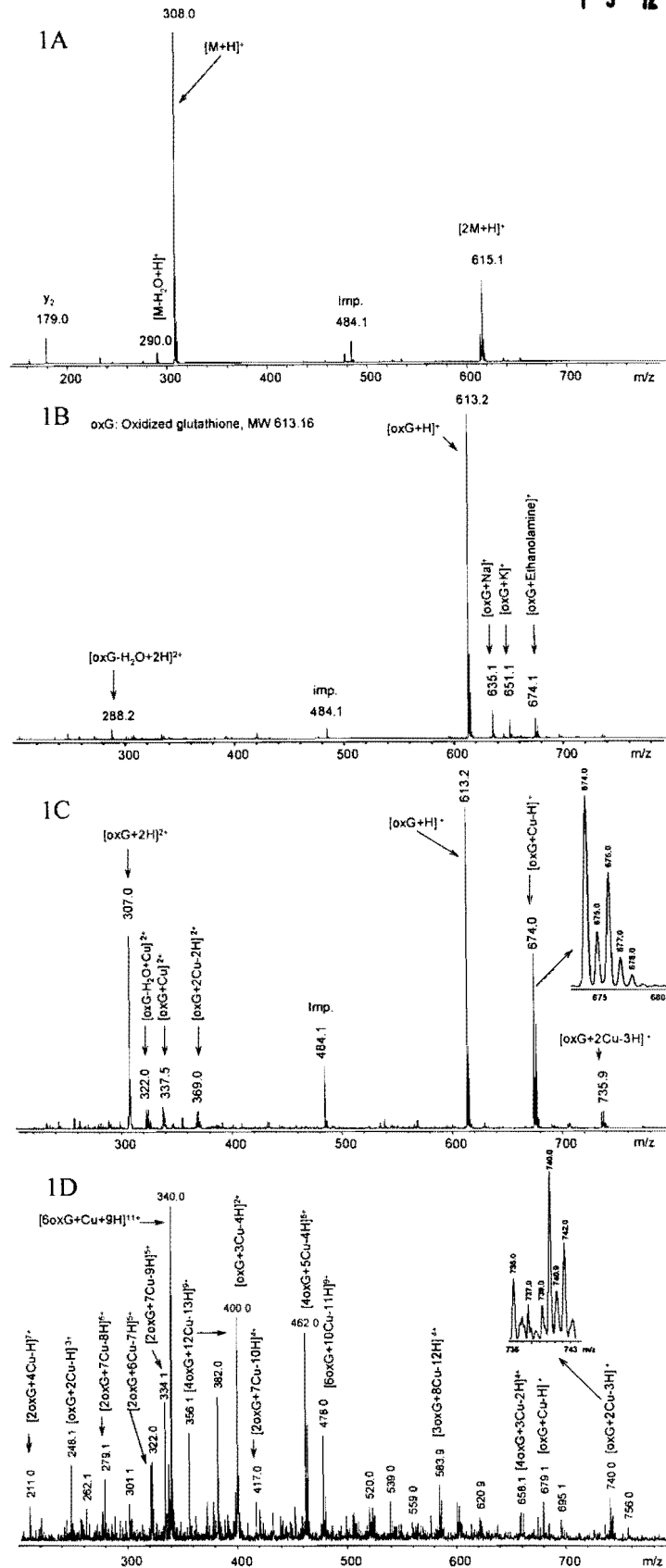
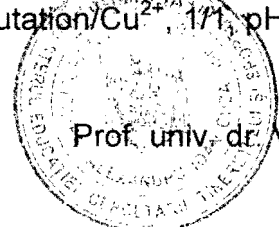


Figura 2. Spectrele de masă ESI ion trap MS ale glutationului și complecșilor săi cu ionii de cupru la diferite valori de pH: 1A – glutation, 10 pmol/μL, pH 4.0; 1B – glutatione, 10 pmol/μL, pH 10.9; 1C – glutation/Cu²⁺, 1/1, pH 4.0; și 1D – glutation/Cu²⁺, 1/1, pH 10.9.



RECTOR,
Prof. univ. dr. Vasile ISAN