

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de junio de 2013 (20.06.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/087963 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070864

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de diciembre de 2012 (13.12.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
PCT/ES2011/070869
15 de diciembre de 2011 (15.12.2011) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];
Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **RISCO ORTIZ, Cristina**; Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Darwin, 3 - Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **DE GROOT, Raoul Junior**; Dahlistraat 11, NL-3434 HB Nieuwegein (NL).

(74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,

BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING A PARTICULAR PROTEIN IN A CELL, USING A MARKER PEPTIDE AND SPECTROSCOPY TECHNIQUES AND USES THEREOF

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR UNA PROTEÍNA DE INTERÉS EN UNA CÉLULA MEDIANTE UN PÉPTIDO MARCADOR Y TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to a method that can be used to view and detect a particular protein in a cell, a cell organ or a virus, using a marker peptide bound to metal particles and using correlative, optical and electronic microscopy images, in which the microscopically obtained image is analysed together with at least one elementary image obtained using a spectroscopy technique. This method can be used to study the biological action of proteins of biomedical interest as well as to locate said proteins in different intracellular organelles with considerable sensitivity.

(57) Resumen: La invención describe un procedimiento útil para la visualización y detección de una proteína de interés en una célula, en un orgánulo celular o en un virus mediante un péptido marcador unido a partículas de metal y mediante imágenes de microscopía correlativa, óptica y electrónica, y donde la imagen obtenida por microscopía se analiza conjuntamente con, al menos, una imagen elemental obtenida mediante una técnica de espectroscopía. Este procedimiento permite el estudio de la acción biológica de proteínas de interés biomédico así como la localización de las mismas en los distintos orgánulos intracelulares con una considerable sensibilidad.



WO 2013/087963 A1

PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR UNA PROTEÍNA DE INTERÉS EN UNA CÉLULA MEDIANTE UN PÉPTIDO MARCADOR Y TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA Y SUS APLICACIONES

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y de la microscopía, y más concretamente, de las técnicas de microscopía correlativa en combinación con el uso de marcadores clonables, aplicadas a la detección de
10 metales unidos a proteínas de interés.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las técnicas de microscopía electrónica en combinación con el uso de grupos de
15 átomos de oro unidos covalentemente entre sí y a una pequeña molécula, en unos casos, o con la utilización de anticuerpos primarios, en otros, permiten el marcaje y visualización de proteínas de la célula de una forma no siempre satisfactoria. Entre las desventajas que presentan estas técnicas, destacan: la falta de aplicación *in vivo*; la limitada sensibilidad; y la limitada resolución para
20 localizar las proteínas *in situ*.

Recientemente, se han comenzado a utilizar marcadores clonables, por su considerable capacidad para localizar la práctica totalidad de las moléculas de las proteínas de interés dentro de las células. Así por ejemplo, la metalotioneína
25 (MT), una pequeña proteína que carece de estructura secundaria y que se pliega al unir metales, al ser tratada con sales de oro, forma partículas densas a los electrones *in vitro* (Mercogliano y DeRosier, 2006, *J. Mol. Biol.*, 355: 211-223; Mercogliano y DeRosier, 2007, *J. Struct. Biol.*, 160(1):70-82), posicionándose como un excelente marcador clonable para microscopía electrónica
30 (WO2006118615).

Algunos estudios demuestran la visualización en dos dimensiones (2D) y tres dimensiones (3D) con una sensibilidad muy alta, de proteínas quiméricas fusionadas a la MT en bacterias, mediante tratamientos de las células vivas con sales de oro y procesamientos de las mismas para su posterior visualización en
5 microscopía electrónica, aunque únicamente en células procariontas (Diestra E., *et al.*, 2009, *J Struct Biol*, 165:157-168; Diestra E., *et al.*, 2009, *PLoS ONE* 4:e8301).

Ha existido durante mucho tiempo la necesidad de disponer de técnicas de microscopía electrónica, y sus derivados en microscopía óptica más adecuadas,
10 asociadas al uso de marcadores clonables, que no solo permitan visualizar las proteínas *in vivo* en su entorno intracelular nativo en células procariontas sin depender del reconocimiento antígeno-anticuerpo, sino que también pudieran ser aplicadas a estudios de visualización de moléculas individuales de proteínas en células eucariotas vivas con una alta sensibilidad y resolución. Estas técnicas
15 permitirían la elaboración de mapas macromoleculares en 2D y 3D de las células eucariotas para obtener información relevante de las estructuras que mantienen las funciones celulares, ampliando así sus aplicaciones en biología.

Recientemente, la solicitud de patente española P201031880 titulada "Marcador clonable para su uso en microscopía" ha aportado soluciones técnicas en el
20 campo de la visualización de proteínas *in vivo* en células procariontas y eucariotas, a través de técnicas de microscopía, utilizando como marcador clonable un péptido o fragmentos de menor tamaño del mismo, que presentan una secuencia aminoacídica conformada por un esqueleto de cisteínas de la secuencia de la metalotioneína (MT) y aminoácidos de pequeño tamaño sin carga, fusionado o no
25 a una proteína marcadora. La presente solicitud PCT reivindica materia inventiva incorporada en la solicitud PCT de la prioridad ES201031880 presentada el 17 de diciembre de 2010 (PCT/ES11/070869 solicitada el 15 de diciembre de 2011) y que se ha considerado como invención diferente a la prioridad ES201031880 y
30 que debe reclamar prioridad propia con fecha de 15 de diciembre de 2011. Al mismo tiempo que se presenta esta solicitud PCT se va a proceder a solicitar el

reconocimiento de su solicitud de prioridad en la Oficina Española de Patentes y Marcas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

Descripción Breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento útil para la visualización y detección de una proteína de interés en una célula, en un orgánulo celular o en un virus mediante un péptido marcador unido a nano-partículas de metal y mediante imágenes de microscopía correlativa óptica y electrónica, en adelante procedimiento de la invención, donde la imagen obtenida por microscopía se analiza conjuntamente con, al menos, una imagen elemental obtenida mediante una técnica de espectroscopía y mediante el análisis conjunto de diferentes niveles de observación, que se visualizan simultáneamente tras superposición a nivel computacional (pixel a pixel) y porque dicho procedimiento comprende:

- a) expresar al menos un péptido en una célula, en un orgánulo celular o en un virus,
- b) tratar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (a) con un metal, y
- c) analizar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (b) mediante microscopía y, también mediante, al menos, una imagen elemental obtenida mediante espectroscopía, e identificar la proteína de interés.

Un objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el péptido marcador de a) comprende una secuencia de aminoácidos, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a la 6, una cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 ó más cisteínas o cualquier secuencia de aminoácidos constituida por una combinación cualquiera de las mismas.

Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el metal del paso (b) se selecciona de la lista, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, siguiente: oro, plata, mercurio, cadmio, zinc, platino, bismuto, cobre, plomo o cobalto.

5

Una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el metal del paso (b) es oro, más preferentemente, oro en la forma de cloruro auroso (AuCl), cloruro aúrico (AuCl_3), aurotiomalato o el ácido cloroáurico (HAuCl_4).

10

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la técnica de espectroscopía de c) utilizada pertenece al siguiente grupo: espectroscopía electrónica de pérdida de energía (EELS, del inglés Electron Energy-Loss Spectroscopy) o espectroscopía de rayos X.

15

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde imagen elemental de c) es una imagen elemental del metal utilizado en el paso (b).

20

Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la imagen elemental es una imagen elemental de un metal perteneciente al siguiente grupo: imagen elemental de oro, una imagen elemental de plata, una imagen elemental de mercurio, una imagen elemental de cadmio, una imagen elemental de zinc, una imagen elemental de platino, una imagen elemental de bismuto, una imagen elemental de cobre, una imagen elemental de plomo y una imagen elemental de cobalto.

25

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde se realiza un proceso de extracción de ruido, preferentemente, la adquisición de imágenes adicionales seleccionando pérdidas de energía próximas a la pérdida de energía específica del elemento de interés, anteriores y

30

posteriores a la imagen elemental en el pico del espectro, para posteriormente restarlas de ésta última.

5 Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso del procedimiento de la invención para la identificación proteínas de interés biomédico en el interior de células, orgánulos celulares, virus.

Descripción Detallada

10 La presente invención se basa en que los inventores han observado que es posible incrementar considerablemente la sensibilidad de visualización y detección de proteínas de interés mediante imágenes de microscopía correlativa óptica y electrónica, cuando se analiza conjuntamente con, al menos, una imagen elemental obtenida mediante espectroscopía y el análisis conjunto de diferentes
15 niveles de observación. La ventaja competitiva descrita en la presente invención es que el uso de las imágenes elementales permite resolver el enmascaramiento que se produce al utilizar determinadas tinciones de materiales pesados en preparaciones para identificar proteínas de interés mediante técnicas de microscopía correlativa (ver Ejemplo 1).

20

La identificación de la proteína de interés se lleva a cabo mediante la detección de nanopartículas o átomos de metal unidos a, al menos, a dicha proteína de interés utilizando como punto de unión un péptido marcador fusionado a dicha proteína de interés.

25

En microscopía electrónica de transmisión convencional (MET), no todos los metales se visualizan bien como partículas densas a los electrones. Uno de los elementos más usados es el oro ya que es uno de los metales que mejor se puede visualizar por este tipo de microscopía. De igual forma, el uso de la imagen elemental descrito en la presente invención tiene como principal ventaja que
30 permite visualizar otros metales distintos de oro, sean densos o no a los electrones, y distinguirlos cuando se enmascaran con las tinciones. Con las

imágenes elementales la identificación no ofrece dudas, incluso para el oro, que no se localiza con claridad si está en cantidades pequeñas o si forma nanopartículas de menos de 1 nm (Figura 1). El uso de metales distintos al oro tiene ventajas adicionales si se pueden obtener imágenes elementales, ya que la afinidad de la MT es mayor para metales diferentes al oro: Hg²⁺ > Cu⁺ > Ag⁺ > Pb²⁺ > Cd²⁺ = Au⁺ > Zn²⁺ > Co²⁺ (Nielson et al., (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260: 5342-5350); Schmitz et al., (1980) The Binding of Gold (I) to Metallothionein. *J. Inorganic Biochemistry* 12:293-306).

10

La imagen elemental obtenida mediante espectroscopía proporciona además una sensibilidad mucho mayor que la visualización de nano-partículas densas a los electrones en microscopía electrónica celular ya sea mediante la constatación visual directa (Figura 1) o mediante la cuantificación mediante microscopía con espectroscopía de pérdida de energía, de rayos X o microscopía STEM (scanning transmission electron microscopy; LeBeau et al., (2010) Standardless atom counting in scanning transmission electron microscopy. *NanoLetters* 10, 4406-4408; Krivanek et al., (1991) EELS quantification near the single-atom detection level. *Microsc. Microanal. Microstruct.* 2, 257-267; Sousa et al., (2008) Determination of quantitative distributions of heavy-metal stain in biological specimens by annular dark-field STEM. *J. Struct. Biol.* 162, 14-28). El motivo es que en las imágenes elementales obtenidas mediante espectroscopía se detectan las proteínas de interés correctamente con muy pocos átomos de oro incorporados a las mismas y no se necesita el crecimiento de las nanopartículas hasta alcanzar el tamaño de 1 nm (formado por unos 40-60 átomos), que es el diámetro mínimo para su detección en células por microscopía electrónica. La presente invención representa importantes ventajas competitivas o comerciales ya que el procedimiento requiere menos tiempo de reacción, menor concentración de las sales de oro (abaratamiento del proceso), disminuyendo o eliminando así una posible toxicidad para aquellas células que pudieran ser particularmente sensibles a los metales (con los protocolos descritos se ha comprobado que no hay toxicidad en las líneas celulares con las que se ha trabajado); pero la principal

30

ventaja es que se detectan muchas más moléculas al visualizarse nano-partículas de menor tamaño, todas aquellas que incorporaron menos de 40 átomos de oro y que eran invisibles en MET convencional (Figura 1).

- 5 En el caso del oro, como se menciona anteriormente, la detección de las partículas de oro es muy específica, ya que el espectro de pérdida de energía permite la detección de dichas partículas incluso en muestras teñidas con sales de otros metales pesados, habitualmente empleadas para la tinción de la muestra y que normalmente las enmascaran en una imagen MET convencional (Figura 1).
- 10 De este modo, se consigue una imagen de alto contraste que permite el estudio detallado de la distribución de las moléculas de proteína junto con la visualización simultánea de la ultraestructura celular. Adicionalmente, permite obtener muchos más detalles sobre la localización subcelular de las proteínas que llevan el péptido marcador-oro, como por ejemplo la asociación a membranas intracelulares, la
- 15 orientación de las moléculas de proteína en un lado u otro de las membranas (lumen de orgánulos o citosol), o la asociación a complejos macromoleculares como ribosomas o elementos del citoesqueleto, todos ellos invisibles en ausencia de tinción en MET convencional. Por ello, en una realización más preferida de la anterior, la imagen elemental es una imagen oro obtenida por espectroscopía
- 20 electrónica de pérdida de energía.

La situación para cada elemento metálico anterior es diferente y en todos los casos se realiza un proceso de "extracción de ruido". Un "proceso de extracción de ruido" se refiere a un procedimiento que permite eliminar la señal no específica

25 que puede interferir o estar emborronando una imagen obtenida por una técnica microscópica (según la invención), para producir una imagen donde sólo aparece el elemento de interés. La extracción de ruido se hace siempre y se ha hecho en el ejemplo y resultados que se muestran en la Figura 1. Se realiza computacionalmente una vez adquiridas las imágenes de pérdida de energía

30 correspondiente al oro (específica), una zona inmediatamente anterior en el espectro y una posterior, que se sustraen a la específica. Para ello, se emplean diversos métodos, pero uno de los más utilizados consiste en adquirir imágenes

adicionales seleccionando pérdidas de energía próximas a la pérdida de energía específica del elemento de interés, anteriores y posteriores a la imagen elemental en el pico del espectro, para posteriormente restarlas de ésta última. A modo de ejemplo, y sin que sirva de limitación, el método más utilizado es el descrito por Egerton (Egerton, R.F. (1996) Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron
5 Microscope. Plenum Press, New York, USA).

La obtención de, al menos, una imagen elemental obtenida mediante una técnica de espectroscopía tal como se describe en la presente invención, conjuntamente
10 con la utilización de la expresión de un péptido marcador, el tratamiento con metales de las células y el procesamiento posterior, junto con las técnicas de microscopía correlativa - estos últimos elementos están descritos en la patente anterior ES201031880 a la cual se considera referencia para su descripción suficiente - presenta igualmente las siguientes ventajas ya descritas en dicha
15 patente:

- permite su aplicación a células vivas, tanto procariotas como eucariotas, a orgánulos celulares purificados o a virus, permitiendo visualizar las proteínas en su entorno intracelular nativo sin depender del reconocimiento antígeno-anticuerpo;
- 20 - no interfiere con la funcionalidad de las proteínas debido a su pequeño tamaño;
- puede emplearse para la detección de una o de varias proteínas de interés, ya que el uso simultáneo de varias copias del péptido marcador o de varios fragmentos del mismo de diferente longitud tratados con
25 metales dan lugar a la formación de partículas densas a los electrones de tamaño diferente, permitiendo así los marcajes múltiples para la localización de más de una proteína simultáneamente; y
- permite visualizar las moléculas en la proteína de interés con una alta sensibilidad y resolución (localización muy precisa), incluso la posición
30 de las moléculas individuales de proteínas y el detalle estructural en células eucariotas vivas.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento útil para la visualización y detección de una proteína de interés en una célula, en un orgánulo celular o en un virus mediante un péptido marcador unido a nano-partículas de metal y mediante imágenes de microscopía correlativa óptica y electrónica, en
5 adelante procedimiento de la invención, donde la imagen obtenida por microscopía se analiza conjuntamente con, al menos, una imagen elemental obtenida mediante una técnica de espectroscopía y mediante el análisis conjunto de diferentes niveles de observación, que se visualizan simultáneamente tras superposición a nivel computacional (pixel a pixel) y porque dicho procedimiento
10 comprende:

- d) expresar al menos un péptido en una célula, en un orgánulo celular o en un virus,
- e) tratar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (a) con un metal, y
- f) analizar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (b) mediante
15 microscopía y, también mediante, al menos, una imagen elemental obtenida mediante espectroscopía, e identificar la proteína de interés.

El término “microscopía” se refiere a una técnica empleada para producir imágenes visibles aumentadas de cualquier estructura perteneciente, a título
20 ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- microscopía óptica, por ejemplo, aunque sin limitarnos, microscopía óptica de campo brillante, de campo oscuro, de contraste de fases; microscopía diferencial de contraste de interferencia o DIC, de fluorescencia o confocal; y
- 25 - microscopía electrónica, por ejemplo, aunque sin limitarnos, de barrido o de transmisión; o microscopía correlativa.

Se entiende por “microscopía electrónica” tanto la microscopía electrónica de transmisión (MET) como la de barrido (SEM) y tanto la microscopía electrónica 2D
30 como la microscopía electrónica 3D.

Finalmente, se entiende por “microscopía correlativa” la técnica basada en el empleo de abordajes experimentales que permitan visualizar una muestra o espécimen a dos niveles de observación, por ejemplo, aunque sin limitarnos, microscopía óptica y microscopía electrónica, es decir, con técnicas microscópicas diferentes que normalmente proporcionan distintas resoluciones. La técnica correlativa a la que se alude en la presente invención (del inglés CLEM: correlative light and electron microscopy) selecciona las células que expresan una proteína (fusionada a GFP y al péptido que une metales) en el microscopio óptico (fluorescentes) para llevarlas a electrónico (para visualización del péptido-oro); de esta manera se visualizan las mismas moléculas en óptico y electrónico, en este último caso con resolución molecular (moléculas individuales).

Se considera que expresan el mismo significado las siguientes expresiones: “imagen elemental de oro”, “imagen de oro”, “imagen oro” o “mapa oro”.

15

El término “péptido marcador” tal como se usa en la presente invención se refiere a un péptido útil para la detección de proteínas de interés por microscopía, preferiblemente electrónica o correlativa por su capacidad de unión a moléculas de metales que posteriormente pueden ser identificadas mediante técnicas microscópicas. A título de ejemplo, y sin que represente una limitación al alcance de la invención, se ha utilizado en la invención un péptido marcador clonable cuya secuencia aminoacídica ha sido diseñada en base al esqueleto de cisteínas de la secuencia de la metalotioneína (MT) pero donde el resto de los aminoácidos han sido sustituidos por aminoácidos de pequeño tamaño sin carga. Esta definición también se refiere a fragmentos de menor tamaño de dicho péptido marcador. Además, cualquier otro péptido marcador con afinidad por metales puede utilizarse en el procedimiento de la invención, como por ejemplo el marcador de tetra-cisteínas (Gaietta et al., (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. Science 296, 503-507).

25
30

Más concretamente, para la ejecución del procedimiento de la presente invención se puede usar un péptido marcador basado en la MT endógena constituida por la

secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4 o cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 o más cisteínas, preferiblemente que comprenda 8 o más cisteínas, más preferiblemente que comprenda 9 o más cisteínas. La SEQ ID NO: 4 equivale a la secuencia de la MT completa. Cualquier otra secuencia de aminoácidos que comprenda dicha SEQ ID NO4, sus variantes menores o combinaciones de las mismas pueden ser utilizadas igualmente en el marco del procedimiento de la invención.

Un posible péptido marcador está constituido por la SEQ ID NO1, que comprende 20 cisteínas (en la SEQ ID NO1 se conservó las cisteínas eliminando los residuos 1, 2, 11, 12, 32 y 54 para hacer un péptido lo más pequeño posible, el resultado es un péptido de 53 aminoácidos).

Otro posible péptido marcador está constituido por la SEQ ID NO: 2, fragmento correspondiente a los aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID NO: 1 y que comprende 9 cisteínas (equivaldría al dominio beta de la MT pero con 25 aminoácidos en vez de 29).

Otro posible péptido marcador está constituido por la SEQ ID NO: 3, fragmento correspondiente a los aminoácidos 26 a 53 de la SEQ ID NO: 1 y que comprende 11 cisteínas.

Otro posible péptido marcador está constituido por la SEQ ID NO: 5, fragmento correspondiente a los aminoácidos 1 a 29 de la SEQ ID NO: 4 y que comprende 9 cisteínas (equivale a la beta-MT completa).

Otro posible péptido marcador está constituido por la SEQ ID NO: 6, fragmento correspondiente a los aminoácidos 30 a 61 de la SEQ ID NO: 4 y que comprende 11 cisteínas (equivale a la alfa-MT completa).

30

El péptido marcador y sus variantes o derivados pueden ser sintetizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, in vitro. Por ejemplo, mediante la síntesis de

péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. El péptido marcador puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitar el alcance de la invención, una
5 secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de corte para una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal del polipéptido.

El péptido marcador utilizado puede presentar variantes. Estas variantes se refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el
10 mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones son por aminoácidos conservados. Los aminoácidos conservados son aminoácidos que tienen cadenas laterales y
15 propiedades similares en cuanto a, por ejemplo, hidrofobicidad o aromaticidad. Estas sustituciones son entre serina (Ser) y treonina (Thr), y/o entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Estas variaciones no
20 provocan modificaciones esenciales en las características o propiedades esenciales del péptido. Por ello, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homóloga, en el sentido descrito en este párrafo, a las secuencias descritas en la presente invención.

25

En otra realización preferida, el péptido marcador se encuentra fusionado a una proteína de interés. El término "proteína de interés", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier péptido o polipéptido de interés cuya localización por microscopía se desee llevar a cabo, e incluye cualquier
30 macromolécula intracelular, extracelular o viral, formada por una cadena lineal de aminoácidos. Este término incluye, sin limitarse, tanto las proteínas simples como las conjugadas o heteroproteínas y se refiere por ejemplo, aunque sin limitarnos,

a proteínas estructurales, reguladoras (como por ejemplo, aunque sin limitarnos, hormonas), transportadoras, defensivas (como por ejemplo, aunque sin limitarnos, anticuerpos), enzimáticas o contráctiles.

5 En otra realización preferida, el péptido marcador utilizado en la presente invención se encuentra fusionado a una proteína marcadora. En una realización más preferida, el péptido marcador se encuentra fusionado a una proteína y a una proteína marcadora. Se entiende por "proteína marcadora" o "proteína reporter" cualquier proteína que proporciona, al sistema donde se expresa, características
10 identificables visualmente, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorescencia o luminiscencia. Ejemplos de proteínas marcadoras son, aunque sin limitarnos, β -galactosidasa, luciferasa, GUS (β -glucuronidasa) o proteínas fluorescentes derivadas de la GFP, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, Green Fluorescent Protein o proteína verde fluorescente (GFP), Red Fluorescent Protein o proteína roja fluorescente (RFP), Cyan Fluorescent Protein o proteína cyan fluorescente (CFP), Yellow Fluorescent Protein o proteína amarilla fluorescente (YFP) o Blue Fluorescent Protein o proteína azul fluorescente (BFP). En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, la proteína marcadora es GFP, la cual es una proteína de 238 aminoácidos (26,9 kDa) aislada de la medusa
15 Aequorea victoria que emite fluorescencia de color verde al ser expuesta a luz azul.

La fusión proteica es una técnica que se emplea frecuentemente en biología molecular y que puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas por un
25 experto en la materia. Habitualmente está relacionada con la producción de proteínas en sistemas vivos, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, en células (tanto procariotas, como las bacterias, como eucariotas, como las levaduras, células de mamífero o células de insecto), en orgánulos celulares o en virus. La fusión proteica consiste en el clonaje de la secuencia codificante de una proteína
30 de interés en un extremo, preferiblemente el extremo 3' (extremo carboxilo), de otro péptido. La inclusión de la secuencia codificante de la proteína de interés ha de realizarse en fase, respetando la pauta de lectura, de manera que permita la

producción de una proteína quimérica, que en el caso de la presente invención consistiría, aunque sin limitarnos, en el péptido marcador fusionado a una proteína, en el péptido de la invención fusionado a una proteína marcadora, o en el péptido de la invención fusionado a una proteína y a una proteína marcadora.

5

El péptido marcador utilizado en la invención carece de estructura secundaria y se pliega al unir átomos de metal. Dicha unión es, preferiblemente, de tipo iónico entre los átomos de metal y los residuos de cisteína de dicho péptido, aunque también átomos de metal adicionales pueden incorporarse al grupo de átomos de metal ya unidos al péptido marcador, dichos átomos de metal adicionales se unen covalentemente entre ellos y a los átomos que ya están unidos a las cisteínas del péptido de la invención. Por ello, en otra realización preferida, el péptido marcador además comprende unido un grupo de átomos de metal. Los metales que pueden unirse a este péptido marcador son, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, todos aquellos útiles para llevar a cabo marcajes en microscopía electrónica, preferiblemente, metales pesados. Así, en una realización más preferida, el metal se selecciona de la lista que comprende: oro (Au), plata (Ag), mercurio (Hg), cadmio (Cd), zinc (Zn), platino (Pt), bismuto (Bi), cobre (Cu), plomo (Pb) y Cobalto (Co). En una realización aun más preferida, el metal es oro.

20

El tamaño del "grupo de átomos de metal" unido al péptido marcador utilizado en la presente invención es, como mínimo, el necesario para que las técnicas de microscopía electrónica lo detecten. Dicho tamaño, así como el número de átomos de metal que forman el grupo y su estabilidad durante la irradiación en el microscopio electrónico se pueden monitorizar mediante por ejemplo, aunque sin limitarnos, microscopía electrónica, espectrometría de masas o técnicas espectroscópicas.

25

Un objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el péptido marcador de a) comprende una secuencia de aminoácidos, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a la 6, una

30

5 cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 ó más cisteínas o cualquier secuencia de aminoácidos constituida por una combinación cualquiera de las mismas. Un experto en el estado de la técnica puede obtener un péptido marcador con estas secuencias SEQ ID NO: 1 a la 6, sus fragmentos o combinaciones, fusionadas a otras secuencias de aminoácidos diferentes que tengan también afinidad por átomos de metales.

10 Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el péptido marcador de a) está constituido por una secuencia de aminoácidos, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 ó más cisteínas o cualquier secuencia de aminoácidos constituida por una combinación cualquiera de las mismas.

15

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el péptido marcador de a) está fusionado a una proteína, preferentemente una proteína marcadora, y más preferentemente, esta fusionada a la proteína GFP.

20

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el péptido marcador de a) además comprende un grupo de átomos de metal tras el paso b).

25

Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el metal del paso (b) se selecciona de la lista, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, siguiente: oro, plata, mercurio, cadmio, zinc, platino, bismuto, cobre, plomo o cobalto.

30

Una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde el metal del paso (b) es oro, más preferentemente, oro en la

forma de cloruro auroso (AuCl), cloruro aúrico (AuCl_3), aurotiomalato o el ácido cloroáurico (HAuCl_4).

5 Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde además comprende, entre los pasos (b) y (c), una etapa de fijación de la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (b) mediante fijación química o congelación y la realización de secciones de entre 20 y 500 nm de la célula, el orgánulo celular o el virus previamente fijados.

10 Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la técnica de espectroscopía de c) utilizada pertenece al siguiente grupo: espectroscopía electrónica de pérdida de energía (EELS, del inglés Electron Energy-Loss Spectroscopy) o espectroscopía de rayos X.

15 Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde imagen elemental de c) es una imagen elemental del metal utilizado en el paso (b).

20 Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la imagen elemental es una imagen elemental de un metal perteneciente al siguiente grupo: imagen elemental de oro, una imagen elemental de plata, una imagen elemental de mercurio, una imagen elemental de cadmio, una imagen elemental de zinc, una imagen elemental de platino, una imagen elemental de bismuto, una imagen elemental de cobre, una imagen elemental de plomo y una imagen elemental de cobalto.

30 Otro objeto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la imagen elemental es una imagen oro, y más preferentemente, donde la imagen oro se obtiene por espectroscopía electrónica de pérdida de energía, y aun más preferentemente, la imagen oro se obtiene con equipos espectroscópicos que están acoplados a microscopios electrónicos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la expresión del péptido en el paso (a) se realiza en una célula y porque el tratamiento del paso (b) se realiza con cloruro auroso (AuCl), cloruro aúrico (AuCl₃), aurotiomalato o ácido cloroáurico (HAuCl₄) a una concentración de entre 0,1 y 50 mM, preferentemente, durante entre 5 y 60 minutos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la célula del paso (c) se analiza para la visualización de al menos una proteína de superficie celular y/o de al menos una proteína endocitada *in vivo*.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde además comprende una etapa de permeabilización selectiva de la membrana celular entre los pasos (a) y (b), preferentemente mediante Streptolisina O.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la célula del paso (c) se analiza para la visualización de al menos una proteína intracelular.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la expresión del péptido en el paso (a) se realiza en un orgánulo celular o en un virus y porque el tratamiento del paso (b) se realiza con cloruro auroso (AuCl), cloruro aúrico (AuCl₃) o ácido cloroáurico (HAuCl₄) a una concentración de entre 0,1 y 5 mM, preferentemente durante entre 5 y 30 minutos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde en el paso (a) se expresan, en una célula, en un orgánulo celular o en un virus, dos o más péptidos de distinto tamaño fusionados a proteínas marcadores diferentes y, alternativamente, a proteínas marcadoras de diferente color.

Otro objeto más particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la célula es eucariota.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde se realiza un proceso de extracción de ruido, preferentemente, la adquisición de imágenes adicionales seleccionando pérdidas de energía próximas a la pérdida de energía específica del elemento de interés, anteriores y posteriores a la imagen elemental en el pico del espectro, para posteriormente restarlas de ésta última.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso del procedimiento de la invención para la identificación proteínas de interés biomédico en el interior de células, orgánulos celulares, virus.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Comparativa visual de las proteínas quiméricas de MT1 en un orgánulo de replicación del virus Rubella con técnicas convencionales de EMT y el procedimiento de la presente invención. (A) Visualización de las

quimeras de MT1 mediante una imagen de microscopía electrónica de transmisión convencional donde se aprecian las nano-partículas de oro densas a los electrones asociados a MT1 (flechas). **(B)** Imagen del orgánulo con MT1 teñido con sales de metales pesados mediante una imagen de microscopía electrónica de transmisión convencional, donde se aprecia la ultraestructura del orgánulo, que está lleno de membranas condensadas, pero ya no se detectan las nano-partículas de oro de MT1. (C) a (E) Procedimiento de la presente invención.

(C) Visualización por MET convencional del orgánulo en sección de una célula teñida con sales de metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo). En la imagen de MET convencional las nano-partículas de oro asociadas a las moléculas de P150-MT1 están enmascaradas por la tinción de materiales pesados. Partículas de oro coloidal de mayor tamaño (10 nm) (flechas). **(D)** Detección de las moléculas de P150-MT1-oro en el mismo orgánulo mediante

imagen elemental obtenida con espectroscopía de pérdida de energía tras la sustracción del fondo no específico (mapa oro). **(E)** Imagen de oro elemental en sección del orgánulo teñida con sales de metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo) y procesada mediante espectroscopía de pérdida de energía para la obtención de dicha imagen oro. La imagen elemental de oro se ha coloreado en verde computacionalmente, (no se trata de señal fluorescente) y se ha superpuesto a la imagen de ultraestructura. Esta superposición muestra la distribución detallada de las moléculas de P150-MT1-oro en los distintos subdominios del orgánulo. Barras: 200.

10

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Para una mejor comprensión de la invención se adjunta el siguiente ejemplo que no pretende ser limitante en cuanto a su aplicación.

15

Ejemplo 1.- Localización de proteínas quiméricas-MT1-oro en orgánulos densos de células mediante análisis espectroscópico e imágenes elementales (mapas oro).

20

Se preparó una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína quimérica que comprende la subunidad P150 de la replicasa viral fusionada con el péptido metalotioneína 1 de ratón (P150-MT1) tal como se describe en la patente ES201031880, que permite la expresión de dicha proteína quimérica en el interior de células, orgánulos o virus.

25

30

Más concretamente, primeramente se transfectaron células de mamífero BHK-21 cultivadas en monocapa con un replicón del virus Rubella que permite la expresión de la proteína quimérica P150-MT1 *in vivo*, se incubaron con AuCl_3 1mM durante 30 minutos a 37°C, se fijaron con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,1% en PBS (phosphate buffer saline), se deshidrataron en cantidades crecientes de etanol y se infiltraron en resina acrílica, que una vez polimerizada por calor y endurecida, permitió la obtención de secciones ultrafinas

(50-70 nm) seriadas de la muestra en un ultramicrotomo; alternativamente, las muestras fijadas con aldehídos fueron congeladas a alta velocidad en etano líquido, deshidratadas por criosustitución en metanol a -90°C durante dos días e infiltradas en resina acrílica que fue polimerizada y endurecida con luz ultravioleta.

5 Las secciones fueron recolectadas en rejillas de microscopía electrónica para su tinción con acetato de uranilo saturado (25 min) y citrato de plomo (2 min), se lavaron con agua y se dejaron secar antes de su visualización por microscopía electrónica de transmisión (MET) convencional; se estudiaron los orgánulos perinucleares densos de las células (lisosomas modificados donde se ensamblan

10 los complejos replicativos del virus). En las Figura 1B y 1C se aprecian los detalles ultraestructurales del orgánulo pero las nano-partículas de oro asociadas a las moléculas de P150-MT1 quedan enmascaradas por la tinción de materiales pesados. Sólo las partículas de oro coloidal de mayor tamaño (10 nm) añadidas a la sección a posteriori son visibles en una sección teñida (flechas, Figura 1C). Las

15 partículas de oro coloidal son inmunoglobulinas (IgG) adsorbidas a esferas del coloide y se trata de preparados comerciales que se usan en los ensayos de "immunogold". No tienen ninguna afinidad por el péptido marcador de la invención y se adsorben por atracción electrostática tras incubar las secciones con una suspensión de estas partículas durante 30 min a temperatura ambiente. La

20 incubación de estas partículas con oro coloidal se llevó a cabo antes de la tinción con metales pesados y del análisis elemental como confirmación interna de especificidad del análisis elemental objeto de la invención: se puede observar cómo las partículas de oro coloidal son detectadas claramente en los mapas oro (Figuras 1C y 1D, flechas). En una imagen MET convencional las partículas de

25 oro asociadas a la proteínas P150-MT1 se visualizan perfectamente como pequeñas estructuras densas a los electrones (Figura 1A).

Posteriormente, para la detección de las moléculas P150-MT1-oro que quedan enmascaradas en la tinción anterior con metales pesados, se obtuvo una imagen

30 oro elemental mediante espectroscopía de pérdida de energía tras la sustracción del fondo no específico (mapa oro, Figura 1D) de acuerdo al procedimiento de la presente invención. La extracción de ruido hubo de hacerse para obtener el mapa

oro que se presenta en la Figura 1D. Esta extracción se realizó computacionalmente una vez adquiridas las imágenes de pérdida de energía correspondiente al oro (específica), una zona inmediatamente anterior en el espectro y una posterior, que se sustraen a la específica. Para la extracción de ruido y la elaboración de mapas elementales específicos en este ejemplo se empleó el procedimiento de Egerton (Egerton, R.F. (1996) Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope. Plenum Press, New York, USA).

Finalmente, la superposición del mapa oro de D) sobre la imagen MET convencional de C) mostró la distribución detallada de las moléculas de P150-MT1-oro en los distintos subdominios del orgánulo (Figura 1E). El orgánulo está lleno de membranas a las que se asocian las moléculas de P150-MT1-oro como puede apreciarse en la tinción del mismo (Figura 1C) y en particular en la superposición del mapa oro sobre la ultraestructura mostrada por la tinción (Figura 1E). Sin embargo, en la imagen oro obtenida por el procedimiento de la invención se detectan muchas más moléculas P150-MT1-oro que se encuentran ocupando todo el interior del orgánulo de replicación (esto es constatable comparando las Figuras 1A con 1E).

Además, sólo en la Figura 1E se puede apreciar la distribución precisa de las moléculas de proteína que llevan el péptido marcador de MT1 y su distribución dentro del orgánulo. Se observa también que las moléculas llenan por completo el orgánulo y se asocian a las membranas exclusivamente, mientras que en la imagen de MET convencional sólo se visualizaron las moléculas en las que se formaron las nano-partículas más grandes (de al menos 1 nm), que se concentran únicamente en una zona inferior del orgánulo (flechas en Figura 1A); en MET convencional tampoco es posible visualizar las membranas a las que están asociadas las nano-partículas (flechas en Figura 1A).

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento útil para la visualización y detección de una proteína de interés en una célula, en un orgánulo celular o en un virus mediante un péptido marcador unido a partículas de metal y mediante imágenes de microscopía correlativa, ya sea óptica o electrónica, caracterizado porque la imagen obtenida por microscopía se analiza conjuntamente con, al menos, una imagen elemental obtenida mediante una técnica de espectroscopía y mediante el análisis conjunto de diferentes niveles de observación, que se visualizan simultáneamente tras superposición a nivel computacional y porque dicho procedimiento comprende:

- a) expresar al menos un péptido marcador en una célula, en un orgánulo celular o en un virus,
- b) tratar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (a) con un metal, y
- c) analizar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (b) mediante microscopía y, también mediante, al menos, una imagen elemental obtenida mediante espectroscopía.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el péptido marcador de a) está constituido por una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 ó más cisteínas o cualquier secuencia de aminoácidos constituida por una combinación cualquiera de las mismas.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2 caracterizado porque el péptido marcador de a) está constituido por una secuencia de aminoácidos perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, cualquiera de sus fragmentos que comprenda 7 ó más cisteínas o cualquier secuencia de aminoácidos constituida por una combinación cualquiera de las mismas.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque el péptido marcador de a) está fusionado a una proteína.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque la proteína es proteína marcadora.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5 caracterizado porque la proteína marcadora es la proteína GFP.

10 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6 caracterizado porque el péptido marcador además comprende un grupo de átomos de metal tras el paso b).

15 8.- Procedimiento según la reivindicación 7 caracterizado porque el metal del paso (b) se selecciona de la lista que comprende: oro, plata, mercurio, cadmio, zinc, platino, bismuto, cobre, plomo o cobalto.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones 7 y 8 caracterizado porque el metal del paso (b) es oro.

20

10.- Procedimiento según la reivindicación 9 caracterizado porque la fuente de oro es cloruro auroso, cloruro aúrico, aurotiomalato o ácido cloroáurico.

25 11.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 10 caracterizado porque además comprende, entre los pasos (b) y (c), fijar la célula, el orgánulo celular o el virus del paso (b) mediante fijación química o congelación y realizar secciones de entre 20 y 500 nm de la célula, el orgánulo celular o el virus previamente fijados.

30 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 11 caracterizado porque la técnica de espectroscopía utilizada pertenece al siguiente

grupo: espectroscopía electrónica de pérdida de energía o espectroscopía de rayos X.

5 13.- Procedimiento según la reivindicación 12 caracterizado porque la imagen elemental de c) es una imagen elemental del metal del paso (b).

10 14.- Procedimiento según las reivindicaciones 12 y 13 caracterizado porque la imagen elemental es una imagen elemental de un metal perteneciente al siguiente grupo: imagen elemental de oro, una imagen elemental de plata, una imagen elemental de mercurio, una imagen elemental de cadmio, una imagen elemental de zinc, una imagen elemental de platino, una imagen elemental de bismuto, una imagen elemental de cobre, una imagen elemental de plomo o una imagen elemental de cobalto.

15 15.- Procedimiento según las reivindicaciones 12 y 13 caracterizado porque la imagen elemental es una imagen oro.

20 16.- Procedimiento según la reivindicación 15 caracterizado porque la imagen oro se obtiene por espectroscopía electrónica de pérdida de energía.

17.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 16 caracterizado porque la obtención de la imagen elemental se realiza con equipos espectroscópicos que están acoplados a microscopios electrónicos.

25 18.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 17 caracterizado porque la expresión del péptido en el paso (a) se realiza en una célula y porque el tratamiento del paso (b) se realiza con cloruro auroso (AuCl), cloruro aurico (AuCl_3), aurotiomalato o ácido cloroáurico (HAuCl_4) a una concentración de entre 0,1 y 50 mM.

30

19.- Procedimiento según la reivindicación 18 caracterizado porque el tratamiento del paso (b) se realiza durante entre 5 y 60 minutos.

20.- Procedimiento según las reivindicaciones 18 y 19 caracterizado porque la célula del paso (c) se analiza para la visualización de al menos una proteína de superficie celular y/o de al menos una proteína endocitada *in vivo*.

5 21.- Procedimiento según las reivindicaciones 18 y 19 caracterizado porque además comprende permeabilizar selectivamente la membrana celular entre los pasos (a) y (b).

10 22.- Procedimiento según la reivindicación 21 caracterizado porque la permeabilización selectiva de la membrana celular se realiza mediante Streptolisina O.

15 23.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 22 donde la célula del paso (c) se analiza para la visualización de al menos una proteína intracelular.

20 24.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 16 caracterizado porque la expresión del péptido en el paso (a) se realiza en un orgánulo celular o en un virus y porque el tratamiento del paso (b) se realiza con cloruro auroso, cloruro aúrico o ácido cloroáurico a una concentración de entre 0,1 y 5 mM.

25 25.- Procedimiento según la reivindicación 24 caracterizado porque el tratamiento del paso (b) se realiza durante entre 5 y 30 minutos.

30 26.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 25 caracterizado porque en el paso (a) se expresan, en una célula, en un orgánulo celular o en un virus, dos o más péptidos de distinto tamaño fusionados a proteínas marcadores diferentes y, alternativamente, a proteínas marcadoras de diferente color.

27.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 26 caracterizado porque la célula es eucariota.

5 28.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 27 caracterizado porque la imagen elemental de c) se obtiene mediante un proceso de extracción de ruido.

10 29.- Procedimiento según la reivindicación 28 caracterizado porque el proceso de extracción de ruido consiste en la adquisición de imágenes adicionales seleccionando pérdidas de energía próximas a la pérdida de energía específica del elemento de interés, anteriores y posteriores a la imagen elemental en el pico del espectro, para posteriormente restarlas de ésta última.

15 30.- Uso del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 29 para la identificación proteínas de interés biomédico en el interior de células, orgánulos celulares, virus.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N33/68 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006118615 A2 (BRANDEIS UNIVERSITY) 09.11.2006, claims.	1-30 1-30
X Y	DIESTRA, E. et al. "Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy". JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY. March 2009. Vol. 165, N°. 3, pages 157-168; the whole document.	1-30 1-30
X Y	DIESTRA, E. et al. "Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane". PLOSONE. December 2009. Vol. 4, N°. 12, pages 1-10; the whole document.	1-30 1-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15/04/2013	Date of mailing of the international search report (16/04/2013)	
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer M. Novoa Sanjurjo Telephone No. 91 3498466	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070864

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEAPMAN R.D. et al. "Biological electron energy loss spectroscopy: the present and the future". MICROSC. MICROANAL. MICROSTRUCT. April-June 1991. Vol. 2, N° 2-3, pages, 387-394. Abstract; paragraph 3.5.	1-30
Y	LEAPMAN, R.D. et al. "Phosphorylation and subunit organization of axonal neurofilaments determined by scanning transmission electron microscopy". PROC. NATL. ACAD. SCI. 22.07.1997. Vol. 94, N° 15, pages 7820-7824, abstract.	1-30
Y	DIOCIAIUTI, M. "Electron energy loss spectroscopy microanalysis and imaging in the transmission electron microscope: example of biological applications". JOURNAL OF ELECTRON SPECTROSCOPY. May 2005. Vol. 143, N°. 2-3, pages 189 - 203;abstract.	1-30
Y	EGERTON, R.F. "Electron energy-loss spectroscopy in the TEM". REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS. 01.01.2009. Vol. 72, N° 1, section 016502, pages 1-25, the whole document.	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070864

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2006118615 A2	09.11.2006	US2009239215 A1	24.09.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070864

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X Y	WO 2006118615 A2 (BRANDEIS UNIVERSITY) 09.11.2006, reivindicaciones.	1-30 1-30
X Y	DIESTRA, E. et al. "Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy". JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY. Marzo 2009. Vol. 165, Nº. 3, páginas 157-168; todo el documento.	1-30 1-30
X Y	DIESTRA, E. et al. "Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane". PLOSONE. Diciembre 2009. Vol. 4, Nº. 12, páginas 1-10; todo el documento.	1-30 1-30

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
15/04/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.

16 de abril de 2013 (16/04/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070864

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	LEAPMAN R.D. et al. "Biological electron energy loss spectroscopy: the present and the future". MICROSC. MICROANAL. MICROSTRUCT. Abril-Junio 1991. Vol. 2, N° 2-3, páginas, 387-394. Resumen; apartado 3.5.	1-30
Y	LEAPMAN, R.D. et al. "Phosphorylation and subunit organization of axonal neurofilaments determined by scanning transmission electron microscopy". PROC. NATL. ACAD. SCI. 22.07.1997. Vol. 94, N° 15, páginas 7820-7824, resumen.	1-30
Y	DIOCIAIUTI, M. "Electron energy loss spectroscopy microanalysis and imaging in the transmission electron microscope: example of biological applications". JOURNAL OF ELECTRON SPECTROSCOPY. Mayo 2005. Vol. 143, N°. 2-3, páginas 189-203; resumen.	1-30
Y	EGERTON, R.F. "Electron energy-loss spectroscopy in the TEM". REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS. 01.01.2009. Vol. 72, N° 1, artículo 016502, páginas 1-25, todo el documento.	1-30

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070864

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2006118615 A2	09.11.2006	US2009239215 A1	24.09.2009
