

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 288**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/185** (2006.01)  
**A61K 31/41** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08755064 .6**  
96 Fecha de presentación: **05.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2155185**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

54 Título: **Detección de succinilacetona**

30 Prioridad:  
**04.05.2007 US 744789**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.07.2012**

73 Titular/es:  
**PerkinElmer Health Sciences, Inc.**  
**940 Winter Street**  
**Waltham, MA 02451, US**  
**Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer di**  
**Firenze**

72 Inventor/es:  
**CERDA, Blas;**  
**CHERKASSKIY, Alex;**  
**LI, Yijun y**  
**LA MARCA, Giancarlo**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 384 288 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

Detección de succinilacetona.

## ANTECEDENTES

5 La espectrometría de masas es útil para detectar y medir una amplia diversidad de metabolitos, cuya presencia o cantidad puede ser indicativa de ciertas dolencias o trastornos. Así, se puede usar la espectrometría de masas, por ejemplo, para diagnosticar numerosos trastornos metabólicos asociados con niveles alterados de metabolitos. Un trastorno metabólico de este tipo es la tirosinemia hereditaria, Tipo I (HT1), que se produce por el déficit de fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) que se asocia con niveles altos de tirosina y succinilacetona. HT1 es un trastorno de la infancia que produce fallo hepático, crisis neurológicas dolorosas, raquitismo, y hepatocarcinoma. Si no se trata, se produce la muerte típicamente con menos de 2 años de edad, permitiendo la supervivencia de algunas formas crónicas hasta los 12 años de edad. Ahora es posible tratar HT1 con NTBC (o Nitisinona), si el tratamiento se inicia temprano en la vida. Así, hay un incentivo importante para identificar a los pacientes afectados por HT1 mediante cribado en los recién nacidos o incluso cribado prenatal.

## RESUMEN

15 La succinilacetona es un marcador primario para la detección temprana de HT1. Sin embargo, la succinilacetona es una cetona muy reactiva que forma conjugados con proteínas. Los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar para extraer succinilacetona de una muestra en condiciones que permiten extraer simultáneamente otros metabolitos, tales como aminoácidos, carnitina libre, o acilcarnitinas. Por ejemplo, se pueden evitar las condiciones de extracción severas (tales como acidez extrema y temperatura alta).

20 Los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar para detectar y/o medir succinilacetona y uno o más analitos biológicos adicionales usando espectrometría de masas (por ejemplo espectrometría de masas en tándem). Dichos procedimientos son útiles en diagnóstico y para generar perfiles metabólicos para la detección/diagnóstico de trastornos metabólicos tales como aminoacidopatías (por ejemplo, tirosinemia tipo I).

25 En un primer aspecto, la invención es un procedimiento para detectar una cetona biológicamente activa, comprendiendo el procedimiento:

poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada y una base fuerte;

derivatizar la cetona biológicamente activa en la muestra; y

30 evaluar la cetona biológicamente activa derivatizada en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem;

en el que la cetona biológicamente activa es succinilacetona o un esteroide.

Según un segundo aspecto, la invención es un procedimiento para extracción, comprendiendo el procedimiento:

35 poner en contacto una muestra con una disolución de extracción, comprendiendo la disolución de extracción: metanol y una base fuerte, en el que al poner en contacto la muestra con la disolución de extracción se produce un extracto que comprende:

(i) succinilacetona derivatizada;

(ii) uno o más aminoácidos;

(iii) carnitina libre;

(iv) una o más acilcarnitinas; o

40 (v) una forma derivatizada de (ii), (iii), o (iv) de la muestra, en el que la concentración de succinilacetona derivatizada en el extracto refleja la concentración de succinilacetona en la muestra, y en el que las concentraciones de uno o más aminoácidos, carnitina libre, una o más acilcarnitinas, o formas derivatizadas de las mismas en el extracto reflejan sus respectivas concentraciones en la muestra.

45 En un aspecto, la revelación proporciona un procedimiento para extracción. El procedimiento incluye las etapas de: poner en contacto una muestra con una disolución de extracción, comprendiendo la disolución de extracción un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada y una base fuerte, en el que al poner en contacto la muestra con la disolución de extracción se produce un extracto que comprende: (i) succinilacetona derivatizada; (ii) uno o más aminoácidos; (iii) carnitina libre; (iv) una o más acilcarnitinas; o (v) formas derivatizadas de (ii), (iii), o (iv) de la muestra, y en el que la concentración de succinilacetona derivatizada en el extracto refleja la concentración de succinilacetona en la muestra, y en el que las concentraciones de uno o más aminoácidos, carnitina libre, una o más

5 acilcarnitinas, o formas derivatizadas de las mismas en el extracto reflejan sus respectivas concentraciones en la muestra. El procedimiento también puede incluir, después de poner en contacto la muestra con la disolución de extracción, la etapa de analizar la muestra usando espectrometría de masas en tándem. La puesta en contacto puede derivatizar al menos una molécula de succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP). El monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada puede ser metanol, etanol, propanol, o isopropanol. La base fuerte puede ser hidrazina, una hidrazina modificada (por ejemplo acilhidrazinas, arilhidrazinas, alquilhidrazinas, reactivos de Girard P y Girard T), o hidroxilamina.

10 En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra biológica tal como una mancha de sangre seca. La muestra puede ser la que se obtenga de un ser humano recién nacido. La muestra puede ser la que se obtenga de un sujeto del que se sospecha que tiene un trastorno metabólico tal como tirosinemia tipo I, o tiene riesgo de desarrollarlo.

15 En algunas realizaciones, la disolución de extracción puede contener agua, un ácido orgánico, y/o uno o más patrones internos. Por ejemplo, la disolución de extracción puede contener entre aproximadamente 5% y aproximadamente 30% de agua o entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% de agua. El ácido orgánico puede ser ácido oxálico, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 5mM. Los patrones internos pueden incluir al menos un isótopo pesado de un átomo tal como <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, o <sup>13</sup>C. Uno o más de los patrones internos puede ser, o contener, succinilacetona, un aminoácido, carnitina libre, una acilcarnitina, o forma derivatizada de cualquiera de los anteriormente mencionados.

20 En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir, después de poner en contacto la muestra con la disolución de extracción, la etapa de evaporar la muestra que da como resultado una primera muestra evaporada. El procedimiento puede incluir adicionalmente, después de evaporar la muestra, las etapas de poner en contacto la primera muestra evaporada con una disolución de alcohol alquílico que comprende un alcohol alquílico y un ácido. El procedimiento puede incluir adicionalmente, después de poner en contacto la muestra con la disolución de alcohol alquílico, las etapas de: evaporar la disolución que da como resultado una segunda muestra evaporada y/o reconstituyendo la segunda muestra evaporada. La reconstitución de la segunda muestra evaporada puede incluir poner en contacto la segunda muestra evaporada con un disolvente. El alcohol alquílico puede ser metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, o pentanol. El ácido puede ser ácido clorhídrico (HCl). El disolvente puede incluir acetonitrilo, isopropanol, o una mezcla de agua con isopropanol o acetonitrilo.

30 En otro aspecto, la revelación proporciona un procedimiento para extracción, procedimiento que incluye las etapas de: poner en contacto una muestra con una disolución de extracción, comprendiendo la disolución de extracción un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada y una base fuerte, en el que al poner en contacto la muestra con la disolución de extracción se produce un extracto que comprende: (i) una cetona biológicamente activa derivatizada; (ii) uno o más aminoácidos; (iii) carnitina libre; (iv) una o más acilcarnitinas; y/o (v) formas derivatizadas de cualquiera de (ii), (iii), o (iv) de la muestra, y en el que la concentración de la cetona biológicamente activa derivatizada en el extracto refleja la concentración de cetona biológicamente activa en la muestra, y en el que las concentraciones de uno o más aminoácidos, carnitina libre, una o más acilcarnitinas, o formas derivatizadas de las mismas en el extracto reflejan sus respectivas concentraciones en la muestra. El monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada puede ser metanol, etanol, propanol, o isopropanol. La cetona biológicamente activa puede ser, por ejemplo, succinilacetona o un esteroide. Los esteroides incluyen, pero no se limitan a estos, testosterona, deshidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deshidroepiandrosterona, androstenodiona, 17-hidroxiprogesterona (17-OHP), 17-hidroxipregnenolona, cortisol, 11-desoxicortisol, corticosterona, aldosterona, estradiol, 18-OH corticosterona, pregnenolona, progesterona, cortisona, tetrahydrocortisol, 11-desoxicorticosterona, creatinina, 17-cetosteroides, colesterol, vitamina B, o vitamina A. La base fuerte puede ser cualquiera de las bases fuertes que se describen en este documento. La disolución de extracción también puede incluir agua.

45 En otro aspecto, la revelación ofrece un procedimiento para detectar succinilacetona. El procedimiento incluye las etapas de: poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende un monoalcohol C<sub>1-3</sub> lineal o ramificado y una base fuerte; derivatizar succinilacetona en la muestra; y evaluar la succinilacetona derivatizada en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem. La forma derivatizada de succinilacetona puede ser succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP). La base fuerte puede ser cualquiera de las que se describen en este documento.

55 En otro aspecto, la revelación proporciona un procedimiento para detectar succinilacetona, procedimiento que incluye las etapas de poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende un monoalcohol C<sub>1-3</sub> lineal o ramificado e hidrazina; derivatizar succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP) en la muestra; y evaluar MPP en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem. El procedimiento también puede incluir evaluar la muestra respecto a uno o más analitos adicionales (por ejemplo, cualquiera de los analitos adicionales que se describen en este documento) con MPP en la misma inyección de muestra. El monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada puede ser metanol, etanol, propanol, o isopropanol.

En otro aspecto, la revelación proporciona un procedimiento para detectar succinilacetona. El procedimiento puede

- 5 incluir las etapas de: poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que contiene un disolvente orgánico en condiciones que no fijan sustancialmente proteínas; derivatizar succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP) en la muestra; y evaluar MPP y un analito adicional (o derivado del mismo) en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem. La disolución de extracción puede contener aproximadamente 5% de agua. La disolución de extracción puede contener aproximadamente 85% de un monoalcohol C<sub>1-3</sub> lineal o ramificado tal como metanol, etanol, propanol, o isopropanol. La succinilacetona se puede derivatizar con hidrazina o hidrazina derivatizada.
- 10 En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir las etapas de determinar si el sujeto, del que se derivó la muestra, tiene, o está en riesgo de desarrollar, tirosinemia hereditaria tipo I, sobre la base de la detección de succinilacetona en la muestra. Tras determinar que el sujeto, tiene, o está en riesgo de desarrollar, tirosinemia hereditaria tipo I, el procedimiento puede incluir el administrar al sujeto un inhibidor de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa.
- 15 Todavía en otro aspecto, la revelación ofrece un procedimiento para detectar una cetona biológicamente activa. El procedimiento incluye las etapas de: poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende un monoalcohol C<sub>1-3</sub> lineal o ramificado y una base fuerte; derivatizar la cetona biológicamente activa en la muestra; y evaluar la cetona biológicamente activa derivatizada en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem. La cetona biológicamente activa puede ser succinilacetona o un esteroide tal como cualquiera de los esteroides que se han descrito en este documento. El monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada puede ser metanol, etanol, propanol, o isopropanol. La disolución de extracción también puede incluir agua.
- 20 En algunas realizaciones de los procedimientos que se describen en este documento, la muestra puede ser una muestra biológica tal como una muestra de sangre seca (una mancha de sangre seca). La muestra puede ser de un ser humano recién nacido. La muestra también puede incluir al menos un isótopo pesado de un átomo que se incluye en la muestra antes del análisis espectroscópico de masas.
- 25 En algunas realizaciones de los procedimientos que se describen en este documento, la evaluación puede incluir el analizar succinilacetona derivatizada junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, analitos biológicos tales como uno o más aminoácidos, carnitina libre, o acilcarnitinas) de la inyección de muestra a un espectrómetro de masas en tándem. Por ejemplo, se puede analizar succinilacetona derivatizada junto con uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 28, o 30) analitos adicionales de la misma inyección de muestra (en un espectrómetro de masas en tándem).
- 30 En algunas realizaciones de los procedimientos que se describen en este documento, la muestra es una muestra que no se ha sometido a extracción previamente.
- 35 En algunas realizaciones de los procedimientos que se describen en este documento, el poner en contacto la muestra con la disolución de extracción da como resultado la extracción de (i) succinilacetona (SA) derivatizada y (ii) uno o más aminoácidos, carnitina libre, una o más acilcarnitinas, o formas derivatizadas de las mismas de la muestra sin alterar las relaciones de aquellos analitos presentes en la muestra. Por ejemplo, el extracto que se obtiene de una muestra que contiene SA, tirosina, y carnitina libre con una relación de aproximadamente 5:1:2 ha de contener succinilacetona derivatizada, tirosina (o tirosina derivatizada), y carnitina libre (o carnitina libre derivatizada) con una relación de aproximadamente 5:1:2.
- 40 Todavía en otro aspecto, la revelación ofrece un kit para detectar succinilacetona. El kit puede incluir succinilacetona derivatizada que comprende al menos un isótopo pesado de un átomo; e instrucciones sobre cómo detectar la succinilacetona derivatizada. El kit también puede incluir una base fuerte tal como hidrazina. La base fuerte se puede proporcionar a una concentración de menos de aproximadamente 0,1%. La hidrazina puede ser hidrocloreuro de hidrazina. El kit también puede incluir uno o más patrones internos, conteniendo cada patrón interno: (i) un aminoácido, carnitina libre, o una acilcarnitina, y (ii) al menos un isótopo pesado de un átomo. El kit también puede
- 45 incluir al menos una mancha de sangre seca que comprende una cantidad conocida de una o más de succinilacetona, un aminoácido, carnitina libre, o una acilcarnitina. La succinilacetona derivatizada puede ser ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP).
- 50 En otro aspecto, la revelación proporciona un kit para detectar una cetona biológicamente activa. El kit puede incluir una cetona biológicamente activa derivatizada de interés que contiene al menos un isótopo pesado de un átomo e instrucciones sobre cómo detectar la cetona biológicamente activa derivatizada.
- 55 Muchos espectrómetros de masas tienen precisiones en las masas con alta resolución. Por ejemplo, en el caso de un solo ión cargado, este intervalo corresponde a 0,6 *m/z*. Pequeñas variaciones (por ejemplo variaciones en la calibración) en un espectrómetro de masas pueden dar como resultado señales de iones *m/z* que no coinciden con las que se declaran en este documento, pero la señal *m/z* correspondiente a las que se desvelan se puede identificar y usar fácilmente, por ejemplo, compensando el desvío en calibración.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La **Fig. 1** es un diagrama esquemático que representa la ruta del catabolismo de tirosina.

La **Fig. 2** es un diagrama esquemático que representa una reacción necesaria para extraer y derivatizar succinilacetona de una muestra biológica.

5 La **Fig. 3** es un diagrama esquemático de un procedimiento de extracción y derivatización de succinilacetona antes de inyección y detección/medición mediante espectrometría de masas en tándem.

La **Fig. 4** es un diagrama esquemático de un procedimiento de extracción y derivatización de succinilacetona, y de extracción y derivatización de analitos adicionales antes de inyección y detección/medición mediante espectrometría de masas en tándem.

10 La **Fig. 5** es un espectro de masas en tándem (escaneo de pérdida neutra de 46) que se toma usando el procedimiento representado en la Figura 3 de succinilacetona y otros aminoácidos no derivatizados. Los aminoácidos se designan mediante un código de tres letras, por ejemplo, alanina es "ala", y la señal de relación específica de masa a carga ( $m/z$ ) para un ión hijo de un aminoácido individual se indica por una flecha. "IS" se refiere a patrón interno. El eje X representa la  $m/z$  y el eje Y representa la abundancia relativa (porcentaje) de cada ión en la muestra.

La **Fig. 6** es un espectro de masas en tándem (escaneo de pérdida neutra de 102) de una mancha de sangre extraída que representa analitos ejemplares que se puede detectar y/o medir junto con succinilacetona cuando se procesa la muestra según el procedimiento que se representa en la Fig. 4.

20 La **Fig. 7** es una serie de espectros (escaneo de pérdida neutra de 46) que se toma con el procedimiento descrito en la Figura 3. Los espectros representan la medición de los niveles de succinilacetona y tirosina en manchas de sangre seca de recién nacidos sanos y de un recién nacido del que se ha confirmado que tiene tirosinemia tipo I. El eje X representa la correspondiente  $m/z$  y las alturas de picos representan la abundancia relativa de los analitos.

25 La **Fig. 8** son un par de gráficos de barras y una tabla que representan la medición de niveles de succinilacetona y tirosina en manchas de sangre seca obtenidas de un recién nacido del que se ha confirmado que tiene tirosinemia tipo I a las 25 horas y a los 15 días, en comparación con un recién nacido sano ("verdadero neg"). El eje Y del gráfico de barras de la Fig. 8A representa el nivel de succinilacetona en  $\mu\text{M}$  (izquierda). El eje Y del gráfico de barras de la Fig. 8B representa el nivel de tirosina en  $\mu\text{M}$  (derecha).

30 La **Fig. 9** es un gráfico de líneas que representa la estabilidad relativa de hidrato de hidrazina y dihidrocloruro de hidrazina. El eje X representa el número de días y el eje Y representa la cantidad (porcentaje) de hidrato de hidrazina (diamantes) o dihidrocloruro de hidrazina (cuadrados) que queda en cada momento.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

35 Se puede detectar succinilacetona mediante espectrometría de masas modificando la succinilacetona en una muestra hacia una forma más estable. En este documento se revelan procedimientos y composiciones para realizar dichas modificaciones y para tratar simultáneamente la muestra de manera que permita la extracción de succinilacetona y otros analitos (por ejemplo aminoácidos, acilcarnitinas, y carnitina libre) de una muestra en una sola etapa de manera que las concentraciones de succinilacetona y otros analitos en el extracto reflejen sus respectivas concentraciones en la muestra. También se revelan procedimientos para detectar y/o medir succinilacetona (succinilacetona derivatizada) y uno o más analitos adicionales usando espectrometría de masas. Los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar, *inter alia*, para diagnosticar uno o más trastornos metabólicos en un sujeto tales como las aminoacidopatías (por ejemplo, tirosinemia hereditaria tipo I) y trastornos de metabolismo orgánico y de ácidos grasos o para generar perfiles metabólicos para los diagnósticos de este tipo (véase más adelante).

Procedimientos para extraer succinilacetona y analitos adicionales de una muestra

45 La revelación ofrece procedimientos para extraer succinilacetona junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, y carnitina libre) de una muestra en una sola etapa de manera que las concentraciones de succinilacetona y uno o más analitos adicionales (por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, y acilcarnitinas) en el extracto reflejen sus respectivas concentraciones en la muestra. Tras la extracción, la presencia o la cantidad de succinilacetona se puede determinar junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos) usando espectrometría de masas (por ejemplo espectrometría de masas en tándem). Los procedimientos pueden incluir poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que contiene un monoalcohol  $\text{C}_{1-3}$  de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, o isopropanol) y una base fuerte tal como hidrazina o hidrazina modificada (por ejemplo, acilhidrazinas, arilhidrazinas, alquilhidrazinas, reactivos de Girard P y Girard T), o hidroxilamina. La disolución de extracción también puede contener agua. El poner en contacto la muestra con la disolución de extracción da como resultado la modificación

(derivatización) de succinilacetona, si está presente en la muestra y la extracción de la succinilacetona modificada así como de uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos).

La Figura 2 representa una reacción ejemplar para extraer succinilacetona de las muestras de manchas de sangre seca según los procedimientos que se describen en este documento. La succinilacetona es una dicetona muy reactiva y por tanto reacciona rápidamente con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos libres o constituyentes de péptidos y proteínas) en fluidos biológicos tales como sangre entera. Los conjugados de bases de Schiff que se forman por la reacción entre succinilacetona y los restos aminoácidos son más estables que la succinilacetona y por tanto la mayor parte de la succinilacetona, si no toda, presente en la sangre está en la forma combinada. Para extraer (liberar) succinilacetona junto con uno o más analitos adicionales de una muestra (por ejemplo una muestra biológica tal como una mancha de sangre) en una sola etapa, la muestra se puede poner en contacto con una disolución de extracción que contiene un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metanol, etanol, propanol, o isopropanol) y una base fuerte. La base fuerte puede ser hidrazina o hidrazina modificada (por ejemplo, acilhidrazinas, arilhidrazinas, alquilhidrazinas, reactivos de Girard P y Girard T) así como hidroxilamina. El monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada puede estar, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 70% (por ejemplo aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, o aproximadamente 95%) en volumen en la disolución. La base fuerte (por ejemplo, hidrazina, hidrazina modificada, o hidroxilamina) puede estar a una concentración de aproximadamente 600 µM (por ejemplo aproximadamente 200 µM, aproximadamente 300 µM, aproximadamente 400 µM, aproximadamente 500 µM, aproximadamente 550 µM, aproximadamente 650 µM, aproximadamente 700 µM, aproximadamente 800 µM, aproximadamente 900 µM, aproximadamente 1000 µM, aproximadamente 1200 µM, aproximadamente 1500 µM, o aproximadamente 2000 µM) en la disolución.

La disolución de extracción también puede contener agua. El agua puede estar, por ejemplo, a una concentración de 6-30% (por ejemplo, 7-28%, 8-26%, 10-26%, 14-25%, 18-24%) en volumen en la disolución de extracción. La concentración de agua puede ser tal que la disolución de extracción reconstituye alguna de las proteínas y péptidos mientras que se disuelven al mismo tiempo otros analitos (por ejemplo, acilcarnitinas, carnitina libre y aminoácidos) presentes en la muestra. La disolución de extracción también puede contener un ácido orgánico tal como ácido oxálico a una concentración de aproximadamente 3 mM (por ejemplo aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 3,5 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 4,5 mM, o aproximadamente 5 mM).

Opcionalmente, con la ayuda del ácido orgánico (por ejemplo, ácido oxálico), que actúa como catalizador, la hidrazina libera la succinilacetona de los restos aminoácidos y forma un anillo pirazona estable. La pirazona formada por la reacción entre succinilacetona e hidrazina es el compuesto denominado ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP). Este compuesto es más estable que las bases de Schiff que se forman por la reacción de succinilacetona con restos aminoácidos. Por lo tanto, una vez que la succinilacetona ha reaccionado con hidrazina, este MPP derivado se puede extraer completamente junto con analitos adicionales (por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, y acilcarnitinas) en una sola etapa. El MPP y los analitos adicionales extraídos se pueden medir a continuación usando espectrometría de masas en tándem. Se pueden evaluar simultáneamente succinilacetona y otros analitos, por ejemplo, usando espectrometría de masas en tándem. La concentración de MPP refleja directamente la concentración de succinilacetona en la muestra.

La Figura 3 representa un procedimiento ejemplar para preparar una muestra para análisis espectrométrico de masas. En este caso, se puede perforar una muestra de mancha de sangre seca obtenida de un recién nacido (o persona de cualquier edad) para generar un pequeño disco que se deposita, por ejemplo, en un pocillo de una placa de microtitulación. A esta muestra, se puede añadir una disolución de extracción para extraer los analitos de la muestra. La disolución de extracción puede comprender una mezcla de un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada y una base fuerte (las proporciones de estos dos componentes pueden variar según lo anteriormente descrito). La fuente de hidrazina puede ser hidrato de hidrazina o dihidrocloruro de hidrazina, u otras hidrazinas modificadas (por ejemplo, acilhidrazinas, arilhidrazinas, alquilhidrazinas, reactivos de Girard P y Girard T) o hidroxilamina. La disolución también puede contener agua (véase anteriormente) con un pequeño porcentaje de un ácido orgánico (por ejemplo, ácido oxálico). Esta disolución también puede contener, opcionalmente, uno o más patrones internos, por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, acilcarnitinas y succinilacetona en concentraciones conocidas. A continuación se puede incubar la mezcla de muestra durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, aproximadamente 25 a 45 minutos, por ejemplo, aproximadamente 30 a aproximadamente 45 minutos; aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos; aproximadamente 30 a aproximadamente 70 minutos; aproximadamente 30 a aproximadamente 90 minutos; aproximadamente 30 a aproximadamente 120 minutos; aproximadamente 35 a aproximadamente 60 minutos; o aproximadamente 40 a aproximadamente 60 minutos) para dejar que se produzca la extracción de aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitinas así como la extracción de succinilacetona combinada y su concomitante reacción con hidrazina. A continuación se puede transferir el extracto a



un pocillo sin usar de la placa de microtitulación y se pueden analizar a continuación las muestras por espectrometría de masas en tándem, opcionalmente con ayuda de un dispositivo de manejo de líquidos para la inyección de la muestra. A continuación se establecen los ajustes instrumentales en el espectrómetro de masas en tándem para detectar los respectivos metabolitos de interés (aminoácidos, acilcarnitinas, carnitina, y succinilacetona) así como sus correspondientes patrones internos en modo multiplex.

Puede que sea ventajoso derivatizar no solo la succinilacetona modificada (por ejemplo MPP), sino también analitos adicionales en una muestra (por ejemplo analitos adicionales tales como aminoácidos, acilcarnitinas, y carnitina). Muchos de los analitos que se describen en este documento, incluyendo succinilacetona, son ácidos carboxílicos; por lo tanto, son susceptibles de derivatización en la muestra por esterificación. En la Figura 4 se representa un procedimiento ejemplar para esterificar analitos múltiples en una muestra, antes del análisis por espectrometría de masas. En primer lugar, un procedimiento similar se puede realizar como anteriormente, pero, se pueden realizar procesamientos adicionales de la muestra. Por ejemplo, tras la etapa de derivatización con hidrazina, la muestra se puede evaporar a sequedad. La muestra seca se puede reconstituir a continuación en una disolución ácida de un alcohol alquílico. El alcohol puede ser cualquier alcohol alquílico tal como, pero sin limitarse a ellos, metanol, etanol, propanol, n-butanol, terc-butanol, pentanol, o hexanol. Este alcohol se puede poner en contacto con la muestra en combinación con un ácido fuerte, concentrado (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico). Una disolución de alcohol alquílico y ácido de este tipo puede ser, por ejemplo, butanol en HCl 3N o metanol en HCl 1N. La muestra se puede incubar en la disolución de alcohol alquílico/ácido durante aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, o aproximadamente 120 minutos) a aproximadamente 39°C (por ejemplo aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 42°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, o aproximadamente 70°C). Tras esta incubación, se puede evaporar la muestra a sequedad y reconstituirla a continuación en un disolvente, por ejemplo, acetonitrilo; o acetonitrilo y agua (por ejemplo, 80% de acetonitrilo y 20% de agua), isopropanol (por ejemplo, 80% de isopropanol y 20% de agua) o cualquier otro disolvente que sea susceptible de análisis de espectrometría de masas y que sea capaz de disolver compuestos orgánicos esterificados.

Analitos adicionales que se pueden detectar y/o medir con succinilacetona derivatizada (modificada) incluyen, por ejemplo los que se enumeran en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

| NOMBRE DEL ANALITO                    | ABREVIATURA         |
|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Cetonas</b>                        |                     |
| Succinilacetona                       | SA                  |
| <b>Aminoácidos</b>                    |                     |
| Alanina                               | Ala                 |
| Arginina                              | Arg                 |
| Ácido aspártico                       | Asp                 |
| Asparagina                            | Asn                 |
| Citrulina                             | Cit                 |
| Cisteína                              | Cys                 |
| Glicina                               | Gly                 |
| Glutamina                             | Gln                 |
| Ácido glutámico                       | Glu                 |
| Histidina                             | His                 |
| Leucina (isoleucina, Allo-Isoleucina) | Leu (Ile, Allo-Ile) |
| Lisina                                | Lys                 |
| Metionina                             | Met                 |
| Ornitina                              | Orn                 |
| Fenilalanina                          | Phe                 |
| Prolina                               | Pro                 |
| Serina                                | Ser                 |
| Treonina                              | Thr                 |

| NOMBRE DEL ANALITO                           | ABREVIATURA |
|--|-------------|
| Triptófano                                   | Trp         |
| Tirosina                                     | Tyr         |
| Valina                                       | Val         |
| <b>Carnitinas</b>                            |             |
| Carnitina libre                              | C0          |
| Acetilcarnitina                              | C2          |
| Propionilcarnitina                           | C3          |
| Malonilcarnitina                             | C3DC        |
| Butirilcarnitina                             | C4          |
| 3-Hidroxi-butirilcarnitina                   | C4OH        |
| Isovalerilcarnitina                          | C5          |
| Tigililcarnitina                             | C5:1        |
| Glutarilcarnitina                            | C5DC        |
| 3-Hidroxi-isovalerilcarnitina                | C5OH        |
| Hexanoilcarnitina                            | C6          |
| Adipilcarnitina                              | C6DC        |
| Octanoilcarnitina                            | C8          |
| Octenoilcarnitina                            | C8:1        |
| Decanoilcarnitina                            | C10         |
| Decenoilcarnitina                            | C10:1       |
| Decadienoilcarnitina                         | C10:2       |
| Docecanoilcarnitina                          | C12         |
| Dodecenoilcarnitina                          | C12:1       |
| Tetradecanoilcarnitina (Miristoilcarnitina)  | C14         |
| Tetradecenoilcarnitina                       | C14:1       |
| Tetradecadienoilcarnitina                    | C14:2       |
| 3-Hidroxi-tetradecanoilcarnitina             | C14OH       |
| Hexadecanoilcarnitina (palmitoilcarnitina)   | C16         |
| Hexadecenoilcarnitina                        | C16:1       |
| 3-Hidroxi-hexadecanoilcarnitina              | C16OH       |
| 3-Hidroxi-hexadecenoilcarnitina              | C16:1OH     |
| Octadecanoilcarnitina (Estearoilcarnitina)   | C18         |
| Octadecenoilcarnitina (Oleilcarnitina)       | C18:1       |
| Octadecadienoilcarnitina (Linoleilcarnitina) | C18:2       |
| 3-Hidroxi-octadecanoilcarnitina              | C18OH       |
| 3-Hidroxi-octadecenoilcarnitina              | C18:1OH     |

#### Espectrometría de masas

Se puede usar espectrometría de masas en tándem para detectar y/o medir succinilacetona y uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos) en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica). En espectrometría de masas en tándem, se conectan en serie dos analizadores de masas por la vía de una célula de colisión. El primer analizador de masas (MS-1) se usa para seleccionar un ión de interés (por ejemplo, un ión de una relación particular de masa a carga ( $m/z$ )). Los iones seleccionados se transfieren a continuación a una célula de colisión en la que se fragmentan mediante colisiones con un gas inerte. Este proceso se denomina disociación activada por colisión (CAD). Una vez que se han fragmentado los iones progenitores (a veces llamados precursores), el segundo analizador de masas (MS-2) se usa bien para escanear y detectar todos los iones hijos producidos o para seleccionar y detectar iones fragmentos particulares.

Según se detalla en los Ejemplos que se acompañan, se usó espectrometría de masas en tándem para ionizar las moléculas precursoras de succinilacetona derivatizada (modificada) y varios aminoácidos, fragmentos de iones, y



para detectar picos específicos que son indicativos de la presencia de estas moléculas en la muestra. La detección por espectrometría de masas en tándem se puede lograr de varias maneras. En un tipo de espectrometría de masas en tándem (que se realiza comúnmente en espectrómetros de masas en tándem de triple cuadrupolo) los iones que se fragmentan para producir iones (fragmentos) hijos comunes se pueden detectar como una clase realizando un "escaneo de ión precursor" (que también se llama escaneo de ión progenitor), donde seleccionando la masa apropiada para el ión fragmento común en MS-2 se detectan todos los iones que producen los iones fragmento comunes. Este tipo de escaneo se puede usar para detectar las acilcarnitinas en una muestra (escaneo de ión precursor varios  $m/z$  85). En una forma diferente de espectroscopía de masas en tándem, los iones que se fragmentan para producir una pérdida neutra común se pueden detectar como una clase realizando el llamado escaneo de pérdida neutra en el que ajustando una compensación de masa apropiada igual a la pérdida neutra común entre MS-1 y MS-2 se detectan todos los iones que se fragmentan para producir la pérdida neutra especificada. Este tipo de escaneo se realiza para detectar aminoácidos y succinilacetona en una muestra (pérdida neutra de  $m/z$  102 si los analitos en la muestra extraída hubieran sido modificados hacia ésteres butílicos o pérdida neutra de  $m/z$  46 si no se produjo modificación adicional de analito). La Fig. 5 muestra un escaneo de pérdida neutra de  $m/z$  46 donde se detectan varios aminoácidos y succinilacetona de la misma muestra. Se observa un pico único que corresponde a succinilacetona derivatizada en  $m/z$  155, junto con varios picos únicos que corresponden a aminoácidos. Así, se puede detectar y/o medir succinilacetona (succinilacetona derivatizada según se describe en este documento) junto con uno o más analitos adicionales en una sola muestra en un análisis.

Todavía en otro tipo de espectrometría de masas en tándem conocido como monitorización de reacción múltiple (MRM), se selecciona en MS-1 un ión progenitor de interés, se fragmenta en la célula de colisión y se selecciona en MS-2 un ión fragmento específico que resulta de la activación por colisión y finalmente se detecta. Se fijan MS-1 y MS-2 para que seleccionen respectivamente los correspondientes pares de iones progenitor y fragmento de interés para una predeterminada cantidad de tiempo (unos pocos milisegundos). Esta transición específica ión progenitor - ión producto se puede considerar como un canal de detección. Si se necesita que se detecten analitos adicionales, se pueden introducir en el experimento canales de detección adicionales con transiciones de masas específicas. Los datos de todas las transiciones de masas seleccionadas (canales) se pueden tomar secuencialmente para obtener la información deseada. La detección y cuantificación de succinilacetona (succinilacetona derivatizada en una muestra preparada según se describe en este documento) en una mezcla se puede obtener empleando la transición de masa específica para cada uno de estos compuestos como sigue: para succinilacetona derivatizada: MS-1 fijado para seleccionar y transmitir el ión progenitor a  $m/z$  155, MS-2 fijado para seleccionar y transmitir el ión producto específico a  $m/z$  109 (canal 1 o transición MRM 1); y para un aminoácido, tal como tirosina: MS-1 fijado para seleccionar y transmitir el ión progenitor a  $m/z$  182, MS-2 fijado para seleccionar y transmitir el ión producto específico a  $m/z$  136 (canal 2 o transición MRM 2). Estas dos transiciones MRM se pueden medir secuencialmente en la misma muestra para una cantidad de tiempo predeterminada para detectar la presencia y/o concentración de una mezcla de estos compuestos en dicha muestra.

Se pueden añadir a la muestra patrones internos marcados con isótopos estables para succinilacetona (succinilacetona derivatizada), mediante los cuales se puede realizar la cuantificación de succinilacetona derivatizada, y con ello la propia succinilacetona. Dicho marcado de succinilacetona derivatizada con isótopos estables da como resultado un cambio de masa, al tiempo que retiene propiedades fisicoquímicas muy similares entre los compuestos marcados y los no marcados.

Generalmente, se puede añadir uno o más patrones internos en concentración conocida a una muestra para que permita la cuantificación del analito de interés (por ejemplo succinilacetona). Por ejemplo, para una muestra que se analiza usando espectrometría de masas en tándem, la relación de las señales producidas por succinilacetona derivatizada (por ejemplo MPP) y su correspondiente patrón interno se puede usar para determinar las cantidades de este compuesto en la muestra. El patrón interno también se puede añadir para distinguir moléculas que se producen de modo natural (endógenas). Como anteriormente, los patrones internos se pueden preparar en una disolución de extracción antes de mezclar una muestra (por ejemplo una muestra de sangre) y la disolución de extracción. Como alternativa, los patrones internos se pueden añadir a la mezcla en cualquier etapa de la preparación de muestra lo que asegura que estos patrones internos no se van a eliminar de la mezcla durante el procesamiento de la muestra (por ejemplo, después de una extracción líquido-líquido o una extracción de fase sólida).

Patrones internos para un analito de interés (u otras moléculas, por ejemplo, las biomoléculas que se describen en este documento) que se detecta por un procedimiento que se describe en este documento pueden ser cualquier modificación o análogo de esa molécula de analito que sea detectable por espectrometría de masas. Un patrón interno es detectable por separado de la molécula sobre la base de características físicas únicas, tales como una masa o relación masa a carga única. Un patrón interno que se usa comúnmente para espectrometría de masas es una forma o derivado químico de un analito de interés estable marcado isotópicamente (por ejemplo, si el analito fuera MPP, el patrón interno podría ser un MPP marcado isotópicamente). Por ejemplo, se pueden usar análogos estables marcados con isótopos para cuantificar el correspondiente analito de interés usando la técnica conocida como espectrometría de masas con dilución de isótopos en la que el analito y los patrones internos se procesan en la misma muestra. Los patrones internos se pueden diseñar de modo que 1) el marcado produzca un cambio de masa de al menos 1 unidad másica y 2) que ninguno de los marcadores de isótopos estables esté localizado en sitios lábiles que impidan el intercambio. Los marcadores pueden ser  $^2\text{H}$  (D),  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{18}\text{O}$  en cualquier

combinación. La localización concreta de los marcadores en la molécula puede variar a condición de que se satisfaga el prerrequisito 2 (anterior). Más aún, la posición de los marcadores y el cambio potencial en la masa de los iones fragmento también se pueden usar para confirmar la separación del patrón interno y los analitos. Ejemplos de potenciales patrones internos útiles en los procedimientos que se describen en este documento incluyen, pero no se limitan, una succinilacetona derivatizada (por ejemplo, ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP)), carnitina, acilcarnitina, o aminoácido (por ejemplo prolina, metionina, o tirosina) isotópicamente marcadas.

Hay disponibles varios tipos de espectrómetros de masas o se pueden montar con diversas configuraciones, que pueden ser útiles todas ellas en los procedimientos que se describen en este documento. En general, un espectrómetro de masas tiene los siguientes componentes principales: una entrada de muestra, una fuente de iones, una célula de colisión, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control del instrumento, y un sistema de proceso de datos. Las diferencias en la entrada de muestra, fuente de iones, y analizador de masas generalmente definen el tipo de instrumento y sus capacidades. Por ejemplo, la entrada puede ser una fuente de cromatografía de líquidos de columna capilar o puede ser una sonda o etapa directa tal como la que se usa en desorción con láser asistida por matriz. Fuentes de iones comunes son, por ejemplo, electronebulización, que incluyen nanonebulización o micronebulización o desorción con láser asistida por matriz. Analizadores de masas comunes incluyen filtros de masas de cuadrupolo, analizadores de masas por tiempo de vuelo (preferiblemente un analizador de masas por tiempo de vuelo con aceleración ortogonal), filtros de masas por trampa de iones, analizadores magnéticos de sector, o analizadores de masas de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier ("FTICR"). La célula de colisión puede ser, por ejemplo, un conjunto de barras de cuadrupolo, un conjunto de barras de hexapolo, o un conjunto de barras de octopolo. La célula de colisión forma preferiblemente un recinto sustancialmente hermético a los gases excepto por la apertura para entrada de iones y salida de iones. En la célula de colisión se puede introducir un gas de colisión tal como helio, argón, nitrógeno, aire, o metano.

Los ejemplos específicos que se describen en este documento se realizaron usando espectrómetros de masas en tándem (véanse, por ejemplo, los Ejemplos que se acompañan).

#### Muestras

Muestras adecuadas para los procedimientos que se describen en este documento incluyen cualquier fluido biológico, célula, tejido, o fracción del mismo, lo que incluye biomoléculas indicadoras de un estado metabólico (por ejemplo, un trastorno metabólico caracterizado por niveles de succinilacetona alterados tal como tirosinemia hereditaria tipo I). Una muestra puede ser, por ejemplo, un espécimen que se obtiene de un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) o que se puede derivar de dicho sujeto. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección de tejido que se obtiene mediante biopsia, o células que están situadas en un cultivo de tejido o adaptadas a él. Por lo tanto, muestras ejemplares incluyen fibroblastos cultivados, células cultivadas de líquido amniótico, y muestra de vellosidades coriónicas. Una muestra también puede ser un espécimen de fluido biológico tal como orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, fluido espinal cerebral, lágrimas, moco, y similares. Una muestra se puede fraccionar posteriormente, si se desea, en una fracción que contenga tipos particulares de células. Por ejemplo, una muestra de sangre se puede fraccionar en suero o en fracciones que contengan tipos particulares de células sanguíneas tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra puede ser una combinación de muestras de un sujeto tal como una combinación de un tejido y una muestra de fluido, y similares. Para los expertos en la técnica, son bien conocidos los procedimientos para obtener muestras que conservan la actividad o integridad de las moléculas en la muestra. Procedimientos de este tipo incluyen el uso de tampones y/o inhibidores apropiados, que incluyen inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa, que conservan o minimizan los cambios en las moléculas de la muestra. Inhibidores de este tipo incluyen, por ejemplo, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido etilenglicol bis(P-aminoetil éter) N,N,N1,N1-tetracético (EGTA), inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipaína y similares. Tampones apropiados y condiciones para aislar moléculas son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden variar dependiendo, por ejemplo, del tipo de molécula en la muestra que se ha de caracterizar (véanse, por ejemplo, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999)). También se puede procesar la muestra para eliminar o minimizar la presencia de sustancias que interfieran. Para uso en los procedimientos que se describen en este documento, una muestra puede estar en diversos estados físicos. Por ejemplo, la muestra puede ser líquida o sólida, se puede disolver o suspender en un líquido, puede estar en emulsión o gel, y se puede absorber en un material. Como ejemplo no limitante, la muestra puede ser una muestra de sangre líquida, una muestra de suero líquido, una muestra líquida de glóbulos blancos, una muestra de sangre, suero o glóbulos blancos secos, o dicha muestra absorbida en un sustrato de papel o de polímero.

#### Aplicaciones ejemplares

Los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar para obtener un perfil molecular de una muestra, por ejemplo, una muestra de un sujeto tal como un ser humano. El perfil puede incluir información que

indique si está presente succinilacetona, o succinilacetona y otros analitos biológicos tales como aminoácidos, y típicamente incluye información acerca de la presencia (cualitativa o cuantitativa) de succinilacetona (y uno o más analitos biológicos adicionales).

5 En algunas aplicaciones de estos procedimientos de espectrometría de masas, se pueden obtener perfiles metabólicos para un sujeto (por ejemplo, un ser humano). Por ejemplo, los perfiles pueden incluir el nivel de succinilacetona en un sujeto (por ejemplo, un paciente humano). También se pueden detectar, cuantificar, y/o evaluar otras biomoléculas, que incluyen, por ejemplo, uno o más de aminoácido, carnitina libre, o una acilcarnitina, en una muestra biológica usando espectrometría de masas en tándem. La información resultante (perfil metabólico) se puede usar para dictaminar sobre el estado de salud del sujeto (por ejemplo, un paciente humano), tal como la presencia o ausencia de un trastorno metabólico (por ejemplo, una aminoacidopatía), un trastorno de ácido graso o ácido orgánico, o un trastorno metabólico asociado con niveles alterados de succinilacetona (por ejemplo, tirosinemia hereditaria tipo I), o para evaluar el riesgo de un trastorno de este tipo. Ejemplos de aminoacidopatías incluyen, pero no se limitan a ellas, argininemia, aciduria arginosuccínica (déficit de arginosuccinato liasa/déficit de arginosuccinasa), citrulinemia (déficit de ácido arginosuccínico sintetasa/déficit de arginosuccinato sintetasa), homocistinuria, déficit de cistationa sintetasa, hipermetioninemia, hiperornitinemia, hiperamonemia, síndrome de hiperhomocitrulinuria, déficit de ornitina translocasa, hiperprolinemia, enfermedad urinaria de jarabe de arce (cetoaciduria de cadena ramificada), hiperglicinemia no cetónica, fenilcetonuria, acidemia piroglutámica/pipecólica, tirosinemia (tipo I), tirosinemia (tipo II), 5-oxoprolinuria, o aciduria piroglutámica. Ejemplos de trastornos de ácido graso y ácido orgánico incluyen, por ejemplo, déficit de 2-metilbutiril CoA deshidrogenasa, déficit de 2,4-dienoil-CoA reductasa, déficit de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liasa (acidemia hidroximetilglutámica), déficit de 3-metilcrotonil CoA carboxilasa (3-metilcrotonilglicinemia), déficit de carnitina palmitoil transferasa (tipo I), déficit de carnitina palmitoil transferasa (tipo II), defecto de transportador de carnitina, defecto de carnitina/acilcarnitina translocasa, acidemia etilmalónica, acidemia glutámica (tipo I; déficit de glutaril CoA deshidrogenasa); déficit de isobutilil CoA deshidrogenasa, acidemia isovalérica, déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, déficit de hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga, aciduria malónica, déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, acidemia metilmalónica, déficit de acetoacetil CoA tiolasa mitocondrial (déficit de beta-cetotiolasa), déficit de acil-CoA deshidrogenasa múltiple (acidemia glutámica, tipo II), déficit de CoA deshidrogenasa múltiple (déficit de holocarboxilasa sintetasa), acidemia propiónica, déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, déficit de hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta, déficit de proteína trifuncional, y déficit de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga. Se describen trastornos metabólicos adicionales, por ejemplo, en los documentos Chace y col., (2001) *Clinical Chemistry* 47:1166-82; Rashed y col., (1997) *Clinical Chemistry* 43(7): 1129-41; Schulze y col., (2003) *Pediatrics* 111(6): 1399-1406; y Zytkovicz y col., (2001) *Clinical Chemistry* 47(11):1945-55.

35 Por ejemplo, la tirosinemia tipo I (por ejemplo tirosinemia hereditaria tipo I) está producida por la falta de actividad de fumarilacetoacetasa, que conduce a la acumulación de fumarilacetoacetato (Fig. 1). El fumarilacetoacetato se convierte rápidamente mediante otras enzimas a succinilacetona y así los pacientes con tirosinemia tipo I acumulan succinilacetona en la sangre. Por lo tanto, la capacidad para detectar succinilacetona, tanto sola como junto con otras biomoléculas (por ejemplo, biomoléculas metabólicas), puede ser útil para dictaminar sobre el estado de salud de un sujeto. Por tanto, es posible detectar, al mismo tiempo, otros aminoácidos tales como tirosina y metionina, así como otras biomoléculas tales como carnitina libre y acilcarnitinas, en la muestra, por ejemplo, identificando picos únicos para dichas moléculas en el análisis por espectrometría de masas. La Tabla 1 incluye una lista no exhaustiva de analitos (por ejemplo, biomoléculas) que se pueden detectar/medir con succinilacetona (por la vía de la succinilacetona derivatizada) usando los procedimientos que se describen en este documento.

45 Un perfil metabólico obtenido mediante los procedimientos que se describen en este documento se puede usar para diagnosticar o predecir la susceptibilidad a una serie de trastornos metabólicos porque los indicadores bioquímicos examinados (por ejemplo, succinilacetona) pueden ser indicativos de dichos trastornos, se hayan evidenciado o no síntomas fisiológicos o de comportamiento del trastorno (por ejemplo en un sospechoso de que tiene un trastorno metabólico tal como una aminoacidopatía (por ejemplo tirosinemia tipo I)). Un perfil metabólico como el que se describe en este documento puede ser útil para monitorizar el metabolismo de un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano), tal como el que se somete a tratamiento para un trastorno metabólico. Como un ejemplo no limitante, los procedimientos se pueden usar para determinar la eficacia terapéutica de un tratamiento en particular (por ejemplo, la capacidad de un tratamiento para restaurar los niveles de succinilacetona a los niveles fisiológicos). Sobre la base de esta determinación, se pueden ofrecer al sujeto opciones terapéuticas adicionales o alternativas. También puede ser útil el perfil metabólico para dictaminar sobre la adecuación del paciente a una modalidad de tratamiento en particular, tal como restricción de dieta (por ejemplo, la eficacia de un régimen de dieta para restituir los niveles de succinilacetona a unos niveles fisiológicos). Por lo tanto, la tecnología que se describe en este documento es aplicable para cribado, diagnosis, prognosis, monitorización de terapia y adecuación, y cualquier otra aplicación en la que sea útil determinar la presencia o cantidad de paneles de dos o más biomoléculas, tales como succinilacetona y uno o más de algún aminoácido, carnitina libre, o una acilcarnitina.

60 Se puede obtener un perfil metabólico generado usando los procedimientos que se describen en este documento usando una serie de muestras biológicas. Muestras adecuadas incluyen las anteriormente descritas.

En un aspecto, se puede usar un perfil metabólico según se describe en este documento para dictaminar sobre la presencia o ausencia de un trastorno metabólico tal como una aminoacidopatía (por ejemplo, tirosinemia tipo I).

5 Sujetos de todas las edades pueden estar afectados por los trastornos metabólicos que se diagnostican usando el perfil metabólico que se describe en este documento. Por lo tanto, la muestra para uso en un procedimiento que se describe en este documento se puede obtener de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) de cualquier edad, incluyendo un prematuro, lactante, niño, y un adulto, tal como una mujer embarazada y un individuo que tiene, o del que se sospecha que tiene, tirosinemia. Los procedimientos también se pueden usar para individuos con riesgo de desarrollar un trastorno metabólico. Individuos de este tipo incluyen aquellos que tienen (i) historia familiar de trastornos de este tipo (predisposición genética para ellos) o (ii) uno o más factores de riesgo para desarrollar trastornos de este tipo. Los procedimientos también se pueden usar para diagnóstico prenatal si los cambios en niveles de succinilacetona o al menos de un analito adicional (por ejemplo, uno o más de algún aminoácido, carnitina libre, o una acilcarnitina) son evidentes en muestras maternas tales como fluido amniótico, sangre o plasma maternos. Los procedimientos se pueden usar además para monitorizar los niveles de succinilacetona en individuos que tienen afecciones de salud asociadas con niveles de succinilacetona alterados, tales como individuos que se someten a trasplante de hígado.

10 Los procedimientos que se describen en este documento implican detectar la presencia o cantidad de succinilacetona y uno o más analitos biológicos (por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, o acilcarnitinas), en los que la presencia o cantidad de cada biomolécula se correlaciona con la presencia o ausencia de un trastorno metabólico. Los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar cuantitativamente, si se desea, para que permitan la comparación de los resultados de la muestra de prueba con una cantidad patrón conocida o predeterminada de un(os) analito(s) en particular (por ejemplo, usando un patrón interno como anteriormente descrito). Los procedimientos también se pueden usar cualitativamente cuando se compara una muestra de prueba con una muestra de referencia, que puede ser o una referencia normal o una referencia de un trastorno metabólico. En este formato, la cantidad relativa de biomoléculas puede ser indicativa de un trastorno metabólico. Una muestra de referencia, por ejemplo, puede ser de un sujeto que tiene, que no se sospecha que tiene, o que no tiene riesgo de desarrollar un trastorno tal como un trastorno metabólico tal como una aminoacidopatía (por ejemplo, tirosinemia tipo I).

15 Generalmente, el valor de corte para una biomolécula dada puede variar y se ha de conocer en la técnica para los analitos y enzimas que se prueban comúnmente. Para analitos que no se prueban comúnmente se pueden usar adaptaciones obvias, de rutina, de procedimientos conocidos en la técnica para establecer valores de corte. Un valor de corte es típicamente una cantidad de biomolécula, o relación con otra biomolécula, por encima o por debajo de la cual se considera que es indicativa de un trastorno metabólico o una razón para volver a probar. Así, en conformidad con la tecnología que se describe en este documento, un nivel de referencia de al menos una biomolécula en un tipo de muestra particular se identifica como un valor de corte, por encima del cual hay una correlación significativa entre la presencia de al menos una biomolécula y la presencia (o ausencia) de un trastorno metabólico. Se entiende que los paneles de biomoléculas se pueden interpretar como un todo, en partes o en base de analito a analito.

20 Los expertos en la técnica reconocerán que algunos valores de corte no son absolutos porque las correlaciones clínicas todavía son significativas en un intervalo de valores a uno y otro lado del corte; sin embargo, es posible seleccionar un valor de corte óptimo (por ejemplo, variando puntuaciones-H, y similares) de la biomolécula para tipos de muestras particulares. Los valores de corte determinados para uso en los procedimientos que se describen en este documento generalmente se comparan con intervalos publicados pero se pueden individualizar para la metodología usada y a la población de pacientes. Se ha de entender que se podrían determinar mejoras en valores de corte óptimos dependiendo de la sofisticación de los procedimientos estadísticos usados y sobre el número y fuente de muestras usadas para determinar los valores de niveles de referencia para las diferentes biomoléculas y tipos de muestras. Por lo tanto, los valores de corte establecidos se pueden ajustar hacia arriba o hacia abajo, sobre la base de re-evaluaciones o cambios periódicos en la metodología o en la distribución de población. Además, se pueden usar valores de corte específicos para el instrumento, si se desea, por ejemplo, en el caso en que la comparabilidad del rendimiento del instrumento es >10%.

25 El nivel de referencia se puede determinar mediante una serie de procedimientos, con la condición de que el nivel de referencia resultante proporcione con precisión una cantidad de cada biomolécula por encima de la cual exista un primer grupo de sujetos (por ejemplo, seres humanos) que tenga una probabilidad diferente de trastorno metabólico que la de un segundo grupo de sujetos que tenga cantidad de actividad de analito o enzima metabólicos por debajo del nivel de referencia. El nivel de referencia se puede determinar mediante comparación de la cantidad de biomolécula, por ejemplo, en poblaciones de sujetos (por ejemplo, pacientes) que tienen el mismo trastorno metabólico. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante análisis de histograma, en el que una cohorte entera de pacientes se representa gráficamente, en el que un primer eje representa la cantidad de biomolécula y un segundo eje representa el número de sujetos en la cohorte cuya muestra contiene una o más biomoléculas en una cantidad dada. Se pueden determinar dos o más grupos separados de sujetos mediante identificación de subconjuntos de poblaciones de la cohorte que tienen los mismos o similares niveles de biomoléculas. La determinación del nivel de referencia se puede hacer entonces sobre la base de la cantidad que mejor distingue estos grupos separados. El nivel de referencia puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada sujeto, o el nivel de referencia puede



variar según subpoblaciones específicas de sujetos. Por ejemplo, sujetos de más edad pueden tener un nivel de referencia diferente que el de sujetos más jóvenes para el mismo trastorno metabólico. Además, un sujeto con la enfermedad más avanzada (por ejemplo, una forma más avanzada de un trastorno metabólico) puede tener un diferente valor de referencia que el de uno con una forma más leve de la enfermedad.

- 5 Los procedimientos también se pueden usar para determinar la presencia o la cantidad de otras cetonas biológicamente activas, por ejemplo, esteroides. Por ejemplo, los procedimientos que se describen en este documento se pueden usar para detectar la presencia o la cantidad de un esteroide en una muestra biológica obtenida de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano), los procedimientos se pueden usar para diagnosticar, o generar perfiles metabólicos útiles para el diagnóstico de una o más dolencias asociadas con niveles de esteroides alterados, por ejemplo déficit de 21-OH, déficit de 11b-OH, déficit de 21-OH con pérdida de sal, cáncer adrenal, hiperplasia adrenal, hipopituitarismo, déficit de aldosterona sintasa, trastorno adrenal cortical, menopausia o embarazo.

#### Procedimientos para identificar compuestos que modulan los niveles de succinilacetona

- 15 En este documento, también se proporcionan procedimientos para identificar compuestos que modulan (por ejemplo reducen) los niveles de succinilacetona en la célula. Los compuestos pueden modular succinilacetona y una serie de moléculas biológicas adicionales tales como, pero sin limitarse a ellas, carnitina libre, acilcarnitinas, y aminoácidos (por ejemplo, prolina, metionina, o tirosina). Según se ha discutido *supra*, dado que los niveles desregulados (por ejemplo, elevados) de succinilacetona se asocian con aumento de riesgo de ciertos trastornos (por ejemplo aminoacidopatías), los compuestos así identificados pueden ser útiles para tratar aminoacidopatías tales como
- 20 tirosinemia tipo I. Las células que se pueden poner en contacto con el compuesto candidato pueden ser de unas especies tales que las células produzcan succinilacetona (ya sea de manera sintética o natural). Las células pueden ser células primarias o líneas celulares y pueden ser de cualquier tipo histológico, por ejemplo, sin limitación, células epiteliales, fibroblastos, células linfocíticas, macrófagos/monocitos, granulocitos, queratinocitos, células neuronales y células musculares. Las células se pueden cultivar en platos de cultivo de tejidos. A menudo es preferible hacer que
- 25 las células crezcan en placas de análisis de pocillos múltiples (por ejemplo, placas de análisis de 96 pocillos o 384 pocillos) de manera que se puedan evaluar múltiples compuestos candidatos al mismo tiempo. El compuesto candidato (opcionalmente a diversas concentraciones que oscilan, por ejemplo, de 0,001 nM a 10 mM) se puede añadir a una disolución (por ejemplo, medio de cultivo) que contiene las células o, cuando el compuesto es una proteína, las células pueden expresarlo de manera recombinante. Tras la incubación de células que expresan
- 30 succinilacetona, se puede determinar la presencia o nivel de succinilacetona usando la preparación de muestra (extracción) y procedimientos de espectrometría de masas en tándem que se describen en este documento. Antes de la detección, se pueden lisar las células en condiciones que permitan que se prepare una muestra, que sea compatible con los procedimientos de extracción que se describen en este documento y con la espectrometría de masas en tándem. A menudo se puede añadir un compuesto de control a un conjunto de células como control tanto
- 35 positivo como negativo.

- Los compuestos identificados en cualquiera de los procedimientos que se describen en este documento incluyen diversas funciones químicas. Los compuestos pueden ser biomoléculas que incluyen, pero no se limitan, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos (por ejemplo, peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los mismos, polinucleótidos, y
- 40 análogos de polinucleótidos. Los compuestos pueden ser tanto compuestos de molécula pequeña como de molécula grande.

La identificación de compuestos de prueba por medio del uso de diversas bibliotecas que se describen en este documento permite la modificación posterior del compuesto de prueba "hit" o "lead" para optimizar la capacidad del "hit" o "lead" para modular los niveles de succinilacetona en la célula.

- 45 Los procedimientos que se describen en este documento se pueden modificar para identificar compuestos que modulan los niveles de una cetona biológicamente activa, por ejemplo, un esteroide o cualquiera de las cetonas biológicamente activas que se describen en este documento.

#### Kits

- 50 En este documento también se proporcionan kits útiles para preparar muestras para detección y/o medición (usando espectrometría de masas en tándem) de succinilacetona junto con otros múltiples analitos (por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, y acilcarnitina) en una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre seca o cualquiera de las muestras que se describen en este documento. Los kits se pueden usar para extraer succinilacetona junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, y carnitinas) de una muestra (por ejemplo una mancha de sangre) en una sola etapa de tal manera que las concentraciones de succinilacetona y
- 55 analitos adicionales (por ejemplo, aminoácidos, carnitina, y acilcarnitinas) en el extracto reflejan sus respectivas concentraciones (o relaciones) en la muestra. Los kits se pueden usar para preparar una muestra para cribar simultáneamente succinilacetona, alanina, arginina, citrulina, glicina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, tirosina, valina, y acilcarnitinas tales como C0, C2, C3, C3DC/C4OH, C4, C4DC/C5OH, C5, C5:1, C5DC/C6OH, C6, C6DC/C7OH, C8, C8:1, C10, C10:1, C10:2, C12, C12:1, C14, C14:1, C14:2, C14OH, C16, C16:1, C16OH,

C16:1OH, C18, C18:1, C18:2, C18OH, C18:1OH (véase Tabla 1).

- Los kits pueden incluir uno o más patrones internos y/o controles para uso en el subsiguiente análisis espectrométrico de masas. Por ejemplo, los kits pueden incluir succinilacetona (SA) como control y una forma derivatizada de SA (por ejemplo, ácido 3,4,5,6,7-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP)), marcada (por ejemplo, marcada con isótopo) como patrón interno. La succinilacetona y/o succinilacetona derivatizada se pueden proporcionar cada una en el kit en forma líquida o seca (por ejemplo, liofilizada). La succinilacetona y/o succinilacetona derivatizada se pueden proporcionar en una cantidad de aproximadamente 1 mmol (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mmol, aproximadamente 2 mmol, aproximadamente 2,5 mmol, aproximadamente 3,0 mmol, aproximadamente 3,5 mmol, aproximadamente 4,0 mmol, aproximadamente 4,5 mmol, o aproximadamente 5 mmol).
- Los kits pueden incluir succinilacetona y/o succinilacetona derivatizada (por ejemplo, MPP) en un recipiente que contiene uno o más controles adicionales o patrones internos. Por ejemplo, el kit puede incluir un recipiente con un control de succinilacetona, uno o más controles de aminoácidos, y uno o más controles de carnitina (por ejemplo, carnitina libre y acilcarnitinas). Los kits también pueden incluir prolina como control y prolina estable, marcada (por ejemplo, marcada con isótopo) como patrón interno.
- Los kits también pueden incluir una base fuerte tal como hidrazina, por ejemplo dihidrocloruro de hidrazina o cualquiera de las otras bases fuertes que se describen en este documento. La base se puede proporcionar en disolución a una concentración de menos de aproximadamente 0,5% (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,05%, menos de aproximadamente 0,06%, menos de aproximadamente 0,07%, menos de aproximadamente 0,08%, menos de aproximadamente 0,09%, menos de aproximadamente 0,1%, menos de aproximadamente 0,15%, menos de aproximadamente 0,2%, menos de aproximadamente 0,25%, menos de aproximadamente 0,3%, menos de aproximadamente 0,35%, menos de aproximadamente 0,4%, menos de aproximadamente 0,45%, o menos de aproximadamente 0,475%).

- Una o más disoluciones contenidas en el kit se pueden almacenar, por ejemplo en viales de vidrio silanizados. Uno o más componentes del kit se pueden almacenar en un recipiente que impide o minimiza la pérdida de material y la evaporación del disolvente. Por ejemplo, el recipiente se puede cerrar con un septo.

- Los kits pueden incluir, por ejemplo manchas de sangre seca (por ejemplo, plasma, linfa) útiles como control. Por ejemplo, la mancha de sangre seca se puede enriquecer con uno o más analitos (por ejemplo, uno o más analitos en concentraciones conocidas) tales como succinilacetona, uno o más aminoácidos carnitina libre, o una o más acilcarnitinas.

- Los kits también pueden incluir, opcionalmente, una disolución de extracción tal como cualquiera de las disoluciones de extracción que se describen en este documento. La disolución de extracción puede contener un monoalcohol C<sub>1-3</sub> lineal o ramificado y una base fuerte. Los kits también pueden incluir una o más disoluciones disolventes que contienen, por ejemplo, acetonitrilo o isopropanol. Las disoluciones disolventes también pueden contener agua, por ejemplo, una disolución disolvente que contiene 80% de acetonitrilo y 20% de agua.

- En algunas realizaciones, el kit también puede incluir uno o más componentes para probar la actividad de biotinidasa en una muestra así como para probar la presencia de trastornos de almacenamiento lisosomal o galactosemia en un sujeto.

- Los kits de este tipo se pueden usar entonces en la detección de niveles elevados o bajos de succinilacetona, aminoácidos, carnitina libre, o acilcarnitina en sangre de recién nacidos para el diagnóstico de uno o más de varios trastornos metabólicos. Por ejemplo, niveles elevados de succinilacetona pueden ser indicativos de tirosinemia tipo I. La carnitina libre y las acilcarnitinas son marcadores de trastornos que se clasifican generalmente como trastornos de la oxidación de ácidos grasos (FAO) y trastornos de aciduria orgánica (OAD). De modo similar, se usan aminoácidos como marcadores para varios trastornos metabólicos que se conocen colectivamente como aminoacidopatías. Estos trastornos son errores innatos de metabolismo (o deficiencias metabólicas genéticas).

- Los siguientes ejemplos tienen la intención de ilustrar, no de limitar, la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

- Se prepararon manchas de sangre patrón de referencia (sangre entera) usando sangre entera obtenida de un sujeto. La sangre se procesó ajustando la concentración de hemoglobina a 17 mg/dl y añadiendo a la sangre varios aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas y succinilacetona en concentraciones conocidas. La sangre procesada se dispensó sobre tarjetas de papel de filtro para formar manchas de sangre sobre la matriz de papel de filtro. Cada mancha de sangre se generó dispensando 75 µl de sangre procesada. Las manchas de sangre se dejaron secar durante toda la noche.

- Se troqueló un pequeño disco (3,175 mm) de mancha de sangre seca y se depositó en un pocillo de una placa de pocillos de microtitulación. La muestra se extrajo dispensando 100 µl de una disolución de extracción que consistía



5 en una mezcla de metanol y agua a una relación volumen a volumen aproximada relativa de 78% de metanol y 22% de agua. Además, la disolución de extracción contenía ácido oxálico 3 mM, y una concentración de 600  $\mu$ M de dihidrocloruro de hidrazina. En la disolución de extracción también estaban presentes patrones internos (análogos de isótopo pesado estables de los analitos de interés) para varios aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas y succinilacetona (MPP). Los patrones internos que se incluyen en la disolución se indican en el escaneo de espectrometría de masas en tándem que se muestra en la Fig. 5.

10 La muestra extraída se inyectó en un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo con electronebulización con ayuda de un dispositivo automático de manejo de líquidos. Los datos espectrales de masas para los aminoácidos y la succinilacetona (MPP) se tomaron por la vía de un escaneo de pérdida neutra de 46 (Fig. 5).

#### Ejemplo 2

15 Se prepararon como anteriormente (Ejemplo 1) manchas de sangre que contenían aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas y succinilacetona en concentraciones conocidas. Se troqueló un pequeño disco (3,175 mm) de mancha de sangre seca y se depositó en un pocillo de una placa de pocillos de microtitulación. La muestra se extrajo en presencia de patrones internos según se ha descrito anteriormente.

Tras la extracción, la muestra se evaporó a sequedad. A continuación se reconstituyó la muestra seca en HCl 3N en n-butanol y se incubó a 39°C durante aproximadamente 30 minutos. Tras esta incubación, la muestra se evaporó otra vez a sequedad y se reconstituyó a continuación en una disolución de acetonitrilo y agua.

20 La muestra extraída se inyectó en un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo con electronebulización con ayuda de un dispositivo automático de manejo de líquidos. Los datos se tomaron en un escaneo de pérdida neutra de 102. La formación de ésteres butílicos es evidente por el aumento de 56 dalton (Da) (referencia cruzada Fig. 5) en la  $m/z$  de los iones generados por esta esterificación (Fig. 6). Estos datos demuestran que tras la derivatización de succinilacetona (según se describe en este documento), la muestra se puede procesar adicionalmente (por ejemplo mediante esterificación), si se necesita, para detectar otros constituyentes de analitos.

#### Ejemplo 3

25 Se prepararon como anteriormente manchas de sangre seca. A las manchas de sangre se añadieron diferentes niveles de los analitos (aminoácidos, succinilacetona (SA), carnitina libre y acilcarnitinas) que se muestran en la Tabla 2 y en la Tabla 3. Las manchas de sangre se extrajeron como se describe anteriormente (Ejemplo 1; la definición de cada uno de los analitos que se indican en las tablas se puede encontrar en la Tabla 1). La muestra extraída se inyectó en un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo con electronebulización con ayuda de un dispositivo automático de manejo de líquidos. Los datos espectrales de masas para aminoácido y succinilacetona (MPP) se tomaron por la vía de un escaneo de pérdida neutra de  $m/z$  46 y para carnitina y acilcarnitinas por la vía de un escaneo de ión precursor de  $m/z$  85. El porcentaje de cada analito recuperado se determinó por medio de la comparación con un patrón interno para cada analito.

35 Las diversas recuperaciones, en porcentaje, se presentan en la Tabla 2, los diversos niveles de precisión se presentan en la Tabla 3.

40 La imprecisión del análisis se determinó analizando las muestras que se describen en la tabla tres. Cada ensayo de muestra consistió en troquelados por triplicado de cada muestra que se procesó y que se midió según se describe en el Ejemplo 1. El estudio incluyó dos ensayos de este tipo al día durante un total de cinco días. Con esta información, se determinaron los siguientes componentes de la imprecisión: dentro del ensayo, entre ensayos-dentro del día, y entre días, a partir de los cuales se determinó la imprecisión total. Los resultados del análisis de imprecisión se muestran en la Tabla 3.

45 Estos datos demuestran que los procedimientos descritos en este documento se pueden usar para extraer y cuantificar simultáneamente MPP, aminoácidos, carnitina y acilcarnitinas usando espectrometría de masas en tándem.

#### Ejemplo 4

50 Actualmente se usa tirosina como marcador de diagnóstico para cribado de tirosinemia tipo I. Para mostrar que la detección de succinilacetona, en comparación con tirosina, da como resultado un aumento en la especificidad para determinar el estado de la tirosinemia tipo I en un individuo, se compararon muestras de sangre de un paciente afectado (es decir, paciente positivo en tirosinemia tipo I) con muestras normales conocidas en cuanto a las correspondientes concentraciones de tirosina y succinilacetona (MPP). Se obtuvieron manchas de sangre seca de recién nacidos sanos y de un recién nacido con un caso de tirosinemia tipo I confirmado a las 25 horas y a los 14 días de edad. Las manchas de sangre se extrajeron y se sometieron a análisis espectrométrico de masas según se describe anteriormente (Ejemplo 1). Aunque el paciente afectado presenta niveles de tirosina normales a las 25 horas de edad (la ventana de cribado del recién nacido), solamente cuando el paciente tiene 14 días de edad o más

es cuando los niveles de tirosina se elevan significativamente (Fig. 7 espectros y Fig. 8 tabla y gráficos de barras). En contraposición, la succinilacetona (MPP) muestra elevación muy significativa (30-40 desviaciones típicas desde la media normal) incluso tan temprano como 25 horas después del nacimiento. Así, a las 25 horas de edad, este paciente habría sido un falso negativo si la tirosina hubiera sido el único marcador usado. Dado que la detección temprana es crucial para la tirosinemia tipo I, es muy ventajoso detectar succinilacetona para el diagnóstico de esta afección.

Ejemplo 6

Muchos de los procedimientos que se describen en este documento usan una base fuerte para formar una base de Schiff con succinilacetona de modo que pueda ser extraída y medida. Se puede obtener hidrazina en varias formas, por ejemplo hidrato de hidrazina o dihidrocloruro de hidrazina. Aunque ambas formas se comportan de manera similar en los procedimientos que se describen en esta invención, para probar cual de las dos formas de hidrazina es la más estable, y que así tenga el tiempo de almacenamiento más largo, se probó la estabilidad relativa de cada forma a lo largo de un lapso de tiempo de aproximadamente 60 días. Se incubaron disoluciones de cada forma de hidrazina (hidrato de hidrazina al 0,5% y dihidrocloruro de hidrazina al 0,1%) a 30°C y durante diversos periodos de tiempo (por ejemplo, 1 a 60 días), se determinó la cantidad de cada forma de hidrazina mediante un análisis fluorométrico normalizado. Se determinó que el hidrato de hidrazina era inestable, mientras que se determinó que el dihidrocloruro era mucho más estable y con ello mucho más adecuado para un producto robusto (Fig. 9).

**Tabla 2.** Recuperaciones porcentuales para diversos analitos en sangre seca.

|      | Adición (µM) | Recuperación | Adición (µM) | Recuperación | Adición (µM) | Recuperación | Adición (µM) | Recuperación |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ALA  | 81           | 67           | 644          | 77           | 1450         | 78           | 3261         | 90           |
| ARG  | 79           | 70           | 635          | 71           | 1429         | 71           | 3216         | 80           |
| CIT  | 31           | 90           | 251          | 86           | 564          | 83           | 1270         | 92           |
| GLY  | 83           | 83           | 665          | 79           | 1495         | 78           | 3364         | 88           |
| LEU  | 45           | 68           | 357          | 70           | 803          | 70           | 1807         | 79           |
| MET  | 21           | 74           | 171          | 73           | 385          | 72           | 866          | 81           |
| SA   | 4            | 72           | 29           | 69           | 65           | 66           | 147          | 76           |
| ORN  | 68           | 100          | 544          | 94           | 1223         | 92           | 2752         | 101          |
| PHE  | 42           | 101          | 337          | 99           | 759          | 99           | 1708         | 109          |
| PRO  | 63           | 96           | 507          | 94           | 1141         | 92           | 2567         | 104          |
| TYR  | 54           | 94           | 431          | 93           | 969          | 91           | 2181         | 102          |
| VAL  | 41           | 78           | 324          | 83           | 730          | 83           | 1642         | 93           |
| C0   | 45           | 101          | 362          | 94           | 814          | 92           | 1831         | 102          |
| C2   | 14           | 79           | 110          | 77           | 248          | 75           | 557          | 83           |
| C3   | 1,7          | 72           | 14           | 73           | 31           | 71           | 70           | 81           |
| C4   | 1,3          | 71           | 10           | 68           | 24           | 66           | 53           | 75           |
| C5   | 1,2          | 80           | 10           | 76           | 21           | 74           | 48           | 82           |
| C5DC | 0,5          | 102          | 4            | 97           | 9            | 95           | 21           | 104          |
| C6   | 1,2          | 83           | 10           | 80           | 21           | 77           | 48           | 87           |
| C8   | 0,8          | 80           | 7            | 76           | 15           | 73           | 33           | 80           |
| C10  | 0,5          | 85           | 4            | 80           | 9            | 78           | 20           | 88           |
| C12  | 0,9          | 82           | 7            | 78           | 15           | 75           | 35           | 85           |
| C14  | 0,8          | 87           | 6            | 84           | 14           | 83           | 31           | 92           |
| C16  | 1,5          | 84           | 12           | 82           | 28           | 81           | 62           | 90           |
| C18  | 0,5          | 90           | 4            | 79           | 10           | 80           | 22           | 88           |

$$\text{Recuperación porcentual} = \frac{(\text{concentración medida}) - (\text{concentración endógena})}{\text{concentración añadida}} \times 100$$

ES 2 384 288 T3

**Tabla 3.** Imprecisión total.

|             | Medida $\mu\text{M}$ | % CV | Medida $\mu\text{M}$ | % CV | Medida $\mu\text{M}$ | % CV | Medida $\mu\text{M}$ | % CV |
|-------------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|
| <b>ALA</b>  | 567,1                | 8    | 604,1                | 9    | 709,9                | 8    | 1104,2               | 7    |
| <b>ARG</b>  | 30,0                 | 7    | 51,1                 | 7    | 135,6                | 6    | 476,8                | 7    |
| <b>CIT</b>  | 29,1                 | 11   | 39,7                 | 10   | 81,6                 | 8    | 243,9                | 9    |
| <b>GLY</b>  | 327,1                | 10   | 359,0                | 9    | 463,1                | 8    | 867,0                | 9    |
| <b>LEU</b>  | 185,6                | 7    | 201,2                | 7    | 251,8                | 6    | 447,1                | 6    |
| <b>MET</b>  | 27,2                 | 7    | 33,5                 | 8    | 57,0                 | 7    | 152,3                | 7    |
| <b>SA</b>   | 0,8                  | 25   | 1,7                  | 21   | 5,4                  | 12   | 20,5                 | 10   |
| <b>ORN</b>  | 127,2                | 7    | 152,5                | 7    | 254,6                | 6    | 637,2                | 7    |
| <b>PHE</b>  | 84,7                 | 7    | 102,2                | 8    | 166,3                | 7    | 419,5                | 8    |
| <b>PRO</b>  | 275,5                | 9    | 304,4                | 9    | 398,9                | 6    | 763,4                | 9    |
| <b>TYR</b>  | 83,8                 | 8    | 104,1                | 7    | 182,0                | 7    | 482,8                | 7    |
| <b>VAL</b>  | 206,2                | 8    | 222,9                | 8    | 278,6                | 7    | 489,2                | 8    |
| <b>C0</b>   | 51,0                 | 7    | 67,9                 | 7    | 134,9                | 8    | 390,0                | 6    |
| <b>C2</b>   | 36,4                 | 7    | 42,0                 | 8    | 60,8                 | 7    | 134,6                | 7    |
| <b>C3</b>   | 3,3                  | 9    | 4,0                  | 11   | 6,3                  | 8    | 15,3                 | 9    |
| <b>C4</b>   | 0,3                  | 11   | 0,7                  | 10   | 2,2                  | 8    | 8,3                  | 10   |
| <b>C5</b>   | 0,3                  | 11   | 0,6                  | 10   | 2,0                  | 7    | 7,4                  | 7    |
| <b>C5DC</b> | 0,2                  | 13   | 0,4                  | 12   | 1,2                  | 10   | 4,2                  | 8    |
| <b>C6</b>   | 0,1                  | 12   | 0,5                  | 10   | 2,0                  | 8    | 7,7                  | 8    |
| <b>C8</b>   | 0,1                  | 13   | 0,4                  | 9    | 1,3                  | 8    | 5,0                  | 7    |
| <b>C10</b>  | 0,1                  | 12   | 0,3                  | 10   | 0,9                  | 9    | 3,3                  | 7    |
| <b>C12</b>  | 0,1                  | 10   | 0,4                  | 8    | 1,5                  | 7    | 6,0                  | 7    |
| <b>C14</b>  | 0,2                  | 10   | 0,4                  | 8    | 1,4                  | 7    | 5,3                  | 7    |
| <b>C16</b>  | 2,2                  | 8    | 2,7                  | 7    | 4,6                  | 6    | 12,2                 | 8    |
| <b>C18</b>  | 2,1                  | 7    | 2,3                  | 6    | 2,9                  | 6    | 5,5                  | 10   |

El % total CV incluye: imprecisión dentro del ensayo, entre ensayos-dentro del día, y entre días.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una cetona biológicamente activa, comprendiendo el procedimiento:  
poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende un monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada y una base fuerte;
- 5 derivatizar una cetona biológicamente activa en la muestra; y  
evaluar la cetona biológicamente activa derivatizada en la muestra derivatizada usando espectrometría de masas en tándem;  
en el que la cetona biológicamente activa es succinilacetona o un esteroide.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada es metanol, etanol, propanol, o isopropanol.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada es metanol.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la base fuerte es hidrazina.
- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la disolución de extracción comprende al menos 5% de agua.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la disolución de extracción comprende menos de 85% del monoalcohol C<sub>1-3</sub> de cadena lineal o ramificada.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cetona biológicamente activa se derivatiza con hidrazina o hidrazina derivatizada.
- 20 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cetona biológicamente activa es succinilacetona.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que derivatizar succinilacetona en la muestra comprende derivatizar succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP).
- 25 10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además evaluar la muestra respecto a uno o más analitos adicionales, en el que preferiblemente los uno o más analitos adicionales se evalúan con MPP en la misma inyección de muestra.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende además determinar si un sujeto del que se tomó la muestra tiene, o presenta riesgo de desarrollar, tirosinemia hereditaria tipo I, sobre la base de la detección de succinilacetona en la muestra.
- 30 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que se incluye en la muestra una succinilacetona derivatizada que comprende al menos un isótopo pesado de un átomo antes del análisis espectrométrico de masas.
13. Un procedimiento para extracción, comprendiendo el procedimiento:  
35 poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que comprende metanol y una base fuerte, en el que el poner en contacto la muestra con la disolución de extracción produce un extracto que comprende:
  - (i) succinilacetona derivatizada;
  - (ii) uno o más aminoácidos;
  - (iii) carnitina libre;
  - (iv) una o más acilcarnitinas; o
  - 40 (v) una forma derivatizada de (ii), (iii), o (iv) de la muestra, en el que la concentración de la succinilacetona en el extracto refleja la concentración de succinilacetona en la muestra, y en el que la concentración de uno o más aminoácidos, carnitina libre, una o más acilcarnitinas, o formas derivatizadas de las mismas en el extracto refleja sus respectivas concentraciones en la muestra.
- 45 14. El procedimiento de la reivindicación 13, que comprende además, después de poner en contacto la muestra con la disolución de extracción, analizar la muestra usando espectrometría de masas en tándem.

15. El procedimiento de la reivindicación 13 o la 14, en el que el poner en contacto derivatiza al menos una molécula de succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il) propiónico (MPP).
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que la muestra es una muestra de sangre seca.
- 5 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que la disolución de extracción comprende además un ácido orgánico, en la que preferiblemente el ácido orgánico es ácido oxálico.

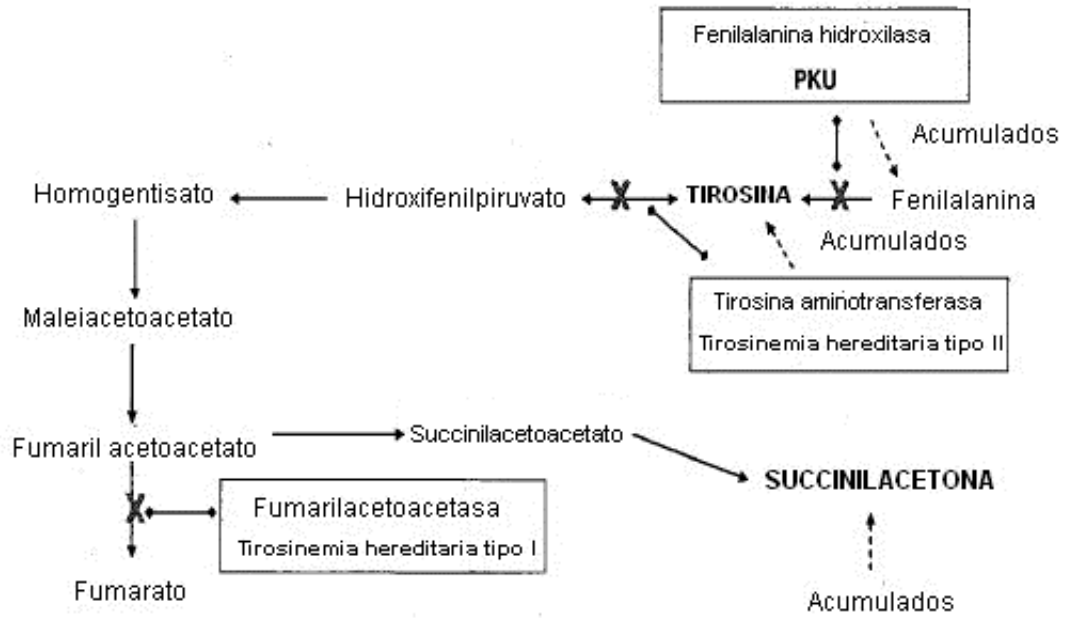


FIG. 1



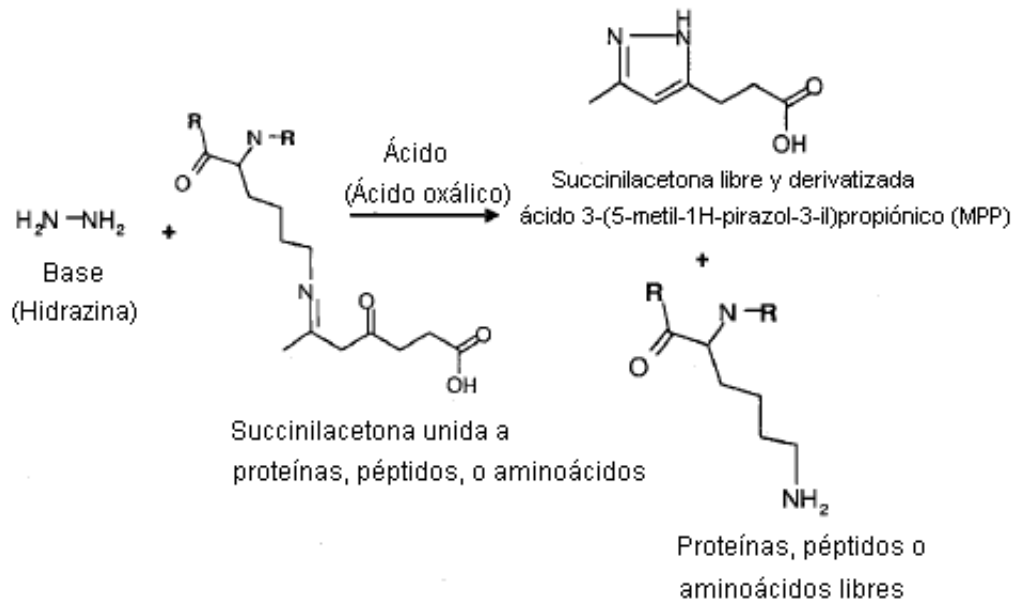
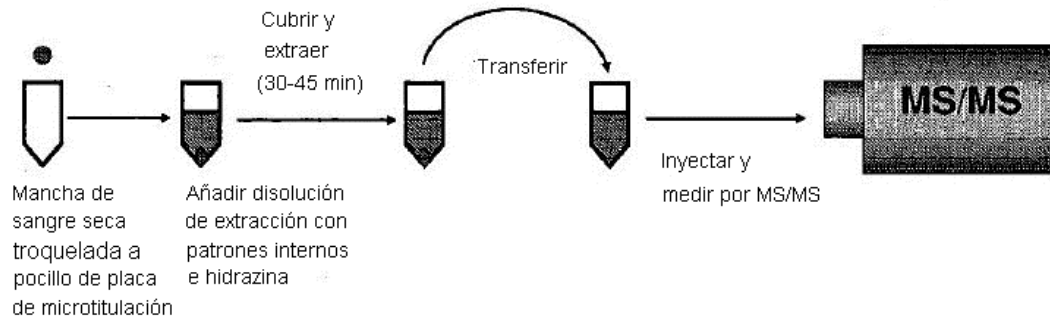


FIG. 2



**FIG. 3**

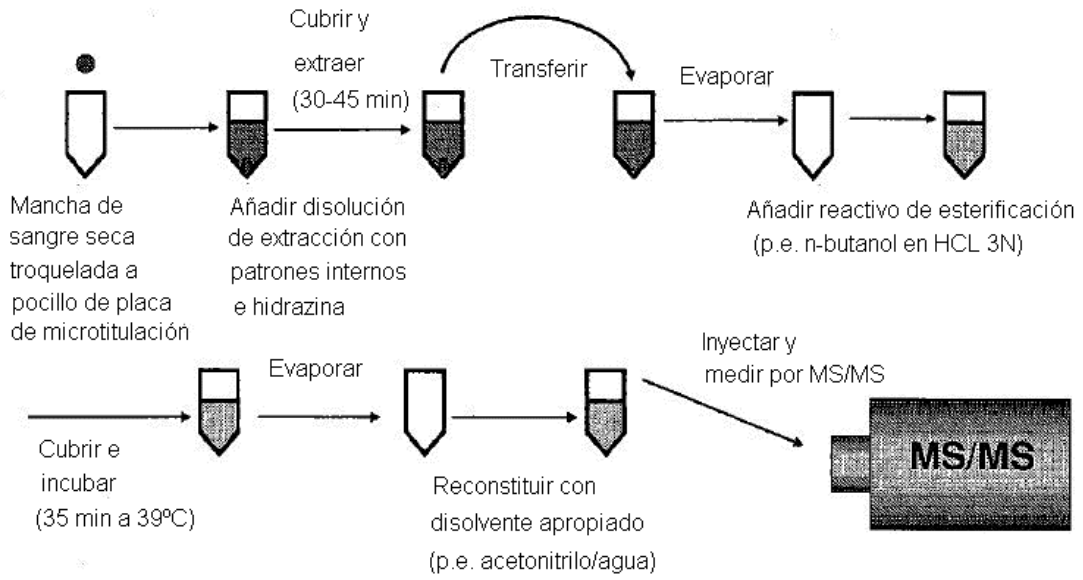


FIG. 4

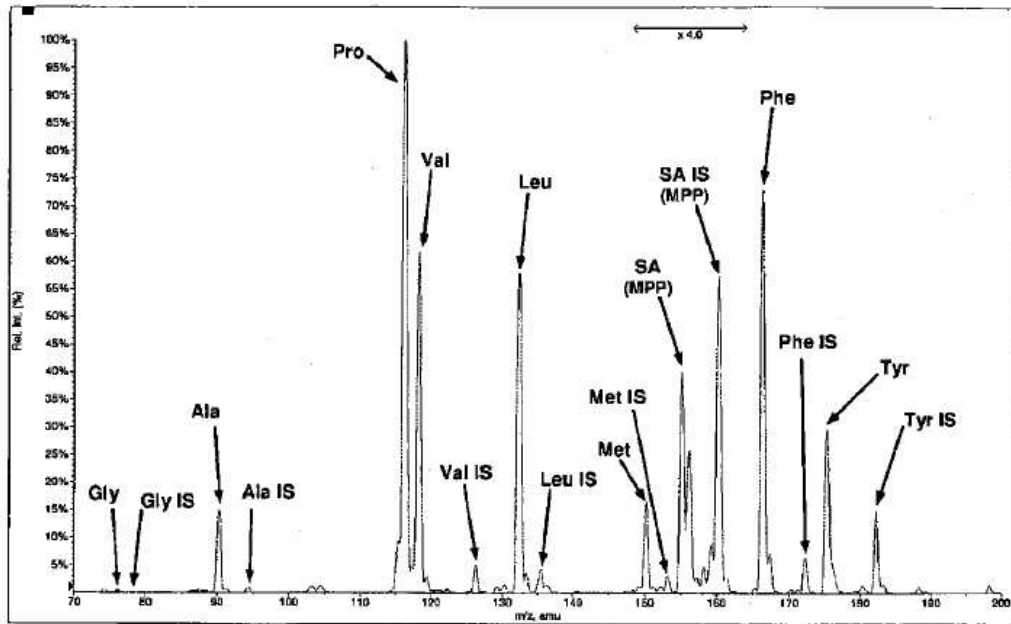


FIG. 5

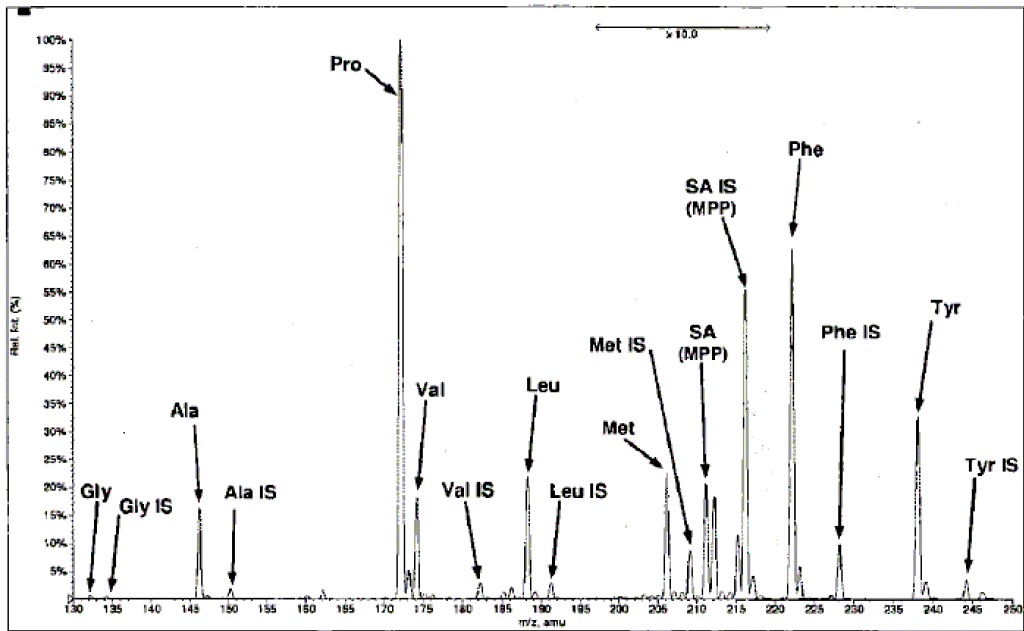
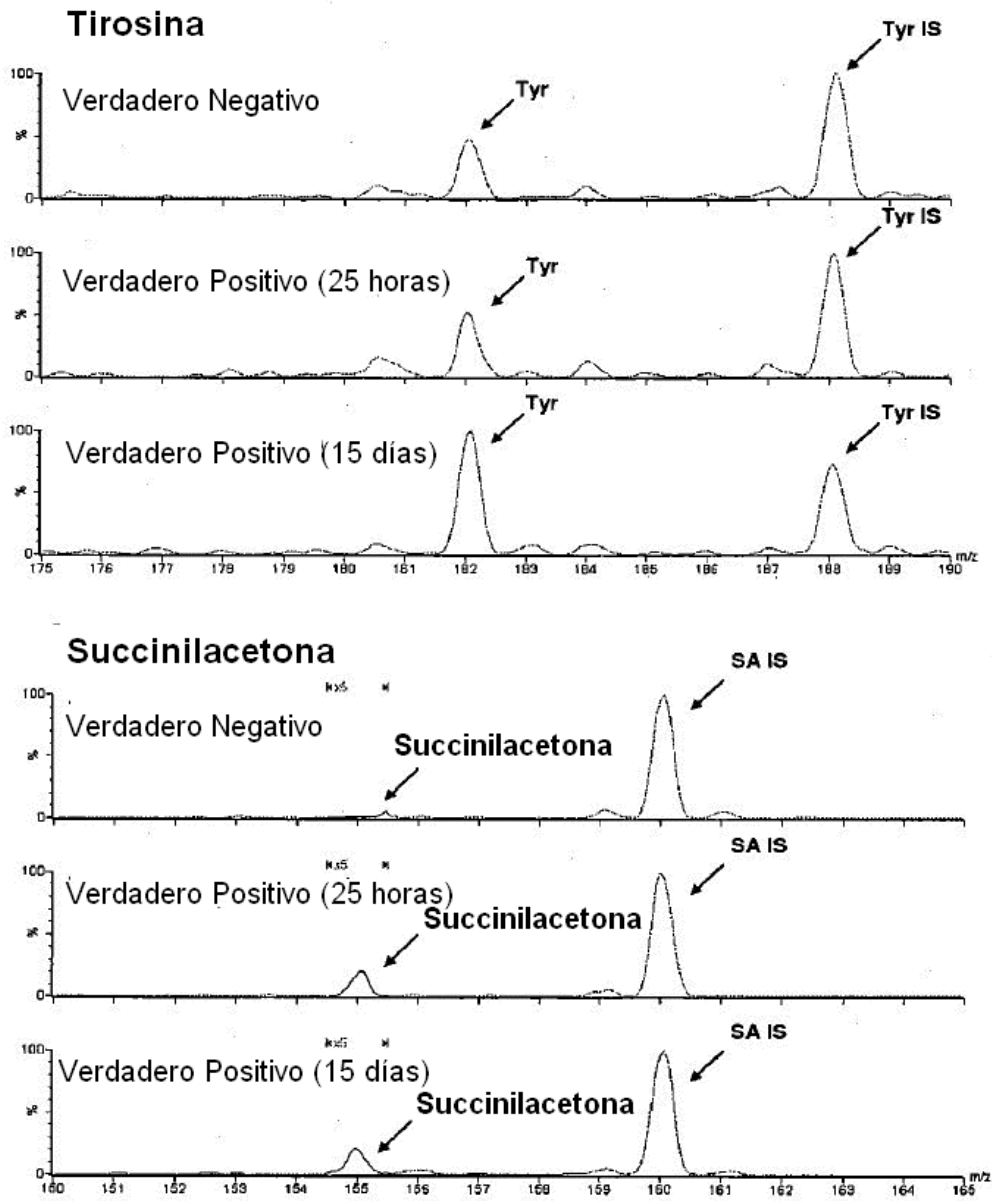


FIG. 6



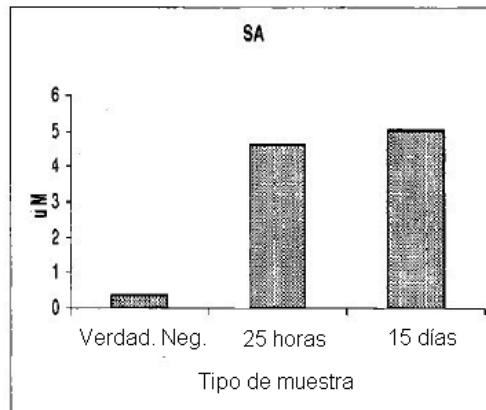
Nota: la región de succinilacetona está ampliada 5X

FIG. 7

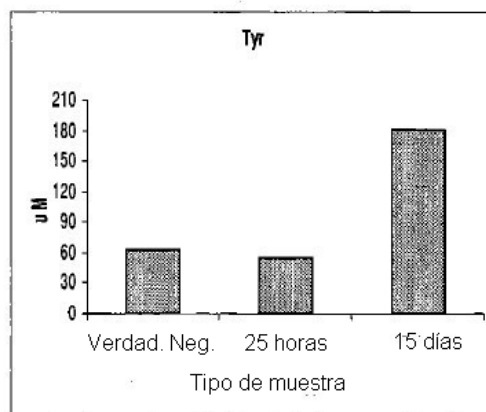


|  |       |        |
|--|-------|--------|
| Categoría  | SA    | TYR    |
| Límites de corte   | 2*    | 575    |
| Concentración media verdadero negativo                   | 0,51  | 93,57  |
| Verdadero negativo, SD                                   | 0,13  | 25,33  |
| Verdadero negativo, % CV                                 | 25%   | 27%    |
| Muestra 1 - Replicado 1, concentración, $\mu\text{M}$    | 4,42  | 65,89  |
| Muestra 1 - Replicado 1. Separación de la media TN en SD | 30,36 | -1,09  |
| Muestra 2 - concentración, $\mu\text{M}$                 | 5,73  | 232,31 |
| Muestra 1 - Replicado 1. Separación de la media TN en SD | 40,55 | 5,48   |

**A**



**B**



**FIG. 8**

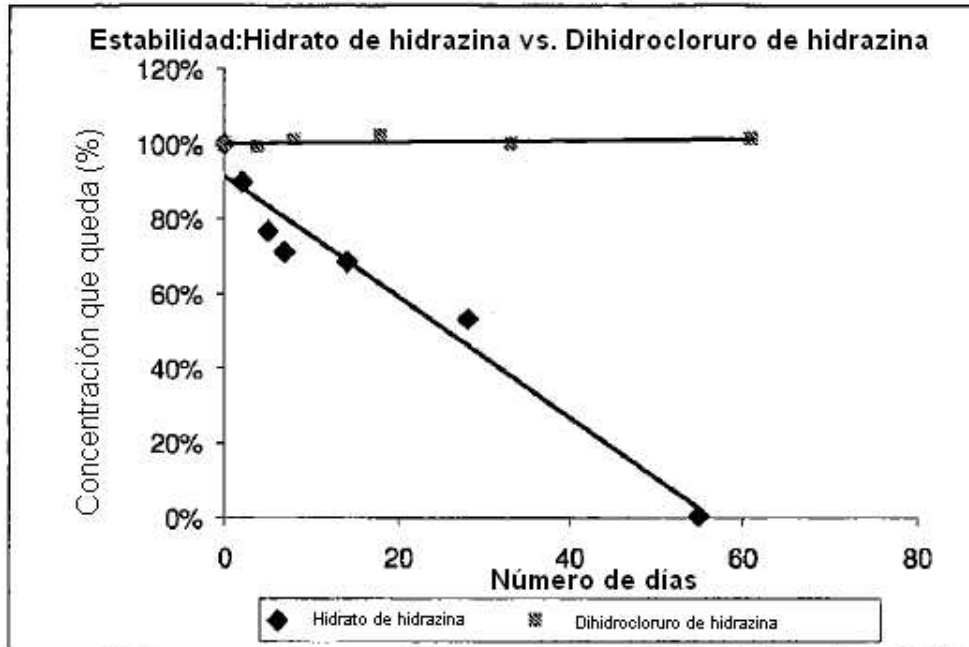


FIG. 9