



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 041**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/72** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06703925 .5**  
96 Fecha de presentación : **01.02.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1844338**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.10.2007**

54 Título: **Procedimiento de cribado.**

30 Prioridad: **01.02.2005 GB 0502068**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2011**

73 Titular/es: **King'S College London  
An Institute Incorporated by Royal Charter, Strand  
London WC2R 2LS, GB  
Guy's & St Thomas' Nhs Foundation Trust**

72 Inventor/es: **Turner, Charles;  
Dalton, Raymond, Neil y  
Daniel, Yvonne, Anne**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 365 041 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

## Procedimiento de cribado

La presente invención se refiere a un procedimiento para cribar péptidos variantes usando espectrometría de masas (EM). La presente invención también se refiere a un sistema y a un kit para realizar el procedimiento.

5 La espectrometría de masas ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para la determinación de estructuras moleculares de moléculas de muchos tipos que incluyen biomoléculas y, hoy en día se pone en práctica generalizadamente. La técnica implica el bombardeo de la especie molecular en examen con electrones u otras partículas de alta energía que producen la ionización y la fragmentación de la molécula, produciendo un amplio espectro de partículas ionizadas de carga y masa variables. Las técnicas de ionización suave tales como la electropulverización producen la ionización, pero no producen principalmente la fragmentación de moléculas. La técnica es particularmente valiosa en la producción de especies múltiplemente cargadas de proteínas y péptidos. Los complejos espectros masa/carga producidos se convierten, como se pone en práctica convencionalmente, en un espectro desconvolucionado generado por ordenador que tiene un único pico de masa para cada polipéptido. Los desarrollos actuales de la espectrometría de masas se han centrado ampliamente en desarrollar el software más eficaz necesario para el análisis de desconvoluciones. Sin embargo, a pesar de continuar las mejoras en esta parte de la técnica, éste sigue siendo el componente más exigente y que requiere mucho tiempo del procedimiento para cada determinación particular. El uso del análisis de desconvoluciones se ha convertido en indispensable en la espectrometría de masas que tiene como objetivo la elucidación de estructuras moleculares previamente desconocidas o inciertas, pero demostró que era difícil simplificar la metodología actual para reducir significativamente el tiempo requerido para su realización.

La espectrometría de masas también se usa para la detección de proteínas y polipéptidos variantes que participan en enfermedades graves. Por ejemplo, se sabe que muchas formas variantes o mutantes de las subunidades del polipéptido de hemoglobina producen diversas formas de anemia, y muchas de tales mutaciones son de sólo un aminoácido. En la bibliografía ya hay constancia de la estructura molecular básica y las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, y las mutaciones correspondientes en el ADN que las codifican.

La espectrometría de masas también se ha usado para cribar poblaciones de trastornos metabólicos heredados (TMH) (Chase y col., Clin. Chem., 49, 1797-1817, 2003).

En seres humanos, las hemoglobinopatías son los trastornos heredados más comunes. Esto resulta de mutaciones a los genes de globina y se han caracterizado más de 800 variantes de hemoglobina (Huisman y col., Human Haemoglobin Variants, 2ª ed., Augusta, GA: Sickle Cell Anemia Foundation 1998), muchas de las cuales son de relevancia no clínica. Las variantes de hemoglobina se detectan normalmente como resultado de programas de cribado preanestésico o de reconocimiento neonatal y prenatal. Las variantes que producen síntomas clínicos también pueden identificarse como parte de investigaciones de diagnóstico. Iniciativas de salud recientes, que han expandido los programas de reconocimiento neonatal y prenatal existentes, han aumentado espectacularmente la carga de trabajo (The NHS Plan July 2000, publicación del parlamento 4818). También han conducido a un requisito para probar sistemas específicos para aquellas variantes de hemoglobina consideradas clínicamente significativas. Los dos programas tienen diferentes objetivos. En el reconocimiento prenatal, el objetivo es identificar vehículos de aquellas hemoglobinopatías que representen un riesgo genético para el feto. Por tanto, el objetivo es detectar la presencia o ausencia de hemoglobina drepanocítica y rasgo de talasemia beta o una de las variantes de hemoglobina que interactúan con ellas, por ejemplo, Hb C, Hb D<sup>Punjab</sup>, Hb O<sup>Arab</sup>, Hb Lepore y Hb E. Además, están incluidas las otras tres condiciones de importancia potencialmente clínica, concretamente talasemia delta-beta, persistencia hereditaria de rasgo de hemoglobina fetal (HPFH) y rasgo de talasemia alfa-cero también. En el reconocimiento neonatal el objetivo es la identificación temprana de individuos con drepanocitosis y talasemia beta mayor con el fin de iniciar el tratamiento.

El diagnóstico bioquímico clásico de hemoglobinopatías usa información fenotípica generada tanto por técnicas electroforéticas como por cromatografía de intercambio de catiónico (Working Party of General Haematology Task Force, 1998). Esto forma la base de las actuales técnicas de cribado; sin embargo, son lentas, laboriosas y no son específicas. Además, no eligen diana y, por tanto, detectarán variantes de hemoglobina que no son requeridas por los programas de cribado. La espectrometría de masas (EM) de cuadrupolo por electropulverización es posiblemente más rápida, más específica y es más rentable para el cribado de poblaciones.

La mayoría de los procedimientos publicados para la caracterización de hemoglobinopatías usando EM han usado barridos de sangre completa para evaluar las masas de las cadenas de globina intactas seguido de digestión trípica y análisis de los péptidos (Wild y col., Blood Cells, Molecules and Diseases, 27, 691-704, 2001). De esta forma es posible caracterizar inequívocamente la mayoría de las mutaciones de globina.

Se hace referencia a Wild y col., 2001, (citado anteriormente), para detalles del procedimiento de EM, en particular la sección de procedimientos en la página 693 y la Figura 2, página 697, que muestra espectros de masas de ESI desconvolucionados para la cadena de hemoglobina  $\beta$  variante normal y una particular. La Tabla 1 en la página 698 de Wild y col., 2001, (citado anteriormente), enumera muchos cambios de masas y aminoácidos producidos por

cambios de una única base en el triplete que codifica el nucleótido y que son determinables por el procedimiento de EM.

En la solicitud de patente internacional WO 2004/090552 se usa un procedimiento de EM simplificado para detectar la presencia de una mutación de proteínas de drepanocitos de la cadena de globina  $\beta$ . Trabajando desde el conocimiento del polipéptido (natural) normal y su mutante, la EM se basa en especies cargadas y se evita el registro y el análisis de todos los otros datos. Por tanto, es posible detectar una única especie ionizada elegida como diana y para un pico correspondiente a la variante si está presente en la muestra probada. El procedimiento se denomina en lo sucesivo uno de especie ionizada seleccionada específica para la elección como diana. Los procedimientos relacionados también se describen por Shushan y col., *Clinical Chemistry*, 44, A150, 1998; Liu Tao y col., *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao*, 34, 423-432, 2002; Kobold y col., *Clinical Chemistry*, 43, 1944-1951, 1997; Wan y col., *J. Chromatog.*, 913, 437-446, 2001; y Van Dorsselaer y col., *Biochemistry*, 28, 2949-2956, 1989.

Nakanishi y col., *J. Mass Spectrometry*, 30, 1663-1670, 1995, también describe un procedimiento para la identificación de variantes de hemoglobina, pero no desvelan ionizar una serie definida de péptidos de la digestión de proteínas y seleccionar por espectrometría de masas una especie ionizada de relación masa/carga conocida indicativa de una variante de proteína; y someter la especie ionizada seleccionada a disociación inducida por colisión y medir una o más de las especies ionizadas derivadas de relación masa/carga conocida que confirman la presencia de la variante de proteína en una muestra.

Todavía hay varios problemas con los procedimientos de la técnica anterior que incluyen que la especie ionizada elegida como diana que se detecta pueda confundirse con una especie que tiene la relación masa/carga idéntica, y un falta de sensibilidad. Además, cuando una variante de proteína se diferencia de una forma mínima de la proteína natural, puede ser muy difícil distinguir entre la proteína variante y la natural usando EM.

La presente invención se refiere a un procedimiento más sensible para cribar variaciones de proteínas. El aumento de la sensibilidad es particularmente importante cuando la proteína variante está en una muestra obtenida de un individuo que es heterólogo para la proteína variante.

La presente invención proporciona un procedimiento para detectar una variante de proteína conocida en una muestra que comprende:

- (i) digerir la proteína para producir una serie definida de péptidos;
- (ii) ionizar los péptidos y seleccionar por espectrometría de masas una especie ionizada de relación masa/carga conocida indicativa de la variante de proteína; y
- (iii) someter la especie ionizada seleccionada a disociación inducida por colisión y medir una o más de las especies ionizadas derivadas de la relación masa/carga conocida que confirme la presencia de la variante de proteína en la muestra.

El procedimiento de la presente invención permite la detección precisa y específica de una variante de proteína. En particular, digiriendo la proteína para producir una serie definida de péptidos y sometiendo la especie ionizada seleccionada a disociación inducida por colisión hay considerablemente menos oportunidad de que el procedimiento detecte un positivo falso.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para detectar cualquier variante de proteína tal como una mutación de proteína o una concentración anormal de una proteína natural. Por tanto, cualquier trastorno heredado que conduzca a la producción de variantes de proteínas puede detectarse usando la presente invención. Las variantes de proteínas particulares que pueden detectarse con el procedimiento de la presente invención incluyen variantes de hemoglobina y variantes de proteínas asociadas a trastornos congénitos de glicosilación (TCG). Las proteínas de hemoglobina variantes que producen diversas formas de anemia pueden encontrarse descritas en libros de texto habituales que incluyen 'Clinical Genetics' por Golder N. Wilson, Wiley Liss (2000) en las páginas 114-119. Wild y col., 2001 (citado anteriormente) también enumeran muchos de tales cambios de aminoácidos en la página 698 del mismo. Todas esas variaciones son responsables de la detección según la presente invención. Es particularmente preferido que el procedimiento de la presente invención se use para detectar variantes de hemoglobina clínicamente importantes tales como Hb S, Hb C, Hb D<sup>Punjab</sup>, Hb O<sup>Arab</sup>, Hb Lepore, Hb E, talasemia delta-beta, persistencia hereditaria de rasgo de hemoglobina fetal (HPFH) y rasgo de talasemia alfa-cero. Se prefiere adicionalmente que el procedimiento de la presente invención se use para detectar las siguientes variantes de hemoglobina clínicamente importantes: S, C, E, D<sup>Punjab</sup> y O<sup>Arab</sup>.

La variante de proteína que va a detectarse puede ser cualquier proteína que incluya una glicoproteína. En particular, glicoproteínas específicas indicativas de un trastorno metabólico pueden detectarse usando el procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, trastornos congénitos de glicosilación (TCG) se diagnostican normalmente por análisis de transferrina en plasma, una proteína en plasma normalmente excesivamente glicosilada que muestra patrones característicos de incorporación por defecto de restos de azúcar dependiendo del tipo preciso de TCG. La variante de proteína que va a detectarse puede ser cualquier proteína indicativa de un trastorno o una enfermedad. Por ejemplo: albúmina en orina, que se considera un marcador de lesión endotelial en el riñón y, por tanto, un marcador de riesgo de progresión de enfermedad renal y lesión cardiovascular; proteínas de bajo peso molecular en

la orina (por ejemplo, proteína de unión a retinol), niveles elevados de las cuales indican lesión de los túbulos renales; variantes de proteínas del prion (PrP) en LCR pueden indicar encefalopatías espongiiformes heredadas; y proteínas pancreáticas en sangre podrían permitir el cribado de fibrosis quística.

5 El procedimiento se usa para detectar una variante de proteína conocida. Por consiguiente, la secuencia de la variante de proteína que va a detectarse debe ser conocida. Esto es importante ya que el procedimiento requiere la selección de una especie ionizada de relación masa/carga conocida derivada de la proteína. Si la variante que se detecta no es conocida, entonces no es posible determinar la relación masa/carga de la especie ionizada derivada de la proteína.

El término “especie ionizada” se refiere a un péptido que se ha ionizado y, por tanto, está cargado.

10 Al seleccionar una especie ionizada de relación masa/carga conocida sólo se necesita barrer una ventana limitada de relaciones masa/carga. Esto reduce considerablemente la cantidad de trabajo y análisis que necesita realizar el operario. En particular, al seleccionar una única especie ionizada de relación masa/carga conocida no necesita determinarse un amplio espectro de partículas ionizadas que tengan diferentes relaciones masa/carga y no necesita realizarse la complicada etapa y que requiere mucho tiempo de análisis de desconvolución. Evitando estas etapas  
15 que requieren mucho tiempo los procedimientos pueden usarse para determinar rápidamente y con exactitud la presencia de la variante de proteína.

En algunas situaciones, el procedimiento puede usarse para seleccionar un número pequeño de especies ionizadas de relación masa/carga conocida. El pequeño número de especies ionizadas pueden ser de 1 a 20, preferentemente 1 a 10, más preferentemente 1 a 5. Incluso cuando el procedimiento comprenda seleccionar un número pequeño de especies ionizadas de relación masa/carga conocida, el procedimiento será considerablemente más rápido y menos complicado que los procedimientos de la técnica anterior en los que se determina un amplio espectro de partículas ionizadas. Lo más preferido es que el procedimiento comprenda seleccionar una única especie ionizada que tenga una relación masa/carga conocida.

25 La muestra en la que la variante de proteína se detecta puede ser cualquier muestra adecuada tal como muestras de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y tejido. Obviamente, el tipo de muestra dependerá de la variante de proteína que va a detectarse. Si la variante de proteína es una variante de hemoglobina, la muestra es preferentemente sangre. Además, se ha encontrado que manchas de sangre pueden usarse como muestras. La muestra puede procesarse mediante procedimientos convencionales para eliminar cualquier contaminante no deseado, para concentrar la variante de proteína que va a detectarse, para desnaturalizar la proteína y/o para poner la muestra en  
30 una forma adecuada para la digestión de proteínas. Los procedimientos adecuados para procesar la muestra son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

La proteína se digiere para producir una serie definida de péptidos. El término “una serie definida de péptidos” significa que la serie de péptidos producida puede predecirse digiriendo la proteína. Por ejemplo, si se usa una proteasa de secuencia específica (es decir, una proteasa que se escinde en una secuencia específica) tal como tripsina, la serie de péptidos producida puede predecirse basándose en la secuencia de la proteína.

35 Digiriendo la proteína para producir una serie de péptidos, uno o más de los péptidos será específico para la variante de proteína que va a detectarse. Por ejemplo, si la proteína variante se diferencia de la proteína natural (proteína no variante) por un único aminoácido, el péptido que comprende el aminoácido variante será indicativo de la proteína variante. Alternativamente, si la proteína variante se diferencia de la proteína natural de tal forma que cambie un sitio de escisión para una proteasa particular, se producirán uno o más péptidos nuevos, y el uno o más péptidos nuevos serán indicativos de la proteína variante.

La variante de proteína puede ser una proteína natural que se diferencia de una proteína relacionada. De nuevo, cualquier diferencia entre las proteínas puede usarse para detectar específicamente la variante de proteína.

45 Las series definidas de péptidos se ionizan y se selecciona una especie ionizada de relación masa/carga conocida que es indicativa de la variante de proteína. Los péptidos pueden ionizarse y las especies ionizadas seleccionarse usando cualquier procedimiento de espectrometría de masas conocido para aquellos expertos en la materia. En una realización preferida, la espectrometría de masas de cuadrupolo de ionización por electropulverización se usa para ionizar los péptidos y para seleccionar las especies ionizadas. Se apreciará por aquellos expertos en este campo general de tecnología que también son posibles otros procedimientos de ionización, particularmente técnicas de ionización suaves, por ejemplo, bombardeo de átomos rápidos (FAB) e ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI), y otros sistemas de análisis de masa, por ejemplo, tiempo de vuelo (TOF) y sector magnético.

50 Como el péptido ionizado específico que va a seleccionarse es conocido, es posible predecir la relación masa/carga de la especie ionizada que va a seleccionarse por espectrometría de masas. Como será evidente para aquellos expertos en la materia, un péptido particular formará, dependiendo del grado de ionización, varias especies ionizadas que tienen diferentes relaciones masa/carga. Pueden seleccionarse una o más de las especies ionizadas. La especie ionizada que va a seleccionarse dependerá de varias variables que incluyen facilidad de fragmentación y capacidad para distinguir especies ionizadas derivadas de aquellas derivadas de la proteína no variante, pero deberán elegirse con el fin de obtener el nivel de detección óptimo.

- 5 Como se indica anteriormente, la especie ionizada seleccionada será indicativa de la variante de proteína ya que se producirá tanto a partir de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos variante (es decir, la secuencia de aminoácidos del péptido será diferente de la del péptido correspondiente obtenido a partir de la proteína (no variante) natural o se producirá a partir de un péptido sólo formado cuando la proteína variante se digiere (es decir, la proteína variante tiene un sitio de escisión diferente en la digestión en comparación con la proteína (no variante) natural).
- La especie ionizada seleccionada es sólo indicativa de la proteína variante ya que puede ser una especie ionizada sin relacionar que tiene la misma relación masa/carga. La especie ionizada sin relacionar puede formarse a partir de una proteína diferente presente en la muestra o puede formarse a partir de una parte diferente de la proteína variante o no variante.
- 10 En vista de esto y con el fin de mejorar la precisión del procedimiento, la especie ionizada seleccionada se somete a disociación inducida por colisión y se miden una o más especies ionizadas derivadas de la relación masa/carga conocida. La especie ionizada seleccionada puede ionizarse y medirse usando cualquier procedimiento de espectrometría de masas conocido para aquellos expertos en la materia. Los procedimientos preferidos se han indicado anteriormente.
- 15 Al someter las especies ionizadas seleccionadas a disociación inducida por colisión pueden ocurrir dos cosas.
- En primer lugar, la especie ionizada seleccionada se disocia para dar una pluralidad de fragmentos de péptidos ionizados. La serie de fragmentos ionizados de péptidos puede medirse para identificar una especie ionizada de relación masa/carga conocida. Es posible predecir qué especie ionizada se producirá con la disociación de la especie ionizada seleccionada si la especie ionizada seleccionada se deriva de la variante de proteína. También puede predecirse la relación masa/carga. Por consiguiente, en la búsqueda de especies ionizadas tras la disociación es posible confirmar la presencia de la variante de proteína en la muestra.
- 20 En segundo lugar, la especie ionizada seleccionada no se disocia para dar una pluralidad de péptidos ionizados. Sin embargo, puede disociarse cualquier péptido isobárico contaminante. Por tanto, la especie ionizada seleccionada puede medirse y confirmará la presencia de la variante de proteína en la muestra.
- 25 Por consiguiente, la una o más especies ionizadas derivadas pueden ser idénticas a las especies ionizadas originalmente seleccionadas o pueden ionizarse fragmentos de las mismas. Por ejemplo, las especies ionizadas originalmente seleccionadas pueden disociarse en 2 o más especies de péptidos ionizadas más pequeñas.
- El nivel de disociación inducida por colisión puede variarse y así puede controlarse el grado de disociación de las especies ionizadas seleccionadas. En una realización preferida de la presente invención, la especie ionizada seleccionada se somete a: 1. fragmentación de baja energía que ni produce disociación sustancial de las especies ionizadas seleccionadas ni conduce a la producción de una pluralidad de fragmentos ionizados de péptidos (fragmentación de bajo nivel); y 2. fragmentación de alta energía que produce la eliminación de aminoácidos de ambos extremos de las especies ionizadas (fragmentación de alta energía). Por tanto, la detección de los aminoácidos permite que un experto en la materia determine la secuencia de las especies ionizadas seleccionadas.
- 30 Realizando adicionalmente la fragmentación de alta energía se obtiene más información referente a la identidad de las especies ionizadas seleccionadas. Esta información adicional proporciona confirmación adicional de la presencia de la variante de proteína en la muestra.
- Por consiguiente, se prefiere que el procedimiento de la presente invención comprenda adicionalmente someter las especies ionizadas seleccionadas a fragmentación de alta energía de manera que se eliminen aminoácidos de ambos extremos de las especies ionizadas y se determine la secuencia de las especies ionizadas.
- 40 Los niveles de disociación inducida por colisión de fragmentación de baja y de alta energía pueden realizarse simultáneamente o secuencialmente. Preferentemente, los niveles de disociación inducida por colisión de baja y alta energía se realizan simultáneamente. Hay varios espectrómetros de masas disponibles que pueden realizar fragmentación de alta y de baja energía simultáneamente. En particular puede usarse cualquier espectrómetro de masas que tenga una trampa de iones lineal tal como API 2000 Q-trap o Q-trap 4000 (SCIEX):
- 45 La presente invención también proporciona un sistema para realizar el procedimiento de la presente invención, en el que el sistema comprende una máquina para realizar el sistema de espectrometría de masas en tándem para realizar el procedimiento de la presente invención.
- 50 La presente invención también proporciona un kit para realizar el procedimiento de la presente invención, en el que el kit comprende:
- (i) tampones y reactivos para preparar la muestra de proteína;
  - (ii) una proteasa para digerir la muestra de proteína en una serie de péptidos definidos;
  - (iii) un sustrato de vehículo para administrar la muestra a una máquina para realizar espectrometría de masas en tándem; y
  - (iv) una máquina para realizar el sistema de espectrometría de masas en tándem para realizar el
- 55

procedimiento de la presente invención.

El kit puede comprender adicionalmente software adecuado para instalar la máquina para realizar el procedimiento de la presente invención.

La presente invención descrita ahora a modo de ejemplo sólo se refiere a las siguientes figuras.

- 5 La Figura 1 muestra los barridos de masa  $m/z$  100-1500 de digestos tripticos de sangre de un sujeto de control con hemoglobina beta normal (A) y un paciente con drepanocitosis (B). Las inserciones enfatizan la complejidad de los espectros brutos. Todos las flechas revelan espectros ampliados para los iones  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+H]^+$  informativos para el control (A) y el paciente con drepanocitosis (B), respectivamente. Obsérvese el desplazamiento de masa de -30 Da para los iones  $[M+H]^+$  y - Da para los iones  $[M+H]^+$ .
- 10 La Figura 2 muestra los barridos iónicos producto del péptido T1 de hemoglobina beta de control  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  476,8, (A) y el péptido T1 de hemoglobina S  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  461,8, (B). Obsérvese las series de fragmentos y b que proporcionan datos de secuencias inequívocos y los iones diana de MRM y4,  $m/z$  502,3 y 472,3, respectivamente.
- La Figura 3 muestra el péptido T1 de globina beta - transiciones de MRM extraídas  $m/z$  476,9/502,3 (hemoglobina beta natural) y  $m/z$  461,9/472,4 (hemoglobina S) para control, rasgo de drepanocito y drepanocitosis.
- 15 La Figura 4 muestra el péptido T1 de globina beta - transiciones de MRM extraídas  $m/z$  476,9/502,3 (hemoglobina beta natural) y  $m/z$  694,7/694,7 (hemoglobina C) para control, rasgo de C y enfermedad de C.
- La Figura 5 muestra el péptido T13 de globina beta - transiciones de MRM extraídas  $m/z$  1378,8/1378,8 (hemoglobina beta natural) y  $m/z$  1377,8/1377,8 (hemoglobina D<sup>Punjab</sup>) para control, rasgo de D<sup>Punjab</sup> y enfermedad de de D<sup>Punjab</sup>.
- 20 La Figura 6 muestra el péptido T13 de globina beta - transiciones de MRM extraídas  $m/z$  1378,8/1378,8 (hemoglobina beta natural) y  $m/z$  1249,7/1249,7 (hemoglobina Q<sup>Arab</sup>) para control, rasgo de O<sup>Arab</sup> y enfermedad de O<sup>Arab</sup>.
- La Figura 7 muestra el péptido T3 de globina beta - transiciones de MRM extraídas  $m/z$  1314,7/1314,7 (hemoglobina beta natural) y  $m/z$  916,8/916,8 (hemoglobina E) para control, rasgo de E y enfermedad de E.

### Ejemplos

- 25 Los inventores han desarrollado un enfoque que elige diana para identificar específicamente importantes variantes de proteínas, especialmente variantes de globina. Éste usa el hecho de que la mutación responsable de cada una de las variantes descritas es conocida y, por tanto, puede determinarse a partir del código genético la secuencia de aminoácidos. El procedimiento de digestión con tripsina escinde la cadena de globina, en los puntos en la cadena en los que se producen arginina y lisina, en una serie de péptidos. Un espectrómetro de masas en tándem (API 4000, MDS-SCIEx) permite la selección de los péptidos y la fragmentación inducida por colisión de forma que pueda
- 30 detectarse una especie ionizada específica para la mutación. Las mutaciones que alteran los sitios de escisión, añadiendo o sustituyendo arginina y lisina, generan péptidos que son específicos si está presente una única mutación.

- Los inventores han realizado una serie de experimentos de MSMS y pseudo-MSMS para investigar los tres péptidos importantes formados durante la digestión triptica de globina beta, T1, T3 y T13, que incluyen las mutaciones asociadas a hemoglobina S, C, E, D<sup>Punjab</sup> y O<sup>Arab</sup>. El protocolo busca productos ionizados específicos para hemoglobina S y hemoglobina C, D<sup>Punjab</sup>, O<sup>Arab</sup> y E. También se mide una especie ionizada específica para la masa de la cadena beta de T1 y especies ionizadas correspondientes con los péptidos T3 y T13 normales. Esto se usó como comprobación del control de calidad para el procedimiento analítico y para determinar el vehículo o estado de enfermedad para las mutaciones.

### 40 Hemoglobina S

- La hemoglobina S se forma como resultado de una sustitución del aminoácido ácido glutámico natural por valina en la posición 6 de la cadena beta. Esto conduce a un producto con una masa de 30 Daltons (Da) inferior a la del natural. Si se somete a digestión con tripsina, la mutación drepanocítica se localiza en el fragmento T1, que contiene los ocho primeros aminoácidos de la cadena beta. La secuencia de aminoácidos y la masa molecular se muestran en
- 45 la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos del fragmento beta de T1 con masa molecular

Posición	Aminoácido	Formas abreviadas	Código de una letra	Masa molecular (Da)
1	Valina	Val	V	117,1
2	Histidina	His	H	155,2
3	Leucina	Leu	L	131,2
4	Treonina	Thr	T	119,1
5	Prolina	Prol	P	115,1
6	Ácido glutámico	Glu	E	147,1
7	Ácido glutámico	Glu	E	147,1
8	Lisina	Lys	K	146,2

Usando una estrategia de MSMS por electropulverización, un péptido se ioniza para producir una serie de especies ionizadas múltiplemente cargadas. La relación masa/carga teórica del péptido T1 de cadena beta natural individualmente cargado es  $[M+H]^+$  952,5 y del péptido doblemente cargado  $[M+H]^{2+}$  476,8. Ambas especies se observan en un barrido de m/z 100-1500 de un digesto apropiado (Figura 1A). En una muestra de un paciente con drepanocitosis, la sustitución del ácido glutámico en la posición 6 con valina produce péptidos cargados equivalentes  $[M+H]^+$  922,5 y  $[M+H]^{2+}$  461,8 (Figura 1B) y los iones naturales están ausentes. Por tanto, la reducción de masa de 30 Da de la cadena beta natural ha sido aislada al péptido T1. Éste es altamente específico, pero puede introducirse otro nivel de especificidad y reducción de fondo usando disociación inducida por colisión (CID) o fragmentación del péptido T1. En consecuencia, el péptido de interés se aísla en cuadrupolo 1 (EM 1) sometido a disociación inducida por colisión en cuadrupolo 2 y se analiza en cuadrupolo 3 (EM 2).

La fragmentación de péptidos doblemente cargados normalmente produce la producción de dos iones peptídicos complementarios, llamados el ión y y el ión b. El ión y retiene una carga positiva en su extremo C, mientras que el ión b retiene la carga positiva en el extremo N. Por tanto, a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de un péptido es posible calcular la masa de fragmentación de los iones resultantes. Esto se muestra para el péptido T1 normal y drepanocítico en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Tabla de fragmentación de beta de T1 natural

Posición	Secuencia de aminoácidos natural		ión b		ión y	Masa molecular del péptido (Da)
1	V	b1	100,1			99,0684
2	H	b2	237,2	y7	853,4	137,0589
3	L	b3	350,3	y6	716,3	113,0841
4	T	b4	451,3	y5	603,2	101,0477
5	P	b5	548,4	y4	502,2	97,0528
6	E	b6	677,4	y3	405,1	129,0426
7	E	b7	806,4	y2	276,1	129,0426
8	K			y1	147,1	128,0949
<b>Total</b>						<b>933,492</b>

Masa teórica (M) = masa de péptido total + H<sub>2</sub>O = 951,492 Da

$[M+H] = 952,5$  Da

$[M+2H] = 476,8$  Da

Tabla 3: Tabla de fragmentación de beta de T1 drepanocítico

Posición	Secuencia de aminoácidos drepanocítica		ión b		ión y	Masa molecular del péptido (Da)
1	V	b1	100,1			99,0684
2	H	b2	237,2	y7	823,5	137,0589
3	L	b3	350,3	y6	686,4	113,0841
4	T	b4	451,3	y5	573,3	101,0477
5	P	b5	548,4	y4	472,3	97,0528
6	V	b6	647,5	y3	375,2	99,0684
7	E	b7	776,5	y2	276,1	129,0426
8	K			y1	147,1	128,0949
<b>Total</b>						<b>903,5178</b>

Masa teórica (M) = masa de péptido total + H<sub>2</sub>O = 921,518 Da  
[M+H] = 922,5 Da  
[M+2H] = 461,8 Da

5 Los inventores desarrollaron y optimizaron un protocolo para el espectrómetro de masas en uso que selecciona la masa del péptido de [M+2H] para identificar el péptido de interés en el primer cuadrupolo. Éste se fragmenta en la celda de colisión con posterior identificación de los fragmentos ionizados de péptidos en el segundo cuadrupolo. Por este procedimiento, para el ión y la masa seleccionada para un fragmento beta de T1 normal es 476,8 Da con el ión y4 de 502,3 Da como producto diana. La masa seleccionada para el fragmento de T1 drepanocítico es 461,9 Da con el ión y4 de 472,4 Da como producto diana.

10 Los barridos iónicos producto de iones [M+2H]<sup>2+</sup> naturales (Figura 2A) y drepanocíticos (Figura 2B) demuestran la utilidad del enfoque. Obsérvese que los iones [M+2H]<sup>2+</sup> se usaron debido a que se fragmentan a menores energías de colisión 10. El barrido de la proteína drepanocítica es único y esencialmente diagnóstico. Sin embargo, para el cribado de poblaciones de múltiples mutaciones que eligen como diana un péptido de interés se da la oportunidad de usar el instrumento en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) de alta sensibilidad. En el caso de proteína drepanocítica, la diana teóricamente más específica es el ión y3. En la práctica, debido al efecto de la prolina en la posición 5 (Williams y col., Biochem. J., 201, 105-117, 1982), el ión y4 (m/z 472,3) proporciona una señal mucho más sensible. La MRM natural teórica es m/z 476,8/502,2 y para la proteína drepanocítica m/z 461,8/472,3.

20 El procedimiento para la identificación de proteína drepanocítica implica digestión trípica de sangre completa, inyección directa automatizada del digesto, 2 adquisiciones de MRM y un tiempo de inyección a inyección de aproximadamente 1 minuto. La confirmación inequívoca puede hacerse usando una segunda inyección del digesto trípico y barrido iónico producto del péptido de interés para proporcionar información de secuencias.

La solución anterior se ha usado para las hemoglobinopatías de más adelante.

#### Hemoglobina C

25 La hemoglobina C se forma como resultado de una sustitución del aminoácido ácido glutámico natural por lisina en la posición 6 de la cadena beta. Cuando se somete a digestión con tripsina, esto crea un nuevo punto de escisión en la posición 6 y, por tanto, un nuevo péptido con una masa específica. Este péptido tiene la secuencia de aminoácidos VHLTPK [M+H] 694,4, Da. En este caso, la especificidad del nuevo péptido hace innecesaria la fragmentación para el cribado. La mayor estabilidad de péptidos individualmente cargados cuando se compararon con péptidos doblemente cargados significa que, en la energía de colisión requerida para las MRM de drepanocitos y naturales, el péptido C específico para el ión [M+H]<sup>+</sup> se somete a fragmentación mínima. Por tanto, puede aplicarse una "MRM" m/z 694,4/694,4. El mismo enfoque de "pseudo-MEM" se ha usado para las hemoglobinas D<sup>Punjab</sup>, O<sup>Arab</sup> y E.



Hemoglobina D<sup>Punjab</sup>

5 La hemoglobina D<sup>Punjab</sup> se forma como resultado de una sustitución del aminoácido ácido glutámico natural por glutamina en la posición 121 de la cadena beta. Esto conduce a un producto con una masa de 1 inferior al natural. Cuando se somete a digestión con tripsina, ésta se encuentra en el péptido T13 que contiene los aminoácidos 121 a 132. Por tanto, la secuencia de T13 natural de EFTPPVQAAYQK se altera a QFTPPVQAAYQK. Ninguna otra sustitución individual de aminoácidos en este péptido producirá una alteración de masa de menos 1; por tanto, la alteración de masa del fragmento natural de T13 de [M+H] 1378,8 Da a [M+H] 1377,8 es altamente específica para hemoglobina D<sup>Punjab</sup>.

Hemoglobina O<sup>Arab</sup>

10 La hemoglobina O<sup>Arab</sup> se forma como resultado de una sustitución del aminoácido ácido glutámico natural por lisina en la posición 121 de la cadena beta. Cuando se digiere con tripsina, ésta crea un nuevo punto de escisión en la posición 121 con un nuevo péptido. El péptido T13 natural de EFTPPVQAAYQK de [M+H] 1378,8 Da se convierte en FTTPVQAAYQK de [M+H] 1249,7 Da.

Hemoglobina E

15 La hemoglobina E se forma como resultado de una sustitución del aminoácido ácido glutámico natural por lisina en la posición 26 de la cadena beta. Cuando se somete a digestión con tripsina, ésta se encuentra en el péptido T3 que contiene los aminoácidos 18 a 30. La secuencia natural del péptido T3 es VNVDEVGGEALGR [M+H] 1314,7 Da. Si la mutación de hemoglobina E está presente la secuencia es VNVDEVGKALGR, ésta forma dos nuevos péptidos VNVDEVGK [M+H] 916,8 y ALGR [M+H] 416,3. El péptido más pequeño se usa como péptido diana ya que es menos probable que se vea afectado por otras mutaciones múltiples.

20

El protocolo creado para estas 5 hemoglobinas usa las siguientes masas para identificar su presencia o ausencia, además de la del péptido natural correspondiente.

**Tabla 4: Protocolo de masas de péptidos e iones diana**

	<b>Péptido diana</b>	<b>Ión diana</b>
T1 natural	476,8 Da	y4 502,3 Da
Hemoglobina S	461,9 Da	y4 472,4 Da
Hemoglobina C	694,4 Da	
T13 natural	1378,8 Da	
Hemoglobina D <sup>Punjab</sup>	1377,8 Da	
Hemoglobina O <sup>Arab</sup>	1249,7 Da	
T3 natural	1314,7 Da	
Hemoglobina E	916,8 Da	

25 **Materiales y procedimientos**

Grupo de pacientes

30 Se seleccionaron 200 muestras de sangre completamente anonimizadas en EDTA consentidas para diagnóstico de hemoglobinopatía para proporcionar números significativos para cada una de las variantes que iban a probarse y analizarse en paralelo con procedimientos existentes. Éstas comprendieron 52 hemoglobina AA, 44 hemoglobina AC (rasgo de C), 57 AS (rasgo de drepanocito), 16 hemoglobina SC (enfermedad de SC), 14 hemoglobina SS (drepanocitosis), 10 hemoglobina AE (rasgo de E), 2 hemoglobina AD<sup>Punjab</sup> (rasgo de D<sup>Punjab</sup>) y 1 muestra cada una de hemoglobina CC (enfermedad de C), D<sup>Punjab</sup>D<sup>Punjab</sup> (enfermedad de D<sup>Punjab</sup>), EE (enfermedad de E), AO<sup>Arab</sup> (rasgo de O<sup>Arab</sup>) y O<sup>Arab</sup>O<sup>Arab</sup> (enfermedad de O<sup>Arab</sup>).

Materiales

35 Bicarbonato de amonio (A6141), tripsina tratada con TCPK (T1426) y ácido fórmico obtenidos de Sigma Aldrich, RU. El acetonitrilo se obtuvo de Rathburn Chemicals Ltd.

Procedimientos existentes

- 5 Como norma mínima se tomó The Guideline Laboratory Diagnosis of Haemoglobinopathies (Working Party of General Haematology Task Force, 1998). El cribado inicial de hemoglobinopatías se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un Variant™ II operando con el kit HbA<sub>2</sub>/HbA<sub>1c</sub> Dual Program (Bio-Rad, RU; Hemel Hempstead, RU). Las pruebas de confirmación para la identificación provisional de hemoglobina se hicieron usando procedimientos establecidos que incluían prueba de solubilidad drepanocítica, geles ácidos y alcalinos (Wild, B.J., Bain, B.J., Churchill Livingstone, 9ª ed. 231-268, 2001), reacción en cadena de la polimerasa (Fodor, F.H., Eng, C.M., Prenat. Diagn., 19, 58-60, 1999) y secuenciación del gen beta.

Digesto trípico

- 10 Siguiendo el procedimiento descrito por Wild y col., 2001 (citado anteriormente), una muestra de sangre completa (10 ul) se diluyó en agua destilada (490 ul) para crear una disolución de trabajo. Se añadieron acetonitrilo (10 ul) y ácido fórmico al 1% (10 ul) a 100 ul de la disolución de trabajo con el fin de desnaturalizar la hemoglobina. Después de reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente se añadió bicarbonato de amonio 1 M (6 ul) y tripsina tratada con TPCK (5 ul). Una vez se había depurado la disolución, se centrifugó y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
- 15 digestión, 40 ul de la disolución se diluyeron en 360 ul de acetonitrilo:agua 1:1 con ácido fórmico al 0,2% para crear una disolución de trabajo. La disolución de trabajo se transfiere a una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos (Semat International Ltd, St Albans, RU) y se carga sobre un inyector automático refrigerado CTC Analytics HTS PAL (Presearch Ltd, Hitchin, RU) para análisis por MSEM.

Espectrometría de masas

- 20 Las variantes de hemoglobina se analizan simultáneamente como tres protocolos separados eligiendo cada uno como diana un péptido ionizado diferente.

- 25 Se introdujeron automáticamente muestras (2 µl) en una corriente continua de disolvente de acetonitrilo:agua (1:1) que contenía ácido fórmico al 0,025% fluyendo a 75 µl/min (Agilent 1100 series) en un MSEM de triple cuadrupolo SCIEX API 4000 (Applied Biosystems, Warrington, RU) con una de fuente electropulverización en modo de ión positivo a 5500V y 2500C. El calentador de la interfaz estaba encendido, potencial de desolvatación 81,0 V y potencia de entrada 10 V. El parámetro del gas de colisión (6.0), la energía de colisión (30 V) y el potencial de salida (15,0 V) fueron constantes durante 3 experimentos de MSEM. El primer experimento eligió como diana T1 de globina beta natural y las variantes de T1, S y C, el segundo T13 natural y las variantes de T13, D<sup>Punjab</sup> y O<sup>Arab</sup>, y el tercero T3 natural y la variante de T3, E. Las MRM reales y "" se muestran en la Tabla 4; tiempo de muestreo 150 ms para cada transición. El tiempo total de adquisición fue 60 s.
- 30

**Resultados**

Se analizaron 200 muestras de sangre como se ha descrito. Los números de muestras y los patrones de resultados predichos para cada uno de los fenotipos de hemoglobina se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Números y patrones de resultados predichos para los fenotipos de hemoglobina probados

Fenotipo Hb	Nº de muestras	T1 natural (502,3 Da)	Hb S (472,4 Da)	Hb C (694,4 Da)	T13 natural (1378,8 Da)	Hb D <sup>Punjab</sup> (1377,8 Da)	Hb O <sup>Arab</sup> (1249,7 Da)	T3 natural (1314,7 Da)	Hb E (916,8 Da)
AA	52	Presente			Presente			Presente	
AS	57	Presente	Presente		Presente			Presente	
AC	44	Presente		Presente	Presente			Presente	
SS	14		Presente		Presente			Presente	
SC	16		Presente	Presente	Presente			Presente	
AE	10	Presente			Presente			Presente	Presente
AD <sup>Punjab</sup>	2	Presente			Presente	Presente		Presente	
AO <sup>Arab</sup>	1	Presente			Presente		Presente	Presente	
CC	1			Presente	Presente			Presente	
D <sup>Punjab</sup> D <sup>Punjab</sup>	1	Presente				Presente		Presente	
O <sup>Arab</sup> O <sup>Arab</sup>	1	Presente					Presente	Presente	
EE	1	Presente			Presente				Presente

De la Tabla 5 puede verse que el fenotipo A de hemoglobina normal mostraría la presencia de los tres péptidos naturales T1, T13, T3 a sus masas características, mientras que el fenotipo de rasgo de drepanocito (AS), además de tener péptidos a estas masas, también tiene un ión a 472,4 Da. Similarmente, el rasgo de hemoglobina de fenotipo C (AC) muestra un péptido a 694,4 Da, además de las tres masas naturales. Los inventores han mostrado que este tipo de patrón es cierto para los restantes fenotipos de rasgos probados. En estados de enfermedad o estados heterocigotos compuestos, el péptido natural correspondiente está ausente con péptidos ionizados detectados a la masa característica de la variante.

Pueden presentarse cuatro paneles de los datos al operario para cada muestra: el cromatograma de iones total y luego los péptidos T1, T13 y T3. Por sencillez y para demostrar los datos eficazmente, los datos de MRM de T1 para muestras de sujetos con hemoglobinas AA, AS y SS se muestran en la Figura 3. Obsérvese la ausencia virtual de señal de S en AA que produce una relación de señal con respecto a ruido muy alta, y de ahí la sensibilidad para S. Datos equivalentes para C, D<sup>Punjab</sup>, O<sup>Arab</sup> y E se presentan en las Figuras 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Incluso usando "pseudo-MRM", las señales de fondo son relativamente pequeñas y una simple inspección visual puede identificar el estado heterocigoto y homocigoto para todas las mutaciones elegidas como diana. Hay una señal natural aparentemente alta para el péptido T13 incluso en pacientes homocigotos para D<sup>Punjab</sup> debido al desplazamiento de 1 Da. Sin embargo, debido a las relaciones relativas de las señales de m/z 1377,8/1378,8, la detección de D<sup>Punjab</sup> heterocigoto y homocigoto no está afectada.

Los inventores seleccionaron especímenes para proporcionar una cohorte de aquellas variantes de hemoglobina elegidas como diana en el protocolo de prueba y han confirmado que todas las variantes de hemoglobina como se identifican por técnicas convencionales tenían el péptido variante correspondiente detectado por espectrometría de masas. Además, como se ha predicho, el péptido natural estaba ausente en estados de enfermedad y estados heterocigotos compuestos. La excepción a esto era aquellos pacientes que se habían sometido a transfusión en los que, como cabría esperar, el péptido natural estaba presente junto con el de la variante. Por tanto, usando el enfoque descrito para las 200 muestras analizadas hubo el 100% de correlación entre resultados de procedimientos existentes y los patrones de resultados predichos para identificación por espectrometría de masas de las variantes. En particular, la detección de hemoglobinas S, C, D<sup>Punjab</sup>, O<sup>Arab</sup> y E de heterocigoto u homocigoto era el 100% específica y el 100% sensible en las doscientas muestras analizadas.

## Discusión

La implementación de programas de cribado nacionales para hemoglobinopatías ha puesto de relieve la necesidad de identificar hemoglobinas clínicamente significativas en un modo oportuno y preciso. Un programa de cribado verdadero tiene como objetivo *"identificar aquellos individuos dentro de una población que tienen un trastorno específico para el que la intervención tal como tratamiento médico, educación o consejo puede mejorar el curso natural de la enfermedad"* (Henthorn y col., Br. J. Haematol. 124, 259-263, 2004). Los procedimientos actuales no pueden considerarse verdaderamente técnicas de cribado ya que detectan un gran número de variantes de hemoglobina muchas de las cuales no son clínicamente significativas. La identificación específica de estas variantes realizada actualmente por muchos laboratorios es un uso ineficaz de recursos limitados. Además, los procedimientos existentes tienen un rendimiento relativamente bajo, por ejemplo, aproximadamente 6 minutos por muestra usando algunos sistemas de HPLC.

Las hemoglobinas se identifican provisionalmente por tales sistemas y luego requieren la confirmación por otras técnicas antes de la validación final de los resultados (Wild, B.J., Bain, B.J. 2004 (citado anteriormente)). Las técnicas existentes de identificación por MSEM de variantes de hemoglobina se diseñan para identificar definitivamente variantes de hemoglobina desconocidas (Wild y col., 2001 (citado anteriormente)) y son eficaces, pero requieren mucho tiempo. El cribado que elige diana para aquellas hemoglobinas consideradas clínicamente significativas dentro del programa se basará en el uso de tiempo y recursos. Un sistema que pueda procesar altos números de muestras y variantes de hemoglobina requeridas rápidamente acortará los plazos de entrega y así reducirá el retraso del tiempo entre la recogida de especímenes y el consejo al paciente, un factor importante en programas de reconocimiento prenatal.

Los inventores han desarrollado una estrategia novedosa usando digestión triptica conjuntamente con MSEM como procedimiento de cribado para variantes clínicamente significativas de hemoglobina. En la creación de esta estrategia, los inventores decidieron basarse en las hemoglobinas S, C, E, D<sup>Punjab</sup> y O<sup>Arab</sup> ya que éstas representan una gran proporción de las hemoglobinopatías clínicamente significativas y las muestras estuvieron fácilmente disponibles dentro del laboratorio. La intención de los inventores era desarrollar un programa de cribado verdadero. El análisis de la cadena beta intacta no es informativo para las hemoglobinas C, E, D<sup>Punjab</sup> y O<sup>Arab</sup> que tienen un desplazamiento de masa de sólo 1 Da de las naturales. La hemoglobina S tiene un desplazamiento de masa de 30 Da y, aunque ésta se detectaría cuando se analizaran cadenas beta intactas, no puede considerarse como específica. Con el fin de mejorar esta especificidad y de manera que las otras hemoglobinas puedan detectarse es necesario romper la cadena beta en péptidos más pequeños. Esto se añade al procedimiento de laboratorio, pero puede automatizarse. Usando tripsina la cadena beta se rompe en 15 péptidos; T1, T3 y T13 se eligieron como que contenían las mutaciones de interés. Como se describe en la sección de procedimientos, la muestra digerida se analizó usando MSEM por electropulverización para determinar cuál de los péptidos ionizados múltiplemente cargados era el más adecuado para la selección como diana de péptido ionizado. La elección del péptido ionizado

- diana requiere la consideración de cualquier otra posible sustitución de aminoácidos que pudiera afectar la especificidad. En particular, un problema posible se produce en el péptido T1 cuando una sustitución de ácido glutámico natural por valina en la posición 6 produce hemoglobina S con un desplazamiento de masa de -30 Da. Dos otras posibles sustituciones de aminoácidos en este péptido T1 dan el mismo desplazamiento de masa; en primer lugar, la treonina natural por alanina en la posición 4 y en segundo lugar el ácido glutámico natural por valina en la posición 7. Ninguna de estas sustituciones se ha informado actualmente, aunque sí otras dos en el ácido glutámico de la posición 7. Aquí, una sustitución por glicina produce un desplazamiento de masa de -72 Da (hemoglobina G-San Jose), mientras que una sustitución por lisina produce un desplazamiento de masa de -1 Da (hemoglobina G-Siriraj). Ninguna de estas hemoglobinas es clínicamente significativa y no se detectaría por los protocolos descritos.
- En el establecimiento del protocolo para hemoglobina S fue necesario seleccionar las transiciones para dar el compromiso de señal/especificidad óptimo. El péptido ionizado [M+2H] proporciona la mejor señal y por este motivo se seleccionó de los iones de péptidos múltiplemente cargados en EM 1. Para seleccionar las especies ionizadas derivadas adecuadas para el análisis en EM 2 debe hacerse una elección entre tanto el ión b como el ión y. Desafortunadamente, del extremo b, la mutación de treonina en la posición 4 de la cadena beta por alanina es posible y del extremo y es posible la mutación de ácido glutámico en la posición 7 de la cadena beta por valina. Si se produjera alguna de estas mutaciones, podrían generar un positivo falso con este protocolo. Esto significa que ni con el ión b ni con el ión y puede hacerse una selección para excluir una mutación que pueda afectar la especificidad. Por tanto, las especies ionizadas derivadas de elección podrían ser tanto el fragmento b6 como el fragmento y3 debido a que éstos se corresponden con la posición de la mutación. En la práctica, ni el fragmento y3 se detectó ni el b6 fragmento se eligió debido a que la señal era débil. En última instancia se eligió el fragmento y4 debido a que dio un claro ión individual de buena abundancia y siendo un péptido pequeño hay una capacidad limitada para múltiples mutaciones. Esto puede producir especificidad reducida generando un desplazamiento de masa combinado de - 30 Da, aunque el análisis de esta secuencia de péptidos indica que ninguna mutación doble produciría un desplazamiento de masa tal.
- Los requisitos establecidos del programa de reconocimiento neonatal de hemoglobinopatías del Servicio nacional de salud del Reino Unido implican que, como mínimo, en la fase de cribado inicial sería suficiente la detección de hemoglobina S y/o la demostración de una deficiencia de globina beta natural<sup>4</sup>. Puede determinarse el estado heterocigoto u homocigoto y caracterizarse otras mutaciones drepanocíticas en la fase de prueba confirmatoria. El problema desconcertante en el reconocimiento neonatal es la expresión muy baja de globina beta en neonatos, particularmente aquellos que son prematuros. Por tanto, es esencial tener un procedimiento de cribado muy sensible para detectar hemoglobina S. Usando la transición de MRM específica para hemoglobina S, la señal de ruido no específica encontrada en un sujeto con hemoglobina AA (Figura 3) indica que serán detectables incluso niveles de hemoglobina S que representen significativamente menos del 1% de hemoglobina total. Aunque no es estrictamente esencial, el enfoque actual también permite la detección y la confirmación de las otras mutaciones drepanocíticas en el digesto triptico original.
- La restantes variantes de hemoglobina generan péptidos que son específicos en presencia de una única mutación en ese péptido. Éstas se analizan usando protocolos que los inventores han llamado pseudo-MSMS. En éstas, el péptido ionizado se selecciona en EM 1 y luego se vuelve a seleccionar en EM 2 después de pasar por la cámara de colisión con gas en circulación. Esto puede producir fragmentación de cualquier péptido isobárico que pueda haber pasado por EM 1 asegurando que EM 2 no los seleccionará. El análisis sin gas da señal de ruido significativamente aumentada, además de dar señal reducida en algunos de los fragmentos diana.
- Ya se ha tratado el potencial de este procedimiento para el cribado de hemoglobinopatía neonatal, pero este enfoque puede demostrar ser incluso más valioso en programas de reconocimiento prenatal. La principal diferencia entre reconocimiento neonatal y prenatal es que en el último es esencial que se detecten los heterocigotos para mutaciones drepanocíticas combinadas. En este momento, los inventores no han descrito un sistema exhaustivo para reconocimiento prenatal, pero han demostrado cómo de satisfactorio es el enfoque en la detección de heterocigotos para la mayoría de las mutaciones drepanocíticas combinadas. El procedimiento no se limita a la cadena beta y podría extenderse para incluir cualquier otra mutación de interés clínico y proporcionar un enfoque exhaustivo para la caracterización clínica de hemoglobinopatía y el diagnóstico. Además, si el cuadro clínico sugiere una hemoglobinopatía, pero las mutaciones diana son todas normales, la MSEM todavía está disponible para hacer un análisis de secuencias clásico.

## Conclusión

- Los inventores han desarrollado un protocolo adecuado para análisis de alto rendimiento que criba rápidamente y específicamente variantes diana de hemoglobina. Esta investigación inicial en paralelo con procedimientos existentes muestra el 100% de concordancia con las 200 muestras seleccionadas.

### Detección de talasemia delta-beta

El procedimiento de la presente invención también se ha usado para detectar talasemia delta-beta (también denominada en lo sucesivo talasemia beta).

Hace cincuenta años desde que la hemoglobina (Hb) A<sub>2</sub> se describió por primera vez usando electroforesis en gel de almidón como la segunda hemoglobina normal que se identificaba en la sangre de adultos normales. Se encontró que la hemoglobina Hb A<sub>2</sub> estaba normalmente presente a aproximadamente el 3 por ciento; sin embargo, estudios de la concentración en diferentes edades y estados de enfermedad revelaron que la Hb A<sub>2</sub> estaba ausente o enormemente reducida en neonatos y característicamente elevada en rasgo de talasemia. Posteriormente se postuló que sería más probable que la elevación de Hb A<sub>2</sub> fuera una característica en talasemia beta ya que la disminución de la síntesis de cadenas beta produciría un aumento relativo en la proporción de Hb. El aumento de niveles de Hb A<sub>2</sub> se ha considerado ahora como un rasgo de diagnóstico característico de rasgo de talasemia beta y se usa para diferenciar de rasgo de talasemia alfa. El diagnóstico de rasgo de talasemia beta es de importancia clave en el consejo genético ya que cuando se hereda como una afección homocigótica o conjuntamente con otras hemoglobinopatías produce una afección clínicamente grave.

Los procedimientos para cuantificar Hb A<sub>2</sub> requieren la separación de Hb A<sub>2</sub> de cualquier otra hemoglobina presente y la determinación de la proporción presente. Pueden emplearse tres técnicas: electroforesis de hemoglobina y posterior elución de las bandas de hemoglobina; cromatografía en microcolumna; o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) automatizada. Los procedimientos de elución y de cromatografía en columna requieren mucho tiempo y son laboriosos, conduciendo a políticas de cribado selectivo basadas en índices de glóbulos rojos anormales. Sin embargo, la introducción de sistemas de HPLC automatizada en los años 90 ha facilitado el cribado generalizado de niveles de Hb A<sub>2</sub>. Este enfoque es aplicable al cribado de rasgo de talasemia beta en programas de cribado de poblaciones. Los beneficios del cribado por HPLC incluyen identificación y cuantificación simultánea de Hb A<sub>2</sub> y otras hemoglobinas normales y anormales, además de la identificación de pacientes que pueden haberse perdido por políticas de cribado previas. Esto incluye aquellos con rasgo de talasemia beta, pero índices de glóbulos rojos normales y aquellos con variantes de cadena delta. Sin embargo, los sistemas de HPLC pueden dar resultados erróneos para Hb A<sub>2</sub> en presencia de algunas variantes de hemoglobina (Wild y col., Ann. Clin. Biochem., 41, 355-369, 2004).

Mientras que niveles de Hb A<sub>2</sub> elevados (intervalo 4 - 7%) en presencia de índices de glóbulos rojos microcíticos hipocrómicos son casi invariables debidos al rasgo de talasemia beta, también se ha informado de niveles de Hb A<sub>2</sub> elevados en otras situaciones que incluyen pacientes normales, hemoglobinas inestables, hipertiroidismo, anemia megaloblástica y pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en terapia antirretrovírica. Otros problemas asociados a Hb A<sub>2</sub> incluyen valores normales y ambiguos del límite en el intervalo del 3,5 - 3,9%. De nuevo, tales valores pueden encontrarse en pacientes normales, pero también pueden producirse por mutaciones de talasemia beta leves tales como el sitio de A→C de -101 C→ y +1 CAP o factores medioambientales que puedan reducir el nivel de Hb A<sub>2</sub> tal como deficiencia de hierro y rasgo de talasemia alfa coheredada. Debido al hecho de que los niveles no alcancen valores adultos hasta al menos 6 meses de edad, Hb A<sub>2</sub> no es un marcador útil para rasgo de talasemia beta en neonatos. Sin embargo, a pesar de estos puntos, conjuntamente con índices de glóbulos rojos, la Hb A<sub>2</sub> sigue siendo el marcado estándar para el cribado de talasemia beta en adultos.

La hemoglobina Lepore se informó por primera vez en 1957 debido a su interacción con rasgo de talasemia beta para producir un cuadro clínico similar al de talasemia mayor. El rasgo de Hb Lepore se caracteriza por la reducción de los índices de glóbulos rojos en rasgo de talasemia y la presencia de Hb Lepore al 10 al 15 por ciento de la hemoglobina total. La Hb Lepore se produce como resultado de la fusión de los genes delta y beta. Se han descrito tres variantes de Lepore con la misma movilidad electroforética; sin embargo, el punto al que se produce la fusión de los genes delta y beta es diferente en cada caso. La detección de Hb Lepore es esencial en programas de cribado de poblaciones debido a la interacción con rasgo de talasemia beta para producir una afección clínicamente significativa.

En el reconocimiento prenatal también es importante detectar rasgo de talasemia beta. Como se ha descrito, esto se ha logrado tradicionalmente usando Hb A<sub>2</sub> que tiene dos cadenas de globina beta y dos delta. En este procedimiento, los inventores han investigado la detección de la cadena delta por MSEM para determinar la utilidad como marcador sustituto. Este enfoque también permite la detección de fusiones delta-beta (variantes de Hb Lepore) y fusiones gamma-beta. Usando un enfoque idéntico al descrito anteriormente los inventores informan de transiciones adicionales dentro del ciclo de tiempo de un minuto usando cadenas delta como Hb A<sub>2</sub> sustituta con el objetivo de detectar el rasgo de talasemia beta y Hb Lepore.

## 50 **Materiales y procedimientos**

### *Estrategia de MSEM*

Hay una fuerte homología de secuencias entre las cadenas beta y delta de hemoglobina. El digesto trípico de la cadena beta produce una serie de 15 péptidos bien definidos, similarmente la cadena delta produce una serie de 16 péptidos (T1-16) con diferencias de beta en T2, T3, T5, T10, T12, T13 y T14. La primera diferencia de secuencias se produce en el péptido T2 que comprende los aminoácidos 9 a 17 en tanto las cadenas beta como delta con secuencias respectivas de SAVTALWGK, masa promedio 932,1 daltons (Da) y TAVNALWGK, masa promedio 959,1 Da. En el modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM) como se ha descrito anteriormente, los iones [M+2H]<sup>2+</sup> de T2 respectivos, relación de masa con respecto a carga (m/z) beta 466,8 y delta, 480,3, se seleccionaron, se fragmentaron y los fragmentos de péptidos más informativos VTALWGK, 675,4 Da y VNALWGK, 688,4 Da, se eligieron como diana. Se calculó la relación de área en porcentaje de delta/(beta+delta) y comparó con el valor

clásico de Hb A<sub>2</sub> en porcentaje obtenido por HPLC. Se analizaron 66 muestras con valores de Hb A<sub>2</sub> dentro del intervalo normal de los inventores (media 2,65%, intervalo 1,8-3,4) y 58 con valores de Hb A<sub>2</sub> indicativos de rasgo de talasemia beta (5,24%, 4,2-7,9) por MSEM y las relaciones de delta/(beta+delta) correspondientes fueron 1,7%, 0,9-2,3 y 3,4%, 2,5-6,0. En otras 2 muestras heterocigóticas combinadas de talasemia beta-cero de HbS, confirmadas por la secuenciación del gen beta, las relaciones fueron el 4,1% y el 3,7%. Esta serie relativamente pequeña proporciona pruebas de que la talasemia beta puede diagnosticarse por MSMS.

Otra ventaja de este enfoque es que cualquier variante de Lepore tendrá una señal de T2 alta. Desafortunadamente, la variante de la cadena delta más común Hb A<sub>2</sub>' (Hb B<sub>2</sub>) se produce en la posición 16 de la cadena delta de globina y, por tanto, se encuentra dentro de este péptido.

Con el fin de no perder el rasgo de talasemia beta con una variante de cadena delta concomitante, el siguiente péptido informativo (es decir, la secuencia beta de T3 VNVDEVGGEALGR, masa promedio 1314,4 Da, y la secuencia delta VNVDAVGGEALGR, masa promedio 1256,4 Da) se incluyó para la evaluación. En MRM, los iones [M+2H]<sup>2+</sup> de T3 respectivos, m/z beta, 657,9 Da y delta, 628,9 Da, se seleccionaron, se fragmentaron y se detectaron los iones individualmente cargados de dos series dentro del péptido T3. Las series son del siguiente modo: transición 1, beta, EVGGEALGR, m/z 887,5 Da, delta, AVGGEALGR, m/z 829,5 Da, transición 2, beta VGGEALGR, m/z 758,4 Da, delta, VGGEALGR, m/z 758,4 Da.

Aunque es raro, el posible problema de variantes de cadena delta que se produce en cualquier punto en la secuencia de la cadena delta implicó que un tercer péptido podría resultar ser valioso en la interpretación de datos. Inicialmente, el péptido delta T13 se eligió como diana. Este péptido comprende los aminoácidos 117 a 120 de la cadena delta, secuencia NFGK, masa promedio 464,5 Da. El pequeño número de aminoácidos se consideró ventajoso ya que limita la posibilidad de mutaciones; sin embargo, la señal detectada de este péptido era demasiado baja para el análisis. La secuencia beta de T13 complementaria comprende los aminoácidos 121 a 132, secuencia EFTPPVQAAYQK, masa promedio 1378,5 Da. Por tanto, el péptido delta T14 también es complementario a esta secuencia y se seleccionó para análisis, secuencia EFTPQMQAAYQK, masa promedio 1441,6 Da. Este péptido tiene la ventaja de estar en el extremo N y es el último péptido con diferencias entre las secuencias delta y beta. Por tanto, la selección de este péptido conjuntamente con el péptido T2 cubre ambos extremos de la cadena delta. En MRM, los iones [M+2H]<sup>2+</sup>, para beta de T13, m/z 689,9 Da y T14 delta, 501,3 Da, se seleccionan, se fragmentan y los iones doblemente cargados de los fragmentos de péptidos informativos respectivos PPVQAAYQK, 501,3 Da y PQMQAAYQK, 532,9 Da, se detectan y se miden.

### 30 *Manchas de sangre*

Se analizaron un total de 26 muestras de manchas de sangre. Éstas comprendieron 13 con una Hb A<sub>2</sub> normal, 11 con una Hb A<sub>2</sub> elevada (rasgo de talasemia beta) y dos variantes de cadena delta.

#### *Materiales para la digestión con tripsina y análisis por MSEM*

35 Bicarbonato de amonio (A6141), tripsina tratada con TCPK (T1426) y ácido fórmico al 88% (39,938-8) (Sigma Aldrich Co Ltd, Dorset, RU). Acetonitrilo de calidad para HPLC (RH1015) (Rathburn Chemicals Ltd, Escocia).

Procedimientos convencionales para la cuantificación de hemoglobina A<sub>2</sub> e identificación de Hb Lepore

#### *Sangre completa*

40 The Guideline Laboratory Diagnosis of Haemoglobinopathies se tomó como norma mínima. El cribado de hemoglobinopatías y la cuantificación de hemoglobina A<sub>2</sub> se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando Variant™ II operando con un kit HbA<sub>2</sub>/HbA<sub>1c</sub> Dual Program (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, RU). Las variantes de hemoglobina Lepore se detectaron inicialmente por HPLC y se confirmaron por espectrometría de masas (Wild y col., 2001 (citado anteriormente)).

#### *Manchas de sangre*

45 Los especímenes de EDTA en sangre completa se analizaron por HPLC y espectrometría de masas. Para cada muestra luego se prepararon siete manchas de sangre pipeteando 35 µl de sangre por mancha sobre papel de filtro Schleicher and Schuell 903. Las manchas de sangre se dejaron secar durante la noche y se perforaron y se analizaron tanto por HPLC como por espectrometría de masas en el día uno, el día ocho y el día 29. Para HPLC, dos manchas perforadas se eluyeron durante 90 minutos en 1 ml de tampón de lavado Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, RU) dando el equivalente de la dilución 1:201 requerido para el análisis estándar.

### 50 *Controles y patrones*

Como patrón se usó el reactivo de referencia internacional de la OMS para hemoglobina A<sub>2</sub> obtenido del Instituto nacional de patrones y controles biológicos. Se obtuvo una serie de controles de Canterbury Scientific, Nueva Zelanda; estos comprendía una Hb A<sub>2</sub>/Hb F normal y alta, Hb A<sub>2</sub> normal y alta y una Hb FASC. Todos los controles se prepararon, se reconstituyeron y se almacenaron según las instrucciones del fabricante. Una vez reconstituidos,

los controles se trataron como muestras de sangre completas.

Preparación de muestras para MSMS

*Sangre completa*

Siguiendo el procedimiento descrito por Wild y col., 2001 (citado anteriormente), y como se ha descrito anteriormente.

#### 5 *Manchas de sangre*

Se creó una disolución de trabajo perforando un mancha de 3 mm en 200 µl de agua desionizada y eluyendo durante 30 minutos en una mezcladora automática, luego se procesaron 100 µl de esta disolución como se ha descrito.

Espectrometría de masas

La MSEM se realizó como se ha descrito anteriormente. El tiempo de adquisición total se quedó en 60 s.

#### 10 **Resultados**

Usando MSEM, todas las sangres con valores de A2 elevados se distinguieron claramente de aquellas con valores de A2 normales. Esto no cambió durante el almacenamiento como manchas de sangre seca durante 1 día, 8 días o 21 días. Todavía no se han revisado los datos de HPLC.

#### **Discusión**

15 Antes de la introducción de procedimientos basados en HPLC, las técnicas de los 90 para cuantificar Hb A<sub>2</sub> eran laboriosas y requerían tiempo. La HPLC ha permitido que se llevara a cabo rutinariamente el cribado de alta resolución para variantes de hemoglobina y talasemia beta y condujeran a un rápido aumento en programas de cribado de poblaciones. Sin embargo, debido a diferencias en los materiales de muestra y a los programas de operación usados, la mancha de sangre neonatal y el cribado de sangre completa de adulto se llevan a cabo en diferentes plataformas. Los procedimientos de cribado aprobados para neonatos incluyen HPLC e isoelectroenfoque (IEF), mientras que la HPLC es el único procedimiento aprobado para adultos (Departamento de Salud, RU, 2000; NHS Sickle Cell and Thalassaemia Screening Programme, 2005). La plataforma de HPLC para la mancha de sangre del neonato requiere instrumentación especializada y metodología diferente a la que se usa para el cribado de adultos. El IEF no es adecuado como procedimiento de cribado para el rasgo de talasemia beta ya que no permite la medición de Hb A<sub>2</sub>.

La técnica que han descrito los inventores detecta y cuantifica específicamente la cadena delta en vez de Hb A<sub>2</sub> (una combinación de dos cadenas alfa y dos delta). Una ventaja de la elección como diana de la cadena delta es que es posible detectar y cuantificar incluso en presencia de factores que pueden evitar o interferir con la cuantificación de Hb A<sub>2</sub> usando procedimientos tradicionales. Por ejemplo, variantes que se coeluyen con Hb A<sub>2</sub> o la presencia de Hb S, que en algunos sistemas de HPLC dan lugar a valores de Hb A<sub>2</sub> falsamente elevados.

Si una mutación de cadena delta que conduce a la formación de una variante de cadena delta está presente, el efecto sobre la Hb A<sub>2</sub> es reducir el valor a aproximadamente la mitad. Es importante obtener una Hb A<sub>2</sub> total añadiendo juntas la cantidad de la Hb A<sub>2</sub> variante y la normal con el fin de garantizar que no se pierda un diagnóstico de rasgo de talasemia beta. La selección de dos transiciones de péptidos delta garantiza que los heterocigotos y los homocigotos de cadena delta no se perderían por esta técnica. Es posible que una persona herede dos mutaciones de cadena delta diferentes y, aunque esto sería indudablemente una causa rara, en este estudio los inventores han elegido analizar tres transiciones para medir la señal de cadena delta. Este enfoque garantiza que incluso en el poco probable acontecimiento de una mutación de cadena delta heterocigótica compuesta, una de las transiciones todavía daría el valor correcto. Mientras que para fines de cribado rutinario esto pueda considerarse que es excesivo, hay que tener en cuenta que aumentar el número de adquisiciones no aumenta el tiempo de análisis, pero permite adicionalmente especificidad y sensibilidad.

La mutación de cadena delta más común se produce en el péptido T2 de la cadena delta y, mientras que no haya un argumento en contra del uso de este péptido, es esencial si la detección de variantes de hemoglobina Lepore es un requisito. Las tres variantes de Lepore son todo el resultado de una fusión delta-beta y posee secuencias delta del siguiente modo: secuencia delta de Hb Lepore-Hollandia hasta el aminoácido 22; Hb Lepore Baltimore delta hasta el aminoácido 50; y Hb Lepore Boston Washington delta hasta el aminoácido 87. Teóricamente habría un aumento de los péptidos delta antes del punto de fusión que podría detectarse y cuantificarse por la MSEM siempre que como diana se eligiera el fragmento del péptido apropiado. Con el fin de detectar todas las variantes de Hb Lepore, un péptido con diferencias de la secuencia beta antes del péptido 22 debe seleccionarse y T2 es el único péptido que satisface este requisito. Por tanto, el péptido T2 seleccionado para la cuantificación de la cadena delta también se usó para detectar las variantes de Hb Lepore.



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una variante de proteína conocida en una muestra que comprende:
  - (i) digerir la proteína para producir una serie definida de péptidos;
  - (ii) ionizar los péptidos y seleccionar por espectrometría de masas una especie ionizada de relación masa/carga conocida indicativa de la variante de proteína; **caracterizado por**
  - (iii) someter la especie ionizada seleccionada a disociación inducida por colisión y medir una o más de las especies ionizadas derivadas de relación masa/carga conocida que confirman la presencia de la variante de proteína en la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la variante de proteína es una variante de hemoglobina.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la variante de hemoglobina es S, C, E, D<sup>Punjab</sup> o O<sup>Arab</sup>.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la variante de proteína es la cadena delta de hemoglobina.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se seleccionan 1 a 20 especies ionizadas de relación masa/carga conocida.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que se seleccionan 1 a 5 especies ionizadas de relación masa/carga conocida.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que se selecciona una única especie ionizada que tiene una relación masa/carga conocida.
8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra es sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o una muestra de tejido.
9. El procedimiento de la presente invención, en el que la proteína se digiere usando una proteasa específica de secuencia.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la proteasa es tripsina.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usa espectrometría de masas de cuadrupolo de ionización por electropulverización para ionizar los péptidos y para seleccionar las especies ionizadas.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se usa espectrometría de masas de cuadrupolo de ionización por electropulverización para someter las especies ionizadas seleccionadas a disociación inducida por colisión y para medir la una o más especies ionizadas derivadas.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la especie ionizada seleccionada se somete a un nivel de disociación que o bien no produce disociación sustancial de las especies ionizadas seleccionadas o conduce a la producción de una pluralidad de fragmentos ionizados de péptidos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el procedimiento comprende adicionalmente someter las especies ionizadas seleccionadas a un nivel de disociación que conduce a la eliminación de aminoácidos de ambos extremos de las especies ionizadas, y detectar los aminoácidos.

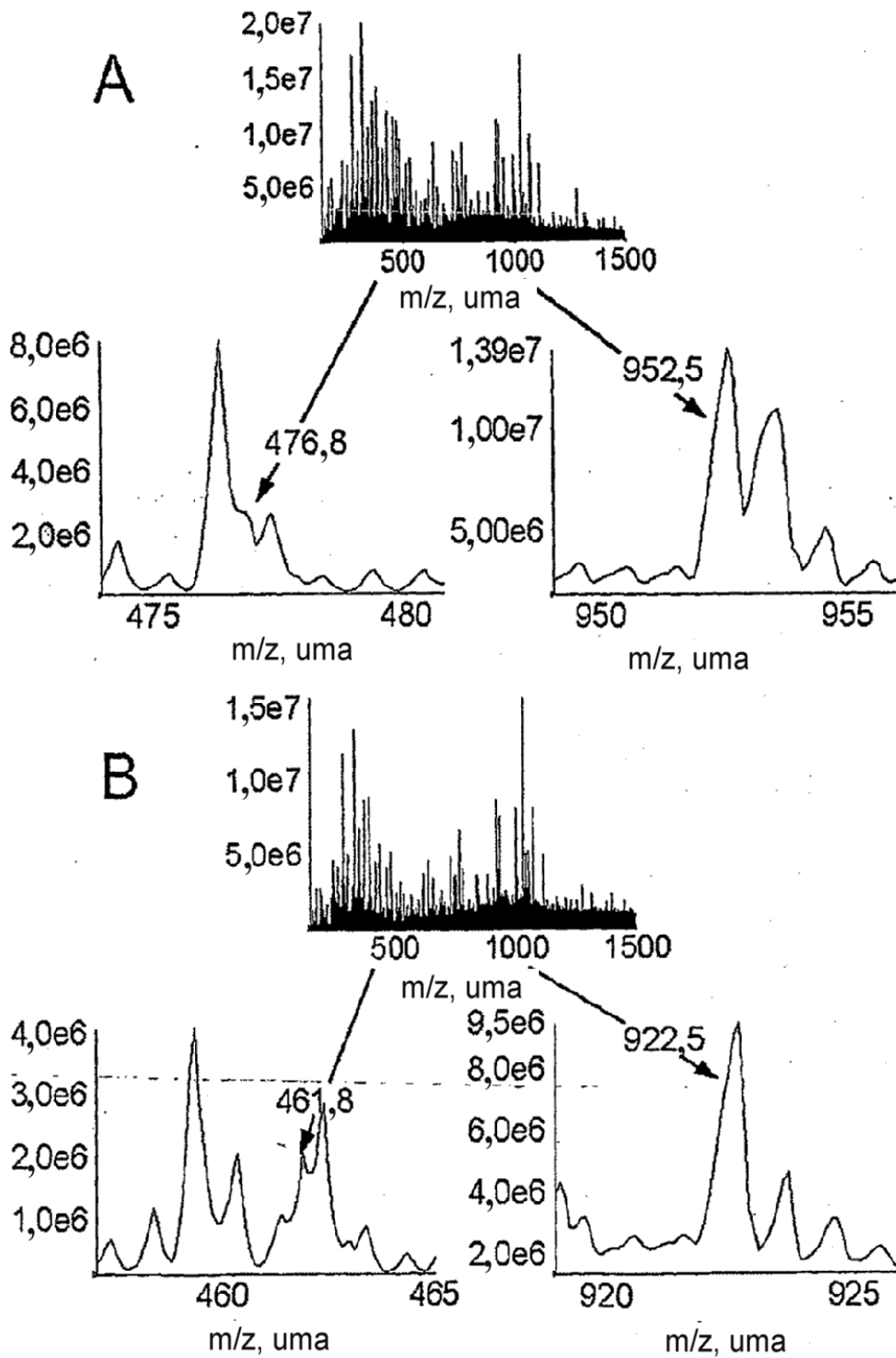


Figura 1

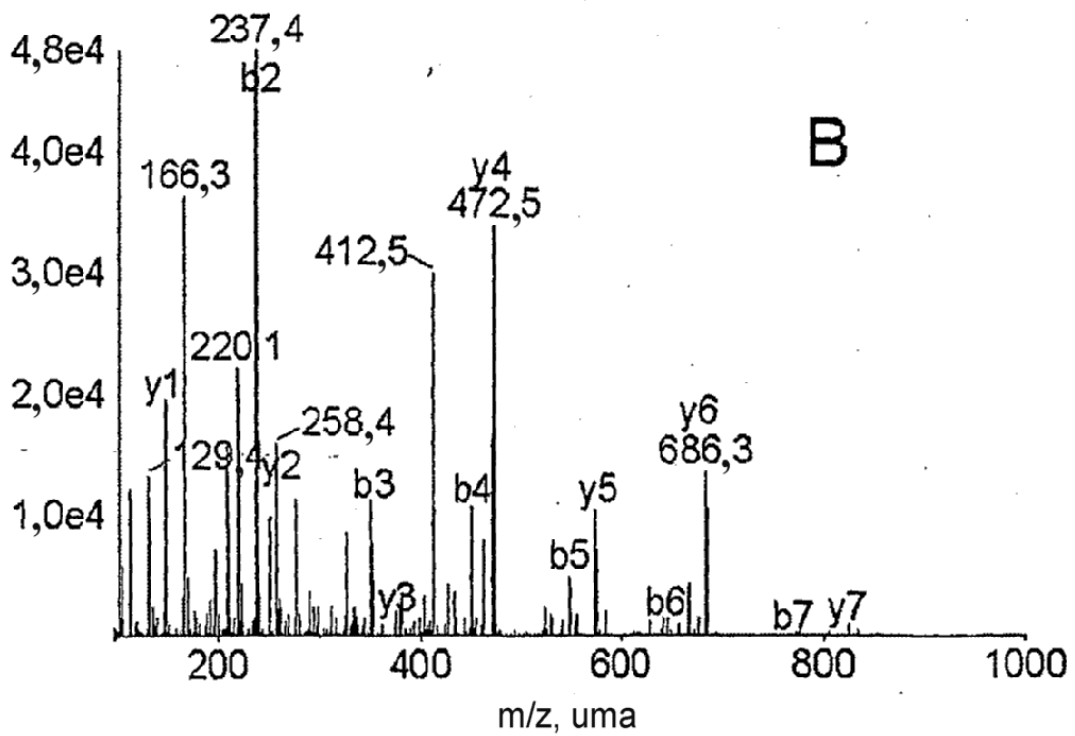
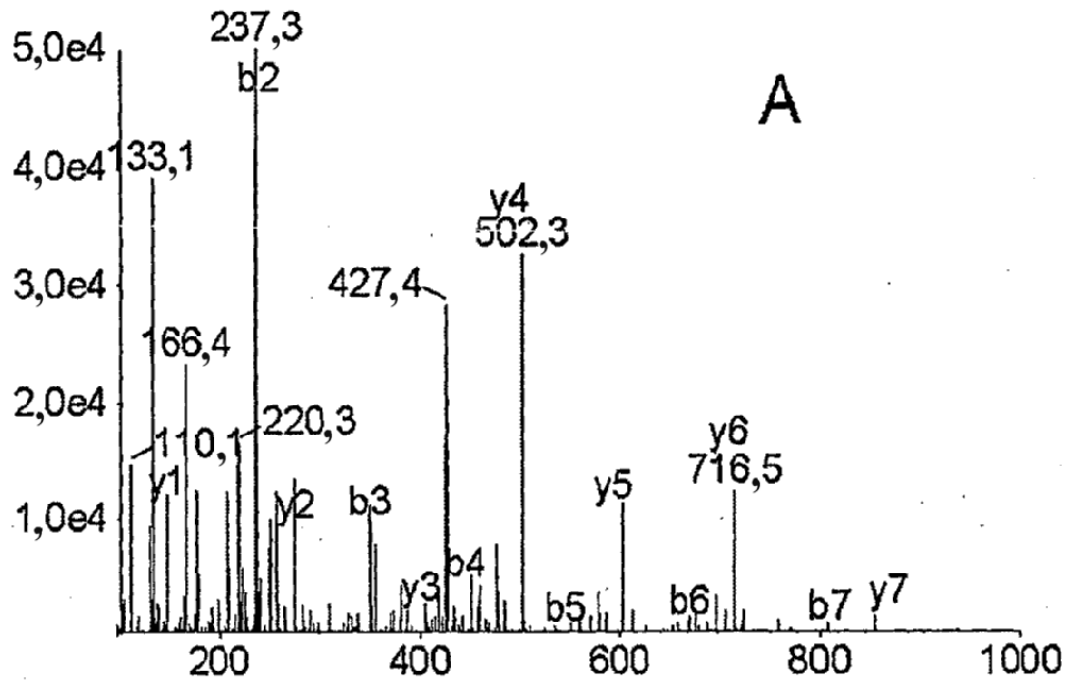


Figura 2

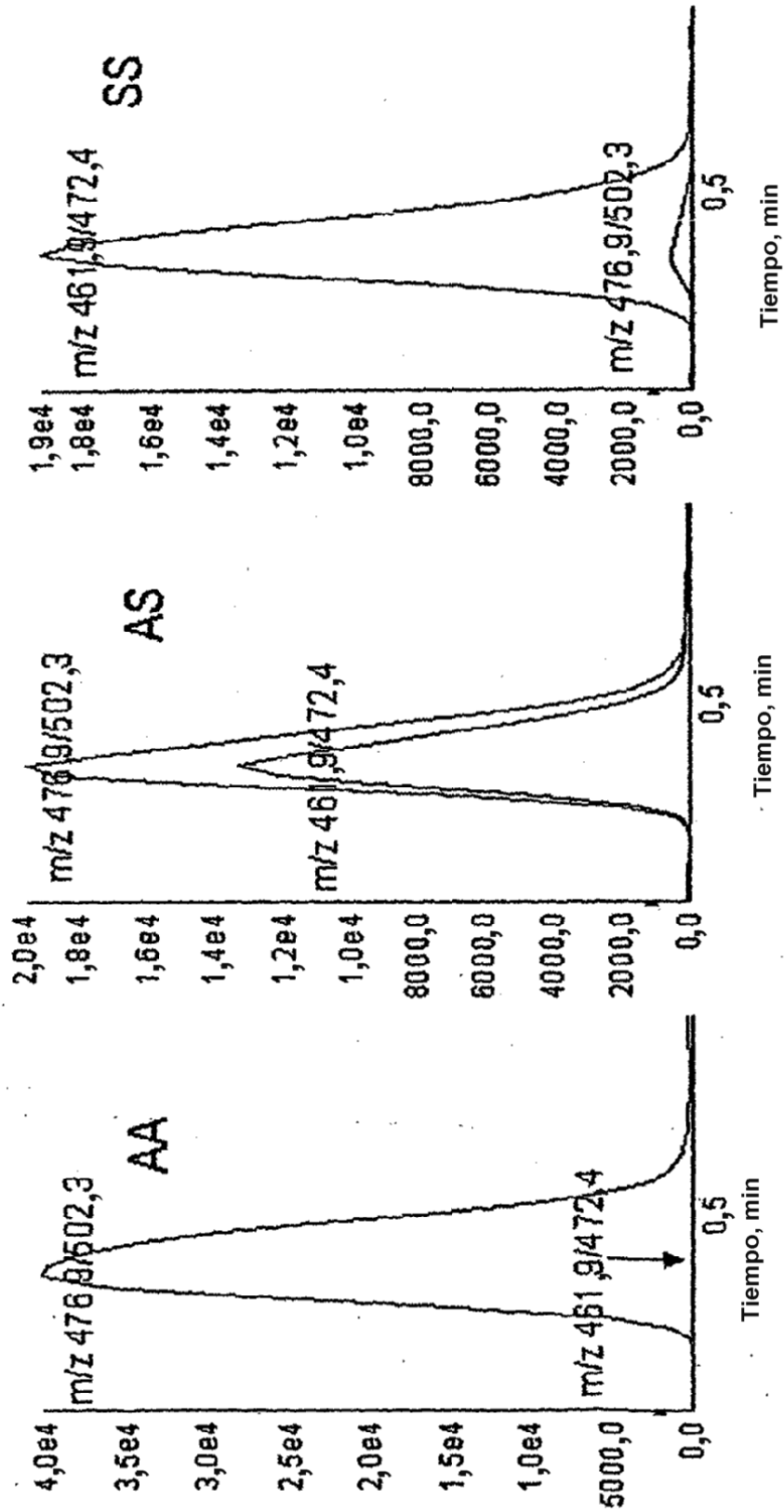


Figura 3

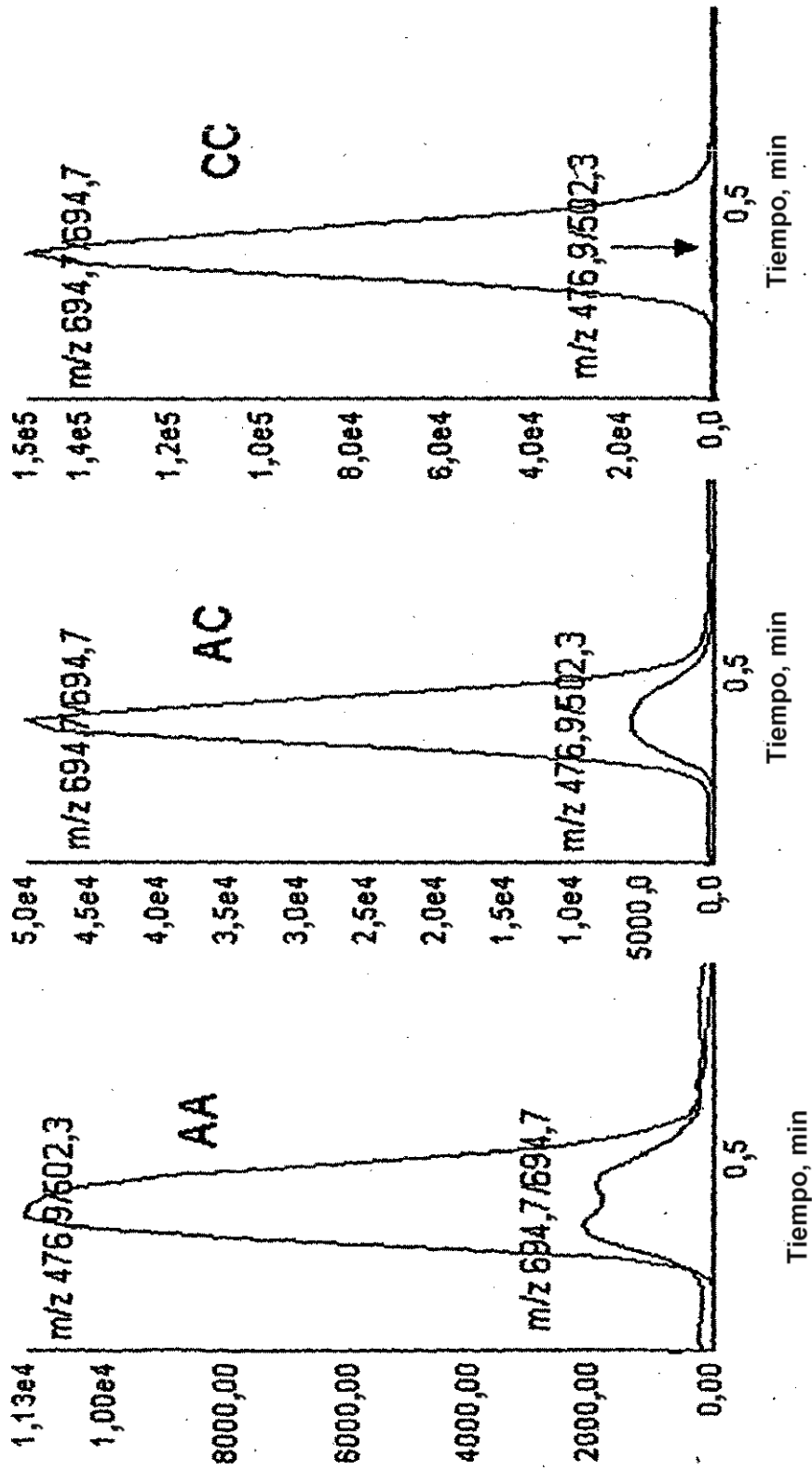


Figura 4

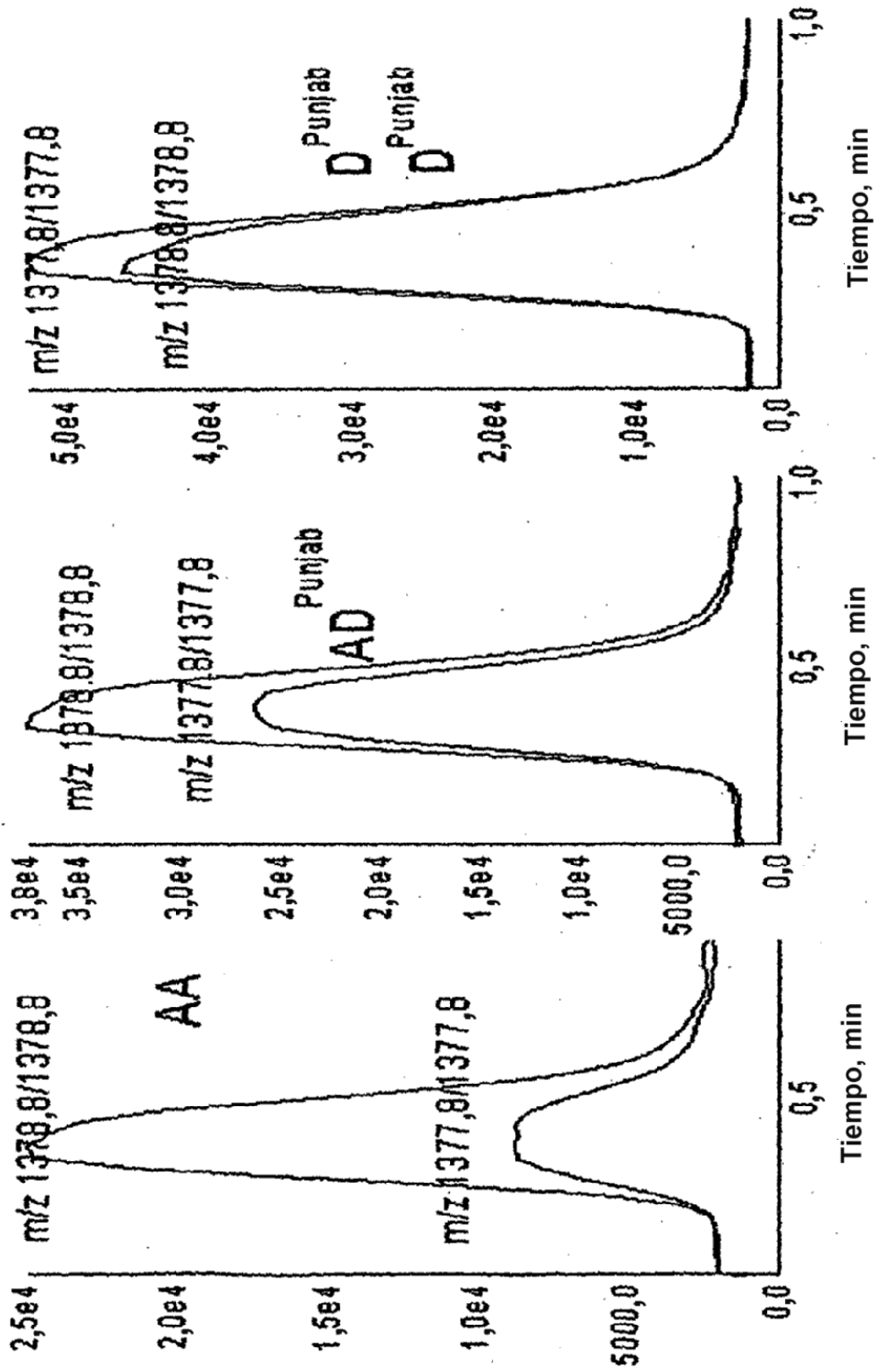


Figura 5

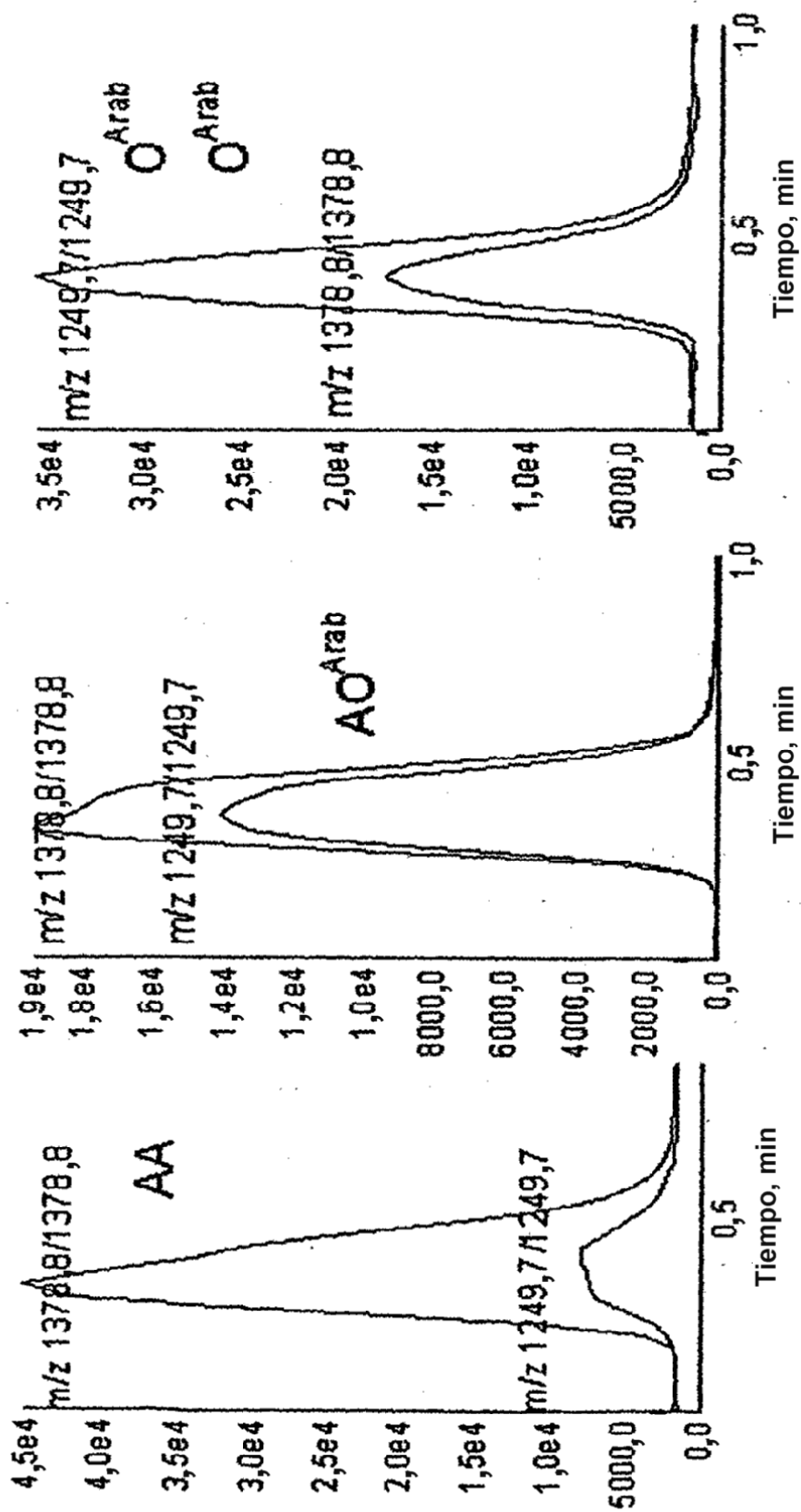


Figura 6

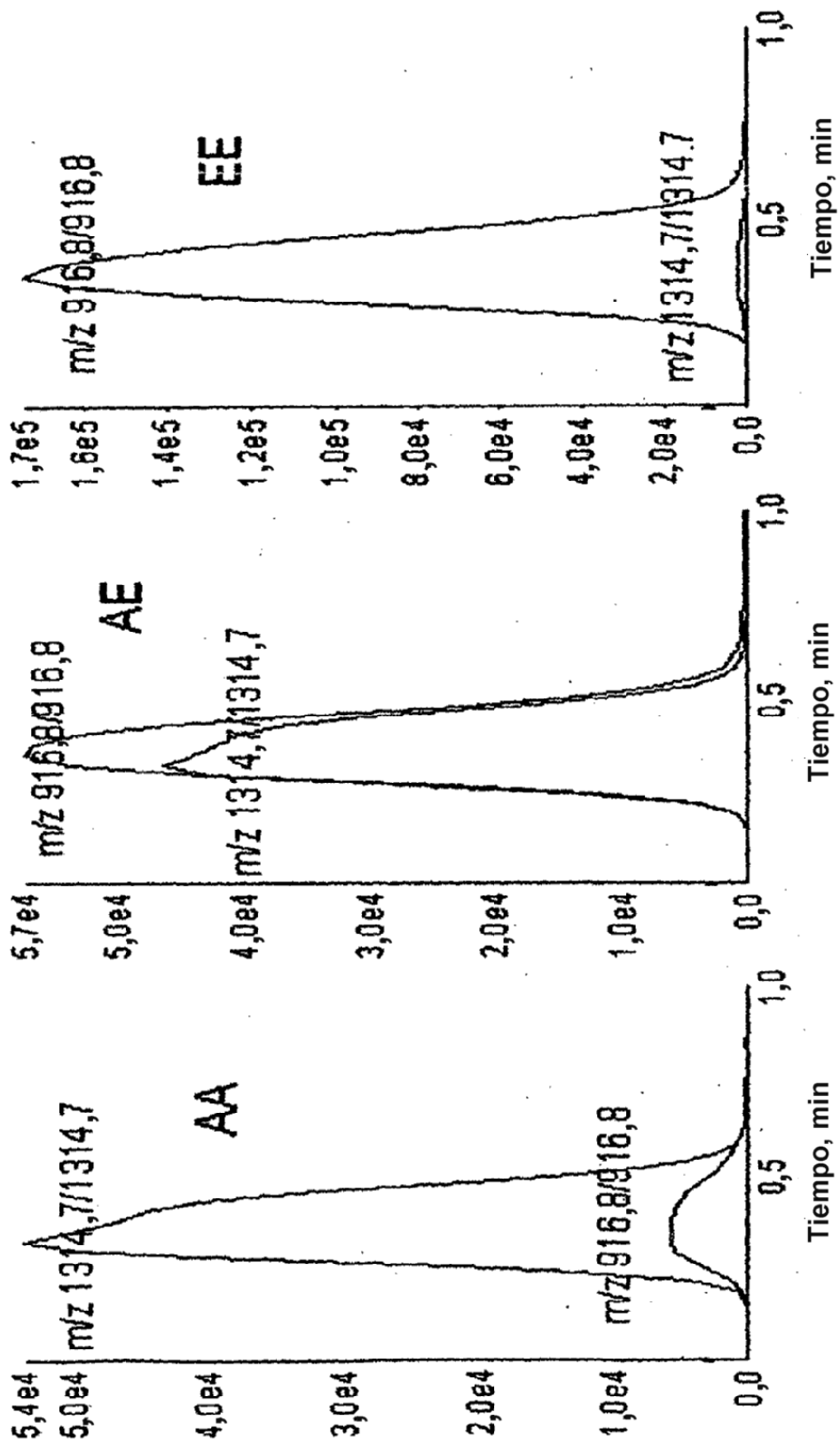


Figura 7