

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 250**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2008 E 08747663 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2152418**

54 Título: **Detección de isómeros utilizando espectrometría de masas con derivatización diferencial**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 744518

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**PERKINELMER HEALTH SCIENCES, INC.
(100.0%)
940 WINTER STREET
WALTHAM, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**CERDA, BLAS;
CHERKASSKIY, ALEX y
LI, YIJUN**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 400 250 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).

DETECCIÓN DE ISÓMEROS UTILIZANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON DERIVATIZACIÓN DIFERENCIAL

Descripción

5 ANTECEDENTES

[0001] La espectrometría de masas es una técnica usada para analizar la relación masa/carga de los iones. Puede usarse para proporcionar la composición de un analito concreto generando un espectro de masas que representa los componentes del analito (espectrometría de masas tándem). Algunas de sus aplicaciones incluyen la
10 filtración de muestras biológicas en busca de marcadores de desórdenes o enfermedades específicas.

[0002] Chace et al, Clinical Chemistry Vol. 41 nº 1, páginas 62-68 describe un método de diagnóstico de la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce en manchas de sangre de recién nacidos mediante espectrometría de masas en el que los
15 aminoácidos ramificados presentes en las muestras se derivatizan y en el que se añaden como estándares internos al menos dos aminoácidos de cadena ramificada no derivatizados marcados con un átomo pesado.

[0003] Hasegawa et al, Drug Metabolism and Disposition Vol. 28 nº 8, páginas 920-924 describe un análisis espectrométrico de masas de la leucina en una muestra de
20 sangre que contiene DL-[²H₃] Leu como estándar interno.

RESUMEN

[0004] De conformidad con la presente invención, se proporciona un método para
25 evaluar isómeros moleculares de leucina de conformidad con la reivindicación independiente 1.

[0005] La invención también proporciona un método de diagnóstico de la enfermedad de la orina de jarabe de arce que se describe en la reivindicación independiente 14.

[0006] Otro aspecto de la invención lo constituye el uso de un primer estándar de
30 isómero molecular primero no derivatizado de leucina marcado con uno o más átomos pesados y un segundo estándar de isómero molecular segundo derivatizado o no derivatizado de leucina marcado con uno o más átomos pesados en cualquiera de dichos métodos.

[0007] La Espectrometría de Masas (conocida por sus siglas en inglés MS) puede
35 utilizarse para evaluar aminoácidos de cadena ramificada y puede utilizarse para

distinguir entre aminoácidos de cadena ramificada que son isómeros moleculares, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina. Los métodos para detectar aminoácidos de cadena ramificada isoméricos pueden incluir la derivatización de una muestra, por ej., esterificando la muestra. Sin embargo, dichos aminoácidos normalmente se derivatizan con diferentes eficacias.

[0008] Las diversas eficacias de derivatización pueden utilizarse para mejorar la especificidad y/o la sensibilidad de detección de varios aminoácidos de cadena ramificada. Los estándares internos, por ej., los aminoácidos de cadena ramificada marcados con uno o más isótopos pesados pueden utilizarse para rastrear la eficacia de la derivatización y, de este modo, mejorar la detección y cuantificación de los aminoácidos de cadena ramificada de una muestra. En algunos casos, se utilizan al menos dos estándares internos. Los estándares son isoméricos con los aminoácidos de cadena ramificada pero tienen diferente peso molecular dado que tienen diferente marcado de isótopo pesado. En algunas realizaciones, se añade un estándar antes de la derivatización y el otro se añade después de la derivatización. En algunas realizaciones, un estándar se corresponde con un aminoácido derivatizado y el otro se corresponde con un aminoácido no derivatizado.

[0009] Se describe un método para evaluar isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina. El método incluye derivatizar uno o más isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada en una muestra que comprenda un aminoácido de cadena ramificada marcado con uno o más átomos pesados como primer estándar. El primer estándar puede ser, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina. Tras la derivatización, un aminoácido de cadena ramificada derivatizado o uno no derivatizado que esté marcado con uno o más átomos pesados se añade a la muestra como segundo estándar. El segundo estándar puede ser, por ejemplo, leucina, isoleucina y aloisoleucina. La muestra se evalúa espectrometría de masas tándem y en la muestra se detectan picos que indican formas no derivatizadas o derivatizadas, por ej., formas butiladas y no butiladas de uno o más aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina.

[0010] Las formas derivatizadas del primer y segundo estándar pueden tener diferentes pesos moleculares como resultado de un marcado con átomos pesados diferentes. Las formas no derivatizadas del primer y del segundo estándar pueden tener pesos moleculares diferentes como resultado de un marcado diferente con átomos pesados.

[0011] El método, además, puede incluir la determinación de la eficacia de derivatización de un aminoácido de cadena ramificada mediante referencia al los

estándares primero y segundo. El método, además, puede incluir la determinación de la concentración de un aminoácido de cadena ramificada en la muestra utilizando la eficacia de derivatización.

5 **[0012]** La derivatización puede ser la esterificación, por ej., llevada a cabo con un alcohol, por ej., butanol, isopropanol, etanol y metanol. El paso de la esterificación puede incluir la adaptación de uno o más parámetros, por ej., la temperatura y el tiempo de incubación, para reducir el nivel de esterificación de uno o ambas de entre isoleucina y la aloisoleucina. Menos del 100% de los aminoácidos de cadena ramificada pueden ser derivatizados, por ej., esterificados, por ej., aproximadamente el 10 80-94% de la leucina puede esterificarse, aproximadamente el 5-20% de la isoleucina puede esterificarse y aproximadamente el 25-40% de la aloisoleucina puede esterificarse.

[0013] La muestra, además, puede incluir un tercer y/o cuarto estándar antes de la derivatización. El tercer y/o cuarto estándar puede ser, por ej., leucina, isoleucina y 15 aloisoleucina. Las formas derivatizadas del primer, segundo, tercero y (opcionalmente) cuarto estándar pueden tener diferentes pesos moleculares como resultado de un marcado diferente con átomos pesados. Las formas no derivatizadas del primer, segundo, tercero y (opcionalmente) cuarto estándar pueden tener diferentes pesos moleculares como resultado de un marcado diferente con átomos pesados. El método 20 puede incluir otras características descritas en el presente.

[0014] Se describe un método de diagnóstico de desórdenes metabólicos. El método incluye el tratamiento de una muestra, por ej., una muestra que incluya sangre, de un sujeto, en condiciones en las que los aminoácidos de cadena ramificada, por ej., la leucina, la isoleucina y la aloisoleucina, de la muestra estén derivatizados. El sujeto 25 puede ser un humano, por ej., un recién nacido. La muestra incluye un aminoácido de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina marcado con uno o más átomos pesados como primer estándar. Tras la derivatización, se añade como segundo estándar un aminoácido de cadena ramificada derivatizado o no derivatizado, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina que está marcado con uno o más átomos 30 pesados. La muestra se evalúa utilizando espectrometría de masas tándem y se detectan en la muestra picos que indican formas derivatizadas y no derivatizadas, por ej., formas butiladas y no butiladas, de uno o más aminoácidos de cadena ramificada (por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina). Un nivel alterado de uno o más aminoácidos de cadena ramificada en la muestra con relación al nivel en una o más 35 muestras de referencias indica que el sujeto tiene, o corre el riesgo de desarrollar, un desorden metabólico caracterizado por niveles alterados de uno o ambos aminoácidos

de cadena ramificada y de cetoácidos de cadena ramificada.

[0015] El desorden metabólico puede ser, por ej., la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce (conocida por sus siglas en inglés MSUD), por ej., MSUD clásica, MSUD intermedia, MSUC intermitente, MSUD que responda a la tiamina, y /o MSUD
5 deficiente en E3. Esta afección puede, además, caracterizarse, por uno o más de los siguientes: cetoacidosis, anormalidad neurológica y alteración del desarrollo.

[0016] El método, además, puede incluir la determinación de la eficacia de la derivatización de un aminoácido de cadena ramificada por remisión al primer y segundo estándar. El método, además, puede incluir la determinación de la concentración de un
10 aminoácido de cadena ramificada en la muestra utilizando la eficacia de la derivatización.

[0017] La derivatización puede ser la esterificación, por ej., llevada a cabo con un alcohol, por ej., butanol, isopropanol, etanol y metanol. El paso de la esterificación puede incluir la adaptación de uno o más parámetros, por ej., la temperatura y el
15 tiempo de incubación, para reducir el nivel de esterificación de uno o ambos de entre la isoleucina y la aloisoleucina. Menos del 100% de los aminoácidos de cadena ramificada pueden ser derivatizados, por ej., esterificados, por ej., aproximadamente el 80-94% de la leucina puede esterificarse, aproximadamente el 5-20% de la isoleucina puede esterificarse y aproximadamente el 25-40% de la aloisoleucina puede
20 esterificarse.

[0018] Las formas derivatizadas del primer y segundo estándar pueden tener pesos moleculares diferentes como resultado de un marcado con átomos pesados diferentes. Las formas no derivatizadas del primer y segundo estándar pueden tener pesos moleculares diferentes como resultado de un marcado con átomos pesados diferentes.

[0019] La muestra puede incluir, además, un tercer y/o cuarto estándar antes de la derivatización. El tercer y/o cuarto estándar puede ser, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina. Las formas derivatizadas del primer, segundo, tercero y (opcionalmente) cuarto estándar pueden tener diferentes pesos moleculares como resultado de un
25 diferente marcado con átomos pesados. Las formas no derivatizadas del primer, segundo tercero y (opcionalmente) cuarto estándar pueden tener diferentes pesos moleculares como resultado de un diferente etiquetado del átomo pesado. El método puede incluir otras características descritas en el presente.
30

[0020] También se describe en el presente un método para obtener un perfil metabólico de un sujeto, por ejemplo, un humano. El método incluye proporcionar una
35 muestra biológica de un sujeto. La muestra incluye uno o más isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina y un

aminoácido de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina, marcado con uno o más átomos pesados como un primer estándar. Se derivatizan uno o más de los aminoácidos de cadena ramificada de la muestra. Tras la derivatización, un aminoácido de cadena ramificada derivatizado o no derivatizado, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina marcado con uno o más átomos pesados se añade a la muestra como segundo estándar. La muestra se evalúa utilizando espectrometría de masas tándem. Se detectan en la muestra picos indicativos de formas derivatizadas y no derivatizadas, por ej., formas butiladas y formas no butiladas, de uno o más aminoácidos de cadena ramificada. La presencia de aminoácidos de cadena ramificada en la muestra se utiliza para obtener el perfil metabólico del sujeto. El perfil metabólico puede incluir información sobre moléculas madre. El método puede incluir otras características incluidas en el presente.

[0021] Se describe en el presente un método para evaluar isómeros moleculares de pequeñas moléculas, por ej., metabolitos, por ej., aminoácidos de cadena ramificada.

Los isómeros moleculares se derivatizan antes de ser evaluados utilizando espectrometría de masas tándem. Se añade un primer estándar a la muestra antes de la derivatización; se añade un segundo estándar tras la derivatización. El segundo estándar puede estar derivatizado o no derivatizado. El primer y el segundo estándar tienen pesos moleculares diferentes tras la derivatización, por ej., de modo que los picos se distingan mediante espectrometría de masas. Por ejemplo, tienen marcado isotópico pesado diferente de modo que sus picos se desplazan de uno a otros y desde los isómeros en la muestra. El método puede incluir otras características descritas en el presente.

[0022] Se describe en el presente un método de evaluación de isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina. El método incluye: derivatizar uno o más isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada en una muestra; añadir, a la muestra, un aminoácido de cadena ramificada derivatizado o no derivatizado que se marca con un átomo pesado, como un estándar; evaluar la muestra utilizando espectrometría de masas tándem; y la detección de picos indicativos de formas derivatizadas y no derivatizadas de uno o más aminoácidos de cadena ramificada en la muestra. El método puede incluir otras características descritas en el presente.

[0023] Se describe en el presente un método de evaluación de isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada. El método incluye: derivatizar uno o más isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada en la muestra; evaluar la muestra utilizando espectrometría de masas tándem; detección de picos indicativos de

formas derivatizadas y no derivatizadas de uno o más aminoácidos de cadena ramificada en la muestra; y la determinación de la concentración de aminoácidos de cadena ramificada en la muestra utilizando información sobre la eficacia de derivación para cada uno de los diferentes isómeros. El método puede incluir otras características
5 descritas en el presente.

[0024] Se describe en el presente una composición que incluye: un primer estándar que incluye aminoácido de cadena ramificada derivatizados o no derivatizados y marcados con uno o más átomos pesados; y un segundo estándar que incluye aminoácido de cadena ramificada derivatizado marcado con uno o más átomos
10 pesados. El primer y el segundo estándar son isoméricos pero tienen diferentes pesos moleculares debido a la diferencia de marcado con átomos pesados. El aminoácido de cadena ramificada puede ser, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina. La composición puede incluir, además, una muestra experimental que comprende aminoácidos de cadena ramificada que son isómeros. La composición puede incluir
15 otras características descritas en el presente.

[0025] También se describe un kit para evaluar los isómeros de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina y aloisoleucina. El kit incluye: un primer estándar de aminoácido de cadena ramificada no derivatizado marcado con uno o más átomos pesados; y un segundo estándar de aminoácidos de cadena ramificada
20 derivatizado o no derivatizado marcado con uno o más átomos pesados. Las formas no derivatizadas del primer y del segundo estándar tienen diferentes pesos moleculares como resultado de un marcado diferente con átomos pesados. El kit puede incluir otras características descritas en el presente, por ej., el kit puede incluir, además, software informático útil para detectar los aminoácidos de cadena ramificada.

[0026] En algunas realizaciones, los métodos del presente se utilizan para analizar una muestra que no ha sido procesada mediante otro método de separación, es decir, que no ha sido procesada por cromatografía.

[0027] Los métodos descritos en el presente pueden utilizarse para implementar análisis diagnósticos rápidos y rentables.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028]

La Fig. 1 es una vista general de la degradación oxidativa de los aminoácidos de cadena ramificada (conocidos por sus siglas en inglés BCAA) leucina, isoleucina y valina. La transaminación de los BCAA se cataliza mediante una
35 única aminotransferasa de cadena ramificada (reacción 1) que existe tanto

como isoformas citosólicas como mitocondriales. La descarboxilación oxidativa de citoácidos de cadena ramificada se cataliza mediante un complejo único de deshidrogenasa cetoácida de cadena ramificada mitocondrial (reacción 2). El bloque metabólico en la segunda reacción da como resultado la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra un ejemplo de medición de niveles elevados de valina y leucina/isoleucina/al isoleucina en una mancha de sangre seca.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la butilación diferencial en manchas de sangre seca.

La Fig. 4A es una vista esquemática de dos tipos de picos espectrales de masas que pueden obtenerse de las muestras de leucina e isoleucina y de un primer estándar no derivatizado.

La Fig. 4B es una vista esquemática de cinco tipos de picos espectrales de masas que pueden obtenerse tras procesar las muestras de la Fig. 4A.

La Fig. 5A es una vista esquemática de dos tipos de picos espectrales de masas que pueden obtenerse de la muestra de leucina e isoleucina y de un primer estándar no derivatizado.

La Fig. 5B es una vista esquemática de cinco tipos de picos espectrales de masas que pueden obtenerse tras procesar las muestras de la Fig. 5A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0029] Con frecuencia es importante distinguir entre diferentes isómeros moleculares. Los métodos descritos en el presente pueden utilizarse para detectar una o más isoformas moleculares, por ej., de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina o aloisoleucina de forma que únicamente se identifica cada isómero con el uso de un espectrómetro de masas tándem. La incorporación de uno o más estándares en una muestra puede utilizarse para determinar la concentración de un isómero en concreto en una muestra. Además, la incorporación de uno o más estándares puede utilizarse para determinar las eficacias de la derivatización diferenciales de varias isoformas. En algunas realizaciones, las eficacias de la derivatización pueden determinarse para varias isoformas antes del análisis de la muestra deseada. Los métodos descritos en el presente son aplicables a otros isómeros que tienen propiedades de derivatización diferenciales.

[0030] En algunas realizaciones, las muestras se evalúan para detectar tanto formas derivatizadas como no derivatizadas de isómeros moleculares (por ej., mediante la

adquisición de datos en MS con escáneres apropiados para formas derivatizadas y no derivatizadas). A continuación, la información sobre la tasa de derivatización de los isómeros (obtenida durante el mismo proceso de evaluación o en un análisis independiente) puede utilizarse para inferir la concentración original de cada isómero.

5 Esto es especialmente importante en casos en los que, por ejemplo, las formas no derivatizadas no pueden detectarse de manera independiente, por ejemplo, cuando producen los mismos picos en espectrometría de masas tándem (MS). La información sobre las tasas de derivatización puede determinarse mediante la utilización de estándares, por ej., un estándar interno para uno o más de los isómeros no
10 derivatizados y/o derivatizados. El estándar interno puede estar marcado con uno o más isótopos pesados de modo que sus picos se desplacen desde los de los isómeros de una muestra (por ej., desde una fuente natural). Alternativamente, se pueden utilizar estándares externos o muestras paralelas que contienen dichos estándares para determinar la tasa de derivatización (véase, por ej., la Tabla 1 del Ejemplo 2).

15 **[0031]** En una realización, se utilizan dos estándares internos para evaluar la concentración de leucina (Leu), isoleucina (Ile) y/o aloisoleucina (alo-Ile) en una muestra. Leu, Ile y alo-Ile son todos isómeros estructurales y, de este modo, cuando son butilesteres todos aparecen el mismo m/z (+188) en el experimento MS/MS (véase, por ej., la Fig. 2). Por ejemplo, para evaluar estos isómeros en una muestra, la
20 muestra se derivatiza con alcohol (por ej., butanol) en ácido (por ej., 3N HCl) para generar n-butilesteres de los analitos de interés. La muestra puede incluir un primer estándar con una forma derivatizada de un isómero (o con una forma no derivatizada que se derivatiza tras procesar la muestra). Utilizando alcoholes de diferente longitud de cadena de alquilo (por ej., etanol, metanol, butanol, isopropanol) puede mejorar la
25 especificidad de la separación. Por ejemplo, la discriminación de Ile durante la esterificación puede ser aún más pronunciada cuando se utiliza el isopropanol como reactivo derivatizante.

[0032] La muestra derivatizada se reconstituye en un solvente tratable mediante un análisis de espectrometría de masas tándem (MS/MS) y se puede añadir un segundo
30 estándar (por ej., un control interno no derivatizado o un control interno derivatizado) para uno de los isómeros (por ej., para Ile o alo-Ile). A continuación pueden analizarse los picos detectados mediante MS (por ej., utilizando escáneres adecuados para formas no derivatizadas y derivatizadas). La combinación de controles internos (por ej., un primer estándar derivatizado y un segundo estándar derivatizado o no derivatizado)
35 puede utilizarse para identificar y cuantificar la concentración de formas derivatizadas y no derivatizadas.

[0033] La combinación de estándares internos también puede utilizarse, por ej., para proporcionar información sobre las tasas de derivatización relativas a partir de las cuales se puede calcular la concentración real de un isómero en la muestra original. De manera alternativa, la información revelada en el presente puede utilizarse como

5 tasas de derivatización relativa.

[0034] En algunas realizaciones, la muestra incluye estándar interno Leu en forma butilada y estándar interno lle en forma no butilada. En una implementación, al menos uno (ya sea Leucina, Isoleucina y/o Aloisoleucina) de los estándares internos se esterifica utilizando un alcohol (como parte del ensayo o como parte del componente

10 del ensayo (es decir, estándar interno pre-esterificado) y al menos uno de los estándares internos (Leucina, Isoleucina o Aloisoleucina) se añade a la mezcla de reacción del ensayo en forma no esterificada tras el paso de la esterificación. Los estándares internos de Leu, lle y alo-lle pueden o no tener las mismas marcas isotópicas. La marca isotópica puede ser cualquiera de los isótopos estables que

15 permitan potencialmente la diferenciación entre especies con el mismo peso molecular a través de adquisición MS/MS.

[0035] Los métodos y composiciones descritas en el presente pueden incluir el uso de varias combinaciones de estándares internos. Por ejemplo, pueden incluir uno, dos o tres estándares internos (cada uno incluyendo uno de entre Leu, lle o alo-lle) que son

20 no derivatizados y se convierten en derivatizados tras procesar la muestra. Puede añadirse otro estándar interno tras la derivatización. El estándar añadido puede ser Leu, lle o alo-lle no derivatizado o leu, lle o alo-lle derivatizado. La combinación de los estándares puede utilizarse para calcular las eficacias de derivatización y/o concentraciones de isómeros en una muestra concreta (véase, por ej., el Ejemplo 3).

[0036] Los métodos descritos en el presente pueden utilizarse ampliamente, por ejemplo, en cualquier aplicación que requiera la medición separada de Leu y lle/alo-lle. Por ejemplo, estas técnicas pueden utilizarse para cuantificar los rendimientos de una reacción química orgánica, (incluyendo reacciones sintéticas a escala comercial o industrial). Midiendo una mezcla de Leu y lle con un ensayo no derivatizado se puede

30 obtener el complemento completo de las concentraciones combinadas (Leu + lle). Midiendo la mezcla tras la butilación se obtendrá principalmente la concentración de Leu en la mezcla. Por lo tanto, mediante la sustracción de la concentración obtenida con el ensayo derivatizado de la obtenida del ensayo no derivatizado se obtendrá la concentración de lle.

Aplicaciones ejemplares

[0037] Los métodos descritos en el presente tienen una variedad de aplicaciones,

incluyendo, entre otros, la detección de varios desórdenes metabólicos, por ej., la enfermedad de la orina del jarabe de arce (MSUD), cuantificando los rendimientos de reacciones orgánicas, obteniendo perfiles metabólicos e identificando compuestos que modulan los niveles de aminoácidos de cadena ramificada que son isómeros.

5 *La enfermedad de la orina de jarabe de arce*

[0038] La Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce (MSUD) es un error innato del metabolismo que puede detectarse utilizando espectrometría de masas tándem (MS/MS).

[0039] La MSUD está causada por una deficiencia en el complejo (BCKDH) de deshidrogenasa α -cetoácida de cadena ramificada. Las acumulaciones de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) y α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKA) en pacientes con MSUD provocan cetoacidosis, desórdenes neurológicos y problemas en el desarrollo. La influencia de los BCAA y BCKA en el sistema nervioso puede causar problemas clínicos derivados de funciones disminuidas del sistema

10

15

20

25

nervioso central. Los daños a las células neuronales encontradas en los pacientes con MSUD se producen presumiblemente por concentraciones más elevadas tanto de BCAA como de BCKA en sangre (Indo y Matsuda, Patel, M.S. Roche, T.E. Harris, R.A. eds. Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes 1996:227-247 Birkhauser Basel, Suiza, 1996; Chuang y Shih, Scriver, C.R. Beaudet, A. L. Sly, W.S. Valle, D. eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8ª ed. 2001:1971-2005 McGraw-Hill Nueva York, NY, 2001; Westall et al., Am. J. Dis. Child. 94:571-572, 1957). La secuencia metabólica que provoca la MSUD se muestra en la Fig. 1 (Chuang y Shih).

[0040] La MSUD está clasificada de varias formas. Entre estas formas, la clásica tiene el comienzo más temprano y es la más grave (Chuang y Shih). Las cinco formas de MSUD son las siguientes.

1. *MSUD clásica*. En la MSUD clásica, la forma más común de la enfermedad, la actividad del complejo BCKDH es <2% de la de los sujetos normales y el 50% o más de los cetoácidos se derivan de la leucina. Los recién nacidos afectados parecen normales en el momento de su nacimiento, con síntomas

30

35

que se desarrollan entre los 4 y 7 días de edad. Los bebés muestran letargo, pérdida de peso, desequilibrio metabólico y signos neurológicos progresivos de hipotonía e hipertonía cambiante, reflejan encefalopatía grave. El olor de la orina se parece al jarabe de arce. Se producen con frecuencia coma y ataques seguidos de la muerte si no se tratan. El tratamiento temprano mejora significativamente el resultado intelectual pero el escaso control bioquímico puede afectar negativamente al rendimiento. Los niveles en sangre de leucina

aumentan antes de la manifestación de síntomas (Chuang y Shih).

Otras dos variantes, normalmente con síntomas más leves que aparecen tras el periodo neonatal, son el MSUD intermitente y el intermedio.

5 2. *MSUD intermedia*. Los pacientes con esta variante no sufren ataques de cetoacidosis graves pero no pueden desarrollarse adecuadamente y sufren acidosis sistémica leve y retrasos en el desarrollo. Los niveles de BCAA y BCKA en plasma aumentan constantemente. La limitación de proteínas es un tratamiento eficaz a diferencia de la administración de tiamina. Estos pacientes
10 tienen una actividad BCKDH residual de entre 3y 30% (Schulman et al., Am. J. Med. 49: 118-124, 1970; Schadewaldt et al., Pediat. Res. 49:627-635,2001).

15 3. *MSUD intermitente*. Los pacientes con esta forma sufren ataxia episódica recurrente, letargo, semicoma y BCAA y BCKA en plasma elevados ocasionales tras infecciones u otras enfermedades graves. Normalmente tienen un intelecto normal aunque en algunos casos con ataques de cetoacidosis repetidos, el intelecto está en el límite de lo normal o es inferior a dicho límite. La restricción de la proteína dietética es un tratamiento efectivo. Los niveles de la actividad BCKDH son superiores que en la variante clásica de la enfermedad
20 (Morris et al., Pediatrics 28:918-923,1961).

25 4. *MSUD receptiva a la tiamina*. Los pacientes con este tipo de MSUD padecen hiperaminoacidemia similar a la forma intermedia pero puede tratarse exitosamente con la administración de tiamina. La actividad del complejo BCKDH en los pacientes con MSUD que responden a la tiamina es del 2 al 40% de la de los sujetos normales. Otros estudios demuestran que el defecto primario en el MSUD que responde a la tiamina es la afinidad reducida del BCKDH mutante por TPP debido a una mutación en la proteína E2 (Chuang et al., J Biol. CHem. 279:17792-17800, 2004).

30 5. *MSUD deficiente en E3*. El MSUD deficiente en E3 o MSUD tipo III, presenta una deficiencia combinada de BCKDH, complejos de piruvato deshidrogenasa y -cetoglutarato deshidrogenasa. Esto se debe a que E3 es un componente común de los 3 complejos de multienzimas mitocondriales. Los pacientes con
35 este tipo muestran un desarrollo inadecuado, hipotonía, acidosis láctica y desarrollo tardío. El lactato, el piruvato y el -cetoglutarato son elevados así

como los BCAA y los BCKA. El pronóstico de esta variante varía con niveles de actividad enzimática residual. Los estudios neuropatológicos mostraron encefalopatía de Leigh. En algunos casos, los tratamientos con biotina, ácido lipoico y dicloroacetato son efectivos (Chuang y Shih).

5

[0041] Los marcadores bioquímicos del MSUD con la L-Leucina (Leu), L-Valina (Val), L-Isoleucina (Ile) y L-Aloisoleucina (alo-Ile). La presencia de L-Aloisoleucina en pacientes con MSUD es un marcador diagnóstico de MSUD (Snyderman et al., Pediatrics 34:454-72, 1964).

10 **[0042]** La separación de la Aloisoleucina de su enantiómero Isoleucina se puede conseguir fácilmente mediante espectrometría de masas – cromatografía de gases (conocido por sus siglas en inglés GSMS). El mecanismo de conversión de Isoleucina a Aloisoleucina se realiza a través de una tautomerización enol-ceto como confirman los estudios N¹⁵-isotópicos (Matthews et al., Pediatr. Res. 14:854-7, 1980). En un
15 individuo normal, uno de los intermediarios de la secuencia, es decir, el ácido (+)-ceto-β-metil-valérico es un sustrato de BCKDC, que evita su acumulación evitando de ese modo la conversión de L-Isoleucina a L-Aloisoleucina (Matthews et al.). En pacientes que dan positivo en MSUD, se produce la conversión de L-Isoleucina a L-Aloisoleucina.

20 **[0043]** Los métodos descritos en el presente pueden utilizarse para obtener medidas distintas y específicas de Leu, Ile y alo-Ile.

Perfil metabólico

[0044] Los métodos descritos en el presente también pueden utilizarse para obtener
25 un perfil molecular de una muestra y, por lo tanto, de un sujeto (por ej., un humano o un humano recién nacido). El perfil puede incluir información que indica si un isómero molecular concreto de un aminoácido de cadena ramificada (por ej., leucina, isoleucina, aloisoleucina y/o valina) está presente y normalmente incluye información sobre la presencia (ya sea cualitativa o cuantitativa) de cada isómero de un grupo
30 concreto.

[0045] Los perfiles pueden incluir el nivel de leucina, isoleucina, aloisoleucina y/o valina es un sujeto (por ej., un paciente humano como un humano recién nacido). También pueden detectarse otras biomoléculas, cuantificadas y/o evaluadas en una muestra biológica utilizando espectrometría de masas tándem. El perfil metabólico
35 resultante puede utilizarse para valorar la salud de un sujeto (por ej., un paciente humano como un humano recién nacido) como la presencia o ausencia de un

desorden, por ej., desorden metabólico o para valorar el riesgo de sufrir la enfermedad.

5 **[0046]** Se puede utilizar un perfil metabólico obtenido mediante métodos descritos en el presente en el diagnóstico o predicción de la susceptibilidad a una variedad de desórdenes metabólicos (por ej., MSUD) porque los indicadores biomecánicos (por ej., leucina, isoleucina, aloisoleucina y/o valina) examinados pueden indicar dichos desórdenes, ya incluyan o no síntomas manifiestos (por ej., síntomas psicológicos o conductuales) de la enfermedad que hayan pasado a ser evidentes.

10 **[0047]** Un perfil metabólico como el descrito en el presente puede ser útil para monitorizar el metabolismo de un sujeto (por ej., un mamífero como los humanos), como uno que esté bajo tratamiento contra una enfermedad metabólica. Por ejemplo, los métodos pueden utilizarse para determinar la eficacia terapéutica de un tratamiento concreto. Con base en esta determinación, se puede ofrecer al sujeto opciones terapéuticas alternativas o adicionales. El perfil metabólico también puede ser útil para
15 valorar el cumplimiento de un paciente con un tratamiento concreto como una limitación dietética.

[0048] Los métodos descritos en el presente implican la determinación de la presencia o cantidad de al menos un isómero molecular de un aminoácido de cadena ramificada en el que la presencia o cantidad de al menos un aminoácido se
20 correlaciona con la presencia o ausencia de un desorden metabólico. Los métodos descritos en el presente pueden usarse cuantitativamente, si se desea, para permitir la comparación de los resultados de la muestra analizada con una cantidad de estándar conocida o predeterminada de analito(s) concreto(s) (por ejemplo, utilizando un estándar interno como se describe en el presente). Además, o de forma alternativa, los
25 métodos pueden utilizarse cualitativamente cuando se compara una muestra analizada con una muestra de referencia que puede ser o bien una referencia normal o una referencia de un desorden metabólico. En este formato, la cantidad relativa de aminoácidos puede ser indicativa de un desorden metabólico. Una muestra de referencia, por ejemplo, puede proceder de un sujeto que no padece el desorden
30 metabólico en cuestión.

Rendimientos de la Reacción Química

[0049] La tecnología descrita en el presente también puede utilizarse en cualquier
35 aplicación que requiera una medición independiente de Leu, Ile o alo-Ile. Por ejemplo, estas técnicas pueden utilizarse para cuantificar los rendimientos de una reacción

sintética, por ej., para medir la concentración de una o más de los siguientes: Leu, Ile y alo-Ile.

[0050] Midiendo una mezcla de, por ej., de Leu y Ile con un análisis no derivatizado se puede obtener la totalidad de las concentraciones combinadas (Leu+Ile). Midiendo la
5 mezcla tras la derivatización, por ej., butilización, se puede obtener principalmente la concentración de Leu en la mezcla. Por lo tanto, se puede obtener la concentración de Ile restando la concentración obtenida con el análisis derivatizado a partir de la obtenida con el análisis no derivatizado.

10 *Métodos para Identificar Compuestos que Modulan los Niveles de Aminoácidos de Cadena Ramificada*

[0051] También se proporcionan métodos para identificar compuestos que modulan (por ej., reducen) los niveles de isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada, por ej., leucina, isoleucina, aloisoleucina y/o valina in vitro o en una célula u
15 organismo. Dado que los niveles irregulares de estos aminoácidos están asociados con un riesgo aumentado de determinados desórdenes (por ej., MSUD), los compuestos identificados de este modo podrían ser útiles para tratar la MSUD. Las células que pueden ponerse en contacto con el compuesto candidato puede ser de cualquier especie de modo que las células produzcan leucina, isoleucina, aloisoleucina y/o valina (ya sea sintética o naturalmente). Las células pueden ser células primarias o
20 líneas de células y pueden ser de tipo histológico, por ej., sin carácter limitativo, células epiteliales, fibroblastos, células linfoides, macrófagas/monocitos, granulocitos, queratinocitos, células neuronales o células musculares. Las células pueden cultivarse en placas de cultivo de tejido. A menudo se prefiere que las células crezcan en placas de ensayo multipocillo (por ej., con 96 pocillos o placas de ensayo con 384 pocillos) de
25 modo que se puedan evaluar múltiples compuestos candidatos al mismo tiempo. Se puede añadir el compuesto candidato (de forma opcional en varias concentraciones que oscilan, por ej., entre 0,001 nM a 10 mM) a una solución (por ej., un medio de cultivo) que contenga las células o, si el compuesto es una proteína, las células
30 pueden extraerlo recombinantemente. Tras la incubación de las células extrayendo la leucina, isoleucina, alo-leucina y/o valina, puede determinarse la presencia o nivel de leucina, isoleucina, alo-leucina y/o valina utilizando los métodos de espectrometría de masas descritos en el presente. Antes de la detección, las células pueden lisarse y se prepara una muestra a partir del lisado para la espectrometría de masas tándem. A
35 menudo, se puede añadir un compuesto de control a un conjunto de células ya sea como control positivo o negativo y evaluado en paralelo.

[0052] Los compuestos identificados en cualquiera de los métodos descritos en el presente incluyen varias clases químicas. Los compuestos pueden ser biomoléculas que incluyen, sin carácter restrictivo, proteínas (por ej., enzimas), péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos (por ej., peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados de análogos estructurales de los mismos, polinucleótidos y análogos a los polinucleótidos. La identificación de los compuestos de ensayo a través del uso de varias librerías descritas en el presente permite una modificación posterior del compuesto analizado “candidato” o “cabeza de serie” para optimizar la capacidad del “candidato” o “cabeza de serie” para modular los niveles de leucina, isoleucina, alo-leucina y/o valina en una célula.

Espectrometría de masas

[0053] Puede utilizarse la espectrometría de masas tándem para distinguir y/o medir los isómeros. Normalmente, en espectrometría de masas tándem, se vinculan dos analizadores de masas en serie a través de una celda de colisión. El primer analizador de masas (MS-1) se utiliza para seleccionar un ión de interés (por ej., un ión de una proporción concreta de masa/carga (m/z)). Los iones seleccionados se transfieren, a continuación, a una celda de colisión donde se fragmentan por colisiones con un gas inerte. Una vez que los iones padre (en ocasiones denominados precursores) se han fragmentado, el segundo analizador de masas (MS-2) se utiliza bien para escanear y detectar todos los iones hijos producidos para seleccionar y detectar iones fragmentados concretos. Existe un número de analizadores de masas disponibles, por ej., cuadrupolos, de tiempos de vuelo (conocido por sus siglas en inglés TOF), DE sectores magnéticos y tanto con trampas de iones cuadrupolos como con transformada de Fournier. Los espectrómetros de masas tándem ilustrativos están disponibles en: Waters Corporation, Thermoelectron y Sciex. Los espectrómetros de masas tándem más utilizados comúnmente son los cuadrupolos triples por electrospray.

[0054] Muchos espectrómetros de masas presentan exactitudes de masas a alta resolución. Por ejemplo, en el caso de un ión cargado simplemente, este rango corresponde a 0,6 m/z . Las variaciones menores (por ej., variaciones en la calibración) en un espectrómetro de masas pueden dar como resultado señales m/z de iones que no coinciden con las indicadas en el presente pero la señal m/z correspondiente a las presentadas puede identificarse fácilmente y usarse, por ej., mediante compensación para su ajuste en la calibración.

[0055] Las muestras adecuadas para los métodos descritos en el presente incluyen fluidos biológicos, células, tejido o fracciones de los mismos incluyendo biomoléculas, por ej., isómeros moleculares de aminoácidos de cadena ramificada que indican un estado metabólico. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra obtenida de un sujeto (por ej., un mamífero como puede ser un humano) o puede derivarse de dicho sujeto. Por ejemplo, la muestra puede ser una sección de tejido obtenida mediante biopsia o células que se sitúan o se adaptan al cultivo de tejidos. Las muestras ilustrativas, por ejemplo, incluyen fibroplastos cultivados, células del líquido amniótico cultivadas y muestras de vello coriónico. La muestra también puede ser una muestra de fluido biológico como orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, fluido espinal cerebral, lágrimas, mucosidad y similares. La muestra puede fraccionarse en mayor medida, si se desea, a una fracción que contenga tipos de células concretas. Por ejemplo, una muestra de sangre puede fraccionarse en suero o en fracciones que contengan tipos concretos de células sanguíneas como glóbulos rojos o leucocitos. Si se desea, la muestra puede ser una combinación de muestras de un sujeto como una muestra de una combinación de tejido y fluido y similares. Los métodos para obtener muestras que mantengan la actividad o integridad de moléculas en la muestra son conocidas para los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen el uso de soluciones amortiguadoras y/o inhibidores incluyendo inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa que conservan o minimizan los cambios en las moléculas de la muestra. Dichos inhibidores incluyen, por ejemplo, quelatores como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol bis (Paminoetil éter) N, N, N1,N1-tetraacético (EGTA), inhibidores de la proteasa como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipain y similares e inhibidores de la fosfatasa como el fosfato, el fluoruro de sodio, el vanadato y similares. Las soluciones amortiguadores adecuadas y las condiciones para el aislamiento de moléculas son conocidas para los expertos en la materia y pueden variar dependiendo, por ejemplo, del tipo de molécula en la muestra a calificar (véase, por ejemplo, Ausubel et al. *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*, 3^a ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Filadelfia, (1999)).

[0056] También puede procesarse una muestra para eliminar o minimizar la presencia de sustancias que interfieran. Para la utilización en los métodos descritos en el presente, una muestra puede estar en una variedad de estados físicos. Por ejemplo, la

muestra puede ser un líquido o un sólido, puede disolverse o suspenderse en un líquido, puede ser una emulsión o un gel y puede absorberse en un material. Como ejemplo no limitativo, la muestra puede ser una muestra de sangre líquida, una muestra de suero líquido, una muestra de leucocitos líquida, sangre seca, suero o una muestra de glóbulos blancos o la muestra absorbida en un sustrato de polímero o papel. Antes de realizar la espectrometría de masas, la muestra puede extraerse utilizando una solución de extracción (véase a continuación). Como se describirá a continuación con más detalle, la tecnología descrita en el presente requiere que algunas muestras se derivaticen, por ej., se esterifiquen, por ej., a butilesteres antes del análisis utilizando espectrometría de masas tándem.

Ejemplo 1. Discriminación de un isómero en una mezcla Leucina/Isoleucina

[0057] El siguiente experimento demuestra que existe un grado significativo de butilación diferencial entre la leucina (Leu) y la isoleucina (Ile).

[0058] Se utilizaron soluciones de aminoácidos de referencia que contienen Leu e Ile cuyas concentraciones han sido certificadas por los Institutos Nacionales de Estándares y Tecnología para preparar soluciones para su análisis mediante MS/MS. Una solución que contiene Leu e Ile con concentraciones 2,31 +/- 0,09 y 2,24 +/- 0,07 μM respectivamente, se procesó de conformidad con la práctica actual secando la solución y exponiéndola a n-butanol en 3-N HCl para generar los butilesteres correspondientes. Los butilesteres de esta solución se midieron mediante espectrometría de masas tándem. Las concentraciones experimentales para la mezcla Leu/Ile se determinaron con la ayuda de un estándar interno ($^2\text{H}_3\text{Leu}$) que ya está presente en la solución con la concentración conocida (4,55 +/- 0,19 μM).

[0059] Si Leu e Ile estuvieran totalmente butilados, el valor esperado para la concentración de la mezcla Leu/Ile sería 4,55 +/- 35 μM . Este valor se determinaría por la abundancia del pico en $m/z+188$ con referencia al pico estándar interno. El resultado obtenido, sin embargo, sería una concentración de 2,8 +/- 0,03 μM indicando una diferencia significativa entre los resultados esperados y los experimentales. De hecho, el resultado representaba únicamente el 62% del valor esperado que está fuera del error experimental esperado.

[0060] Las mismas soluciones se comprobaron mediante MS/MS utilizando un método que no requiera el paso de la butilación. En este caso, Leu e Ile aparecieron en $m/z+132$ y el estándar interno en $m/z+135$. Los resultados de este experimento indicaron una concentración para la mezcla de 4,1 +/- 0,05 μM dentro del error experimental esperado lo que representa el 90% de exactitud. Este resultado

demostraba que la desviación sustancial de lo esperado en el primer experimento se atribuye a la reacción de butilación y llevó a la conclusión de que la butilación discrimina uno de los dos aminoácidos de la mezcla.

5 Ejemplo 2. Eficacias de la esterificación diferencial para Leucina, Isoleucina y Aloisoleucina

[0061] Para dilucidar qué aminoácido se discrimina durante la butilación, las soluciones individuales de Leu, Ile y Alo-ile se prepararon cada una con una concentración de 5 μM . Estas soluciones se analizaron dispensando 100 μL de cada solución en pocillos de placas de microtitulación (seis réplicas de cada uno) y secándolas. Cada uno de estos pocillos recibió a continuación 60 μL de una solución de n-butanol en 3N HCl y la placa se incubó a 60°C durante 30 minutos. Tras la incubación, el exceso de butanol y de HCl se evaporó y las muestras secas se reconstituyeron con 100 μL de una solución de acetonitrilo y agua (con 0,1% de ácido acético) que contienen una concentración de 5 μM de estándar interno $^2\text{H}_3\text{Leu}$. Las muestras se inyectaron en un espectrómetro de masas tándem (triple cuadrupolo ESI) y se analizaron mediante un escáner de pérdida neutra de 46. Este escáner detecta los aminoácidos que no han sido esterificados (es decir, que no han reaccionado). Por lo tanto, el uso de este experimento en combinación con la presencia del estándar interno $^2\text{H}_3\text{Leu}$ permitió la cuantificación de Leu, Ile y alo-Ile de forma independiente.

[0062] Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 1 a continuación. Como se puede ver en esta Tabla, existen pruebas significativas de la butilación diferencial entre estos tres isómeros de aminoácidos. En este experimento, la cantidad de aminoácido no esterificado fue una indicación del grado de butilación. En el caso de Leu, la presencia de aminoácido no esterificado fue 0,7 μM . Este resultado indicaba que Leu butila muy eficazmente y que aproximadamente el 86% de Leu fue butilado. En contraste, la cantidad de Ile no esterificada determinada en este experimento fue 4,4 μM . Esta cantidad representan el 88% de la concentración original de 5 μM Ile. Por lo tanto, únicamente el 12% de Ile inicial se butiló. Además, la cuantificación del alo-ile no esterificado en este experimento dio como resultado una concentración de 3,3 μM que representa el 66% de la concentración de alo-Ile original. De este modo, únicamente el 34% de alo-Ile original se butiló.

[0063] Estos resultados claramente indican que existe una diferenciación significativa en las tasas de butilación entre estos tres aminoácidos y, de este modo, puede utilizarse la esterificación como medio de diferenciar estos tres isómeros mediante espectrometría de masas.

Tabla 1. Eficacias de butilación de Leu, Ile y alo-Ile.

Solución	Parte no butilada μM	Parte butilada μM (total – no butilada)	Eficacia de butilación
$^2\text{H}_3\text{Leu}$ y Leu butilada	0,7	4,3	87%
$^2\text{H}_3\text{Leu}$ e Ile butilada	4,4	0,6	12%
$^2\text{H}_3\text{Leu}$ y alo-Ile butilada	3,3	1,7	34%

[0064] Habiendo determinado que la butilación no se produce en la misma tasa para todos los isómeros de Leu, el impacto clínico de esta diferenciación se evaluó midiendo manchas de sangre secas de recién nacidos con ensayos derivatizados. Para este experimento, se procesaron tres conjuntos idénticos de 288 muestras cada uno del siguiente modo: grupo 1 – ensayo derivatizado; se cuantificaron las Leu/Ile/alo-Ile butiladas; grupo 2 – ensayo derivatizado; se añadieron estándares internos durante el paso de la reconstitución; se cuantificaron Leu/Ile/alo-Ile que no reaccionaron; grupo 3- ensayo no derivatizado; se cuantificaron las Leu/Ile/alo-Ile no derivatizadas. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

[0065] El diagrama de cajas reproducido en la Fig. 3 demuestra que había una diferencia significativa entre los ensayos derivatizados y no derivatizados. Los resultados derivatizados fueron el 84% de los valores no derivatizados. Con base en las eficacias de butilación, la diferencia puede deberse a la Ile/alo-Ile no reactiva durante el paso de la butilación del ensayo derivatizado. Sobre todo, estos resultados demuestran que cuando se utilizan ensayos derivatizados, existe un elevado potencial para discriminar las Ile y Alo-Ile. También se observa que algunas muestras, por ej., muestras de sangre, normalmente contienen una pequeña cantidad de hidroxiprolina que es un isobárico con los isómeros de Leu. Esta pequeña cantidad de hidroxiprolina, sin embargo, únicamente contribuye al punto de partida de las mediciones.

[0066] No se ha informado con anterioridad sobre estas eficacias de la esterificación diferencial para Leu, Ile y alo-Ile. Estas eficacias diferenciales pueden utilizarse para evaluar la Leu, Ile y alo-Ile en una muestra, por ej., en aplicaciones analíticas que requieren una medición de Leu independiente de Ile, de Leu independiente de Alo-Ile o de Ile independiente de Alo-Ile.

Ejemplo 3. Separación mejorada de Leucina e Isoleucina

[0067] Una implementación incluye la evaluación de una muestra procedente de un humano recién nacido. Se puede obtener una mancha de sangre seca de un recién nacido. Las manchas de sangre seca de los recién nacidos se extraen con una solución metabólica y el extracto se seca. La muestra también puede incluir un estándar con un aminoácido no derivatizado, por ej., Leu. El extracto seco y el estándar interno se exponen al butanol en 3N HCl para generar n-butilesteres de los analitos de interés y del estándar. El exceso de n-butanol y HCl se evapora y la muestra derivatizada se reconstituye en un solvente tratable para su análisis mediante espectrometría de masas tándem (MS/MS). El análisis MS/MS se basa en diferentes relaciones de masa / carga (m/z) de los iones del analito para su identificación. En este enfoque, Val ($m/z = +174$, ion molecular protonado de Valina) es claramente distinguible de Leu, Ile y alo-Ile. Sin embargo, Leu, Ile y alo-Ile son todas isómeros estructurales y, de este modo, todas aparecen en la misma m/z (+188) en el experimento MS/MS (véase, por ej., la Fig. 2). Por lo tanto, cuando la muestra de sangre de un recién nacido muestra un pico elevado en $m/z +188$ se asume como un presunto positivo de MSUD, a pesar del hecho de que el ensayo no da indicios sobre cuál de estos aminoácidos provocó la elevación. Además, una MSUD bioquímico indicativo de la elevación de uno de estos tres marcadores (por ej., Ile), podría estar artificialmente enmascarado por altos indicadores de otro marcador que no sean indicativos del desorden (por ej., Leu). Por lo tanto, cuando los resultados de la detección de MSUD se basan en la acumulación de Leu, Ile y alo-Ile que aparecen a transición +188 m/z , puede dar lugar a un falso negativo.

[0068] Tras la derivatización, por ej., butilación, se añade un estándar interno no derivatizado (por ej., $^2\text{H}_{10}$ Ile). Adicionalmente, se adquieren datos del escáner MS/MS conocidos como pérdida neutra de 102 (el modo escáner utilizado para detectar los aminoácidos butilesteres) y de un escáner de pérdida neutra de 46 (el modo escáner utilizado para detectar los aminoácidos no butilados) de la misma muestra.

[0069] Teniendo en cuenta que tras la butilación aproximadamente el 87% de Leu se transforma y que tan solo se transforma un 12% (aproximadamente) de Ile y un 34% (aproximadamente) de alo-Ile, se espera ver en el escáner no derivatizado aproximadamente un 13% de la Leu original en la muestra más aproximadamente un 88% de la Ile original y aproximadamente un 66% de la alo-Ile original de la muestra. El estándar interno Ile no derivatizado proporciona una referencia para cuantificar las especies no butiladas de estos aminoácidos mientras que el estándar interno Leu derivatizado proporciona una referencia para cuantificar las especies butiladas. Este

método, por lo tanto, separa de forma efectiva Ile/alo-Ile de Leu y de este modo proporciona una medida más exacta.

[0070] Dado que Leu es el analito de mayor contribución a los niveles endógenos, la capacidad de reducir su contribución a la señal aumenta la sensibilidad para detectar cambios en la concentración de Ile/alo-Ile. De este modo, los cambios en la concentración de Ile y alo-Ile son más fácilmente perceptibles mediante la medición de especies no butiladas. Al mismo tiempo, las especies butiladas están generalmente libres de Ile/alo-Ile y, por lo tanto, proporcionan una medición más exacta de Leu y sus cambios.

10 **[0071]** Estas técnicas pueden utilizar varias combinaciones de estándares internos para cuantificar las isoformas derivatizadas y no derivatizadas. Con referencia ahora al ejemplo de la Fig. 4A, se añade un primer estándar interno de Leu, Ile o alo-Ile a la muestra a analizar. Se muestra un esquema de los espectros de masas de la muestra y del primer estándar en la Fig. 4A. En algunas realizaciones, se añaden dos o más estándares no derivatizados, por ej., un estándar de Leu, un estándar de Ile y/o un estándar de alo-Ile (cada uno marcado con un isótopo atómico pesado diferente). Tras procesarlo, se añade un segundo estándar interno derivatizado (incluyendo leucina, isoleucina o alo-isoleucina). Se reproduce un esquema de los espectros de masas que se obtienen tras la adición del segundo estándar en la Fig. 4B. (Las Figs. 4A y 4B (así como las 5A y 5B a continuación) son esquemáticas y no se basaron en una realización real). Se utiliza la concentración conocida de los estándares primero y segundo para cuantificar las concentraciones de formas derivatizadas y no derivatizadas del primer estándar tras el procesamiento para obtener la eficacia de la derivatización. A continuación, se utiliza la eficacia de la derivatización para obtener las concentraciones de leucina e isoleucina derivatizadas y no derivatizadas en las muestras procesadas.

25 **[0072]** En otra realización, se añade un primer estándar interno no derivatizado de Leu, Ile o alo-Ile a la muestra a analizar. En la Fig. 5A se muestra un esquema de los espectros de masas de la muestra y el primer estándar. En algunas realizaciones, se añaden dos o más estándares no derivatizados, por ej., un estándar de Leu, un estándar de Ile y/o un estándar de alo-Ile (cada uno marcado con un isótopo atómico pesado diferente). Tras procesarlo, se añade un segundo estándar interno no derivatizado (incluyendo Leu, Ile o alo-Ile). En la Fig. 5B se muestra un esquema de espectros de masa que puede obtenerse tras la adición del segundo estándar. Las concentraciones conocidas de los primeros y segundos estándares se utilizan para cuantificar las concentraciones de formas derivatizadas y no derivatizadas del primer

estándar tras el procesamiento y obtener la eficacia de derivatización. A continuación, se utiliza la eficacia de derivatización para cuantificar las concentraciones de leucina e isoleucina derivatizadas y no derivatizadas en las muestras.

[0073] Los métodos descritos en el presente pueden incluir el uso de no únicamente uno, sino al menos dos, por ej., de dos a cinco estándares internos. Es posible utilizar uno, dos o tres estándares no derivatizados (incluyendo cada uno de ellos Leu, Ile y/o alo-Ile) que se añaden antes de la derivatización de una muestra, un estándar interno derivatizado que se añade tras la derivatización (incluyendo Leu, Ile o alo-Ile) y/o un estándar interno no derivatizado que se añade tras la derivatización (incluyendo Leu, Ile o alo-Ile). En general, cada estándar se añade con una concentración conocida y cada uno se marca con un isótopo atómico pesado diferente. Si se utilizan estándares múltiples, pueden distinguirse entre ellos mediante la incorporación de un marcado isotópico diferente de modo que sus masas resultantes se distinguan.

[0074] Estas técnicas puede optimizarse en mayor medida, por ej., cambiando la temperatura de incubación durante la esterificación o cambiando el tiempo de incubación. Las condiciones pueden seleccionarse para perjudicar más la esterificación de un isómero con relación a otro, por ej., para perjudicar la esterificación de Ile y, de este modo, obtener una medición aún más específica de la Leu. Adicionalmente, el cambio de la concentración del ácido en el reactivo de esterificación puede utilizarse para aumentar la resolución entre estas especies isoméricas.

[0075] Se ha descrito una serie de modos de realización de la invención. Sin embargo, se entiende que pueden realizarse varias modificaciones. Por lo tanto, otras realizaciones entrarán en el ámbito de las reivindicaciones siguientes.

25

Reivindicaciones

1. Un método para evaluar los isómeros moleculares de la leucina, comprendiendo este método:
 - la derivatización de uno o más isómeros moleculares de leucina en una muestra que comprende un isómero molecular de leucina marcado con uno o más átomos pesados como un primer estándar;
 - la adición, a la muestra, tras la derivatización, de un isómero molecular derivatizado o no derivatizado de leucina que está marcado con uno o más átomos pesados como un segundo estándar;
 - la evaluación de la muestra utilizando espectrometría de masas tándem; y
 - la detección de picos indicativos de formas derivatizadas y no derivatizadas de uno o más isómeros moleculares de leucina en la muestra.

2. El método de la reivindicación 1 en el que las formas derivatizadas del primer estándar y la forma derivatizada del segundo estándar, si están presentes en forma derivatizada, tienen diferentes pesos moleculares como resultado de haberlas marcado con átomos pesados diferentes.

3. El método de la reivindicación 1 en el que el primer estándar anterior a la derivatización y el segundo estándar presente en formas no derivatizadas tienen pesos moleculares diferentes como resultado de un marcado con átomos pesados diferentes.

4. El método de la reivindicación 1 que además comprende la determinación de la eficacia de derivatización de un isómero molecular de leucina por referencia al primer estándar y al segundo estándar.

5. El método de la reivindicación 4 que además comprende la determinación de la concentración de un isómero molecular de leucina en la muestra utilizando la eficacia de derivatización.

6. El método de la reivindicación 1 en el que los isómeros moleculares de leucina incluyen una o más de las siguientes: leucina, isoleucina y aloisoleucina.

7. El método de la reivindicación 1 en el que la derivatización comprende la esterificación.

8. El método de la reivindicación 7 en el que la esterificación se realiza con un alcohol.

9. El método de la reivindicación 8 en el que el alcohol se selecciona de un grupo que consiste en butanol, isopropanol, etanol y metanol.

5

10. El método de la reivindicación 1 en el que menos del 100% de los isómeros moleculares de leucina están derivatizados.

11. El método de la reivindicación 1 en el que el primer estándar se selecciona de entre el siguiente grupo: leucina, isoleucina y alo-leucina.

10

12. El método de la reivindicación 1 en el que el segundo estándar se selecciona de entre el siguiente grupo: leucina, isoleucina y alo-leucina.

13. El método de la reivindicación 1 en el que la detección comprende la adquisición de picos de datos que representen formas derivatizadas butiladas y no butiladas de isómeros moleculares de leucina.

15

14. Un método para diagnosticar la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce (MSUD) que comprende

20

tratar una muestra de un sujeto en condiciones en las que los isómeros moleculares de leucina de la muestra están derivatizados, comprendiendo dicha muestra un isómero molecular de leucina marcado con uno o más átomos pesados como un primer estándar;

la adición a la muestra, tras la derivatización, de un isómero molecular derivatizado o no derivatizado de leucina que está marcado con uno o más átomos pesados como un segundo estándar;

25

la evaluación de la muestra utilizando espectrometría de masas tándem; y

la detección de picos indicativos de formas derivatizadas y no derivatizadas de uno o más isómeros moleculares de leucina en la muestra

30

en el que un nivel alterado de uno o más isómeros moleculares de leucina en la muestra con relación al nivel en una o más muestras de referencia es un indicio de que el sujeto tiene o corre el riesgo de desarrollar la Enfermedad de la Orina de Jarabe de Arce (MSUD).

35

15. El método de la reivindicación 14 que además comprende la determinación de la

eficacia de derivatización de un isómero molecular de leucina por referencia al primer estándar y al segundo estándar.

5 16. El método de la reivindicación 15 que además comprende la determinación de la concentración de un isómero molecular de leucina en la muestra utilizando la eficacia de derivatización.

17. El método de la reivindicación 14 en el que los isómeros moleculares de leucina incluyen uno o más de entre las siguientes: leucina, isoleucina y alo-leucina.

10

18. El método de la reivindicación 14 en el que la derivatización comprende la esterificación.

15 19. El método de la reivindicación 14 en el que la forma derivatizada del primer estándar y la forma derivatizada del segundo estándar, si están presentes en forma derivatizada, tienen diferentes pesos moleculares como resultado de un diferente marcado con átomos pesados.

20 20. El método de la reivindicación 14 en el que el primer estándar anterior a la derivatización y el segundo estándar presente en forma no derivatizada tienen pesos moleculares diferentes como resultado de un diferente marcado con átomos pesados.

25 21. La utilización de un primer estándar de isómero molecular primero no derivatizado de leucina marcado con uno o más átomos pesados; y un segundo estándar de isómero molecular segundo derivatizado o no derivatizado de leucina marcado con uno o más átomos pesados en el que las formas derivatizadas del primer estándar y del segundo estándar, si están presentes en forma derivatizada, tienen pesos moleculares diferentes como resultado de un diferente marcado con átomos pesados y en el que los isómeros moleculares primero y segundo no marcados de leucina tienen el mismo peso molecular;

30

en un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

22. El uso de la reivindicación 21 en el que los isómeros moleculares de leucina incluyen uno o más de las siguientes: leucina, isoleucina y alo-leucina.

35

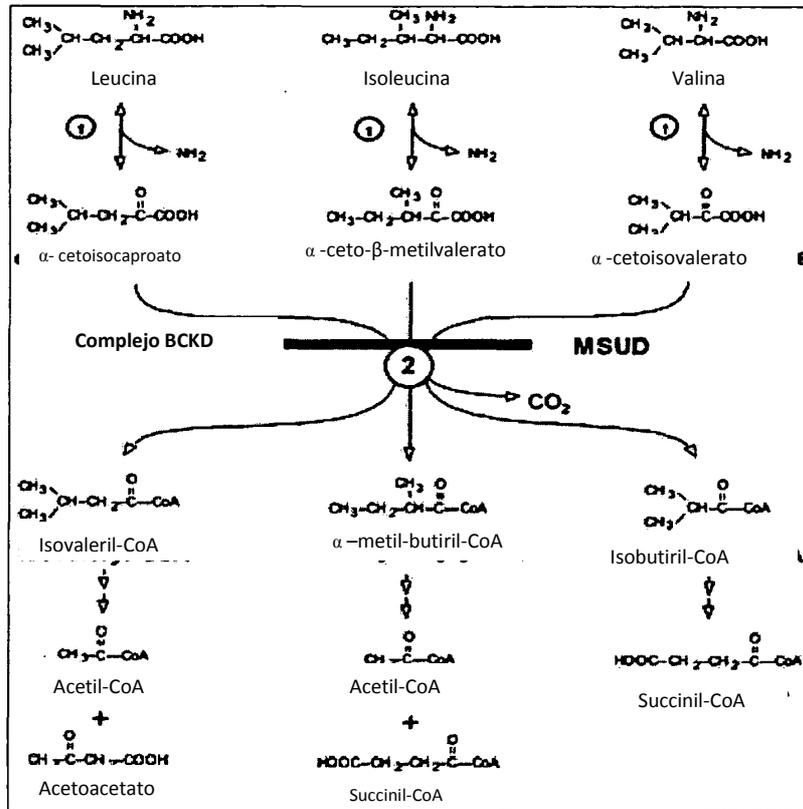


FIG.1

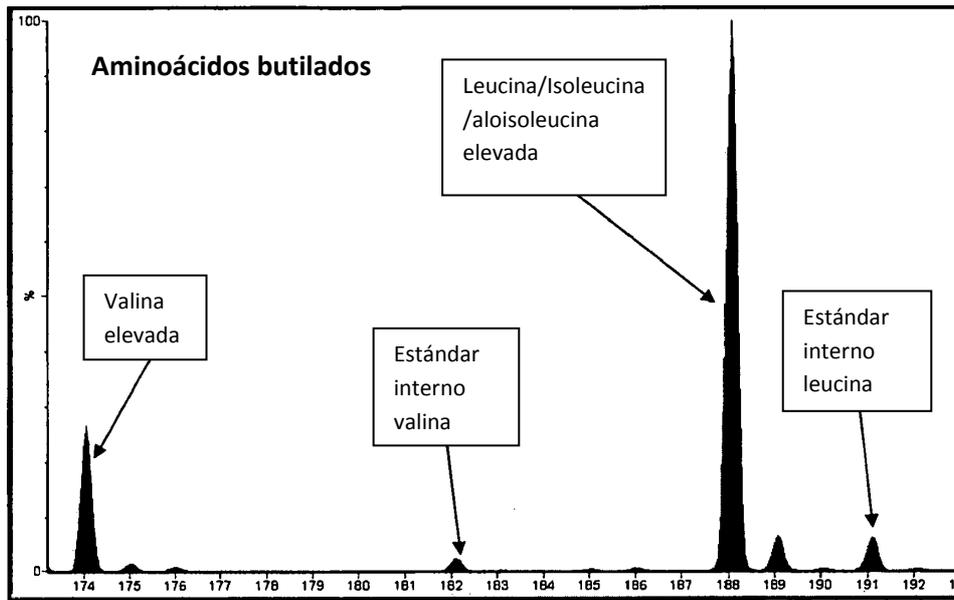


FIG. 2

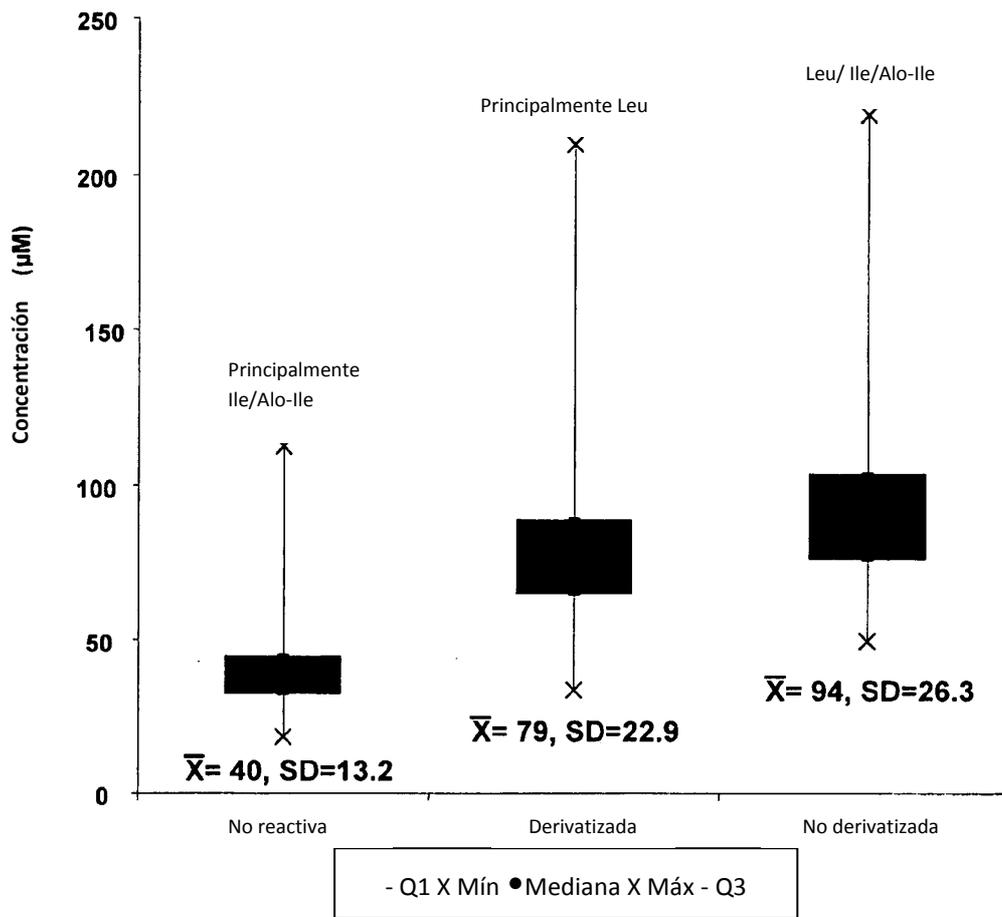


FIG. 3

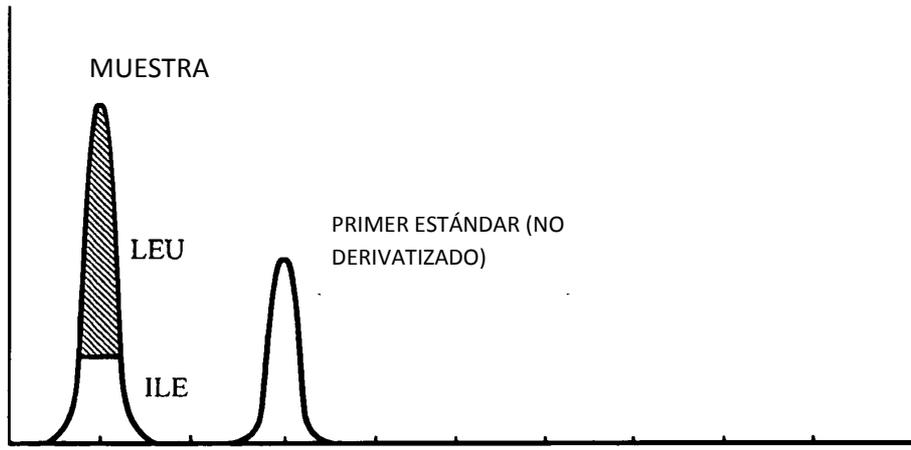


FIG. 4A

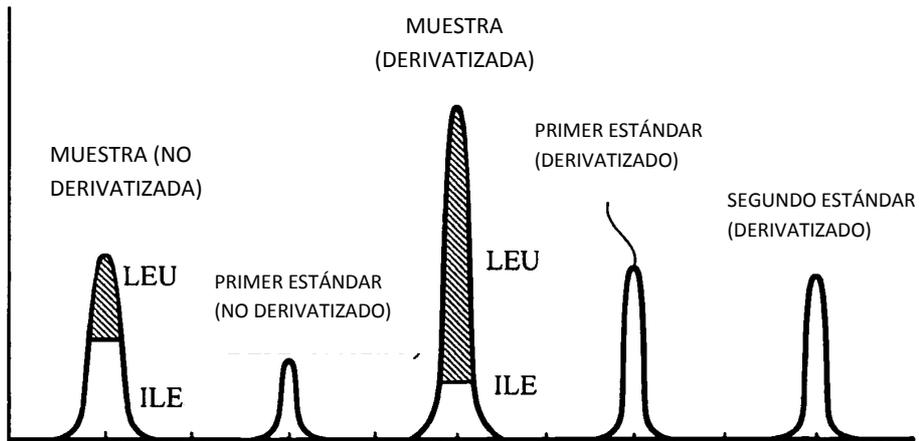


FIG. 4B

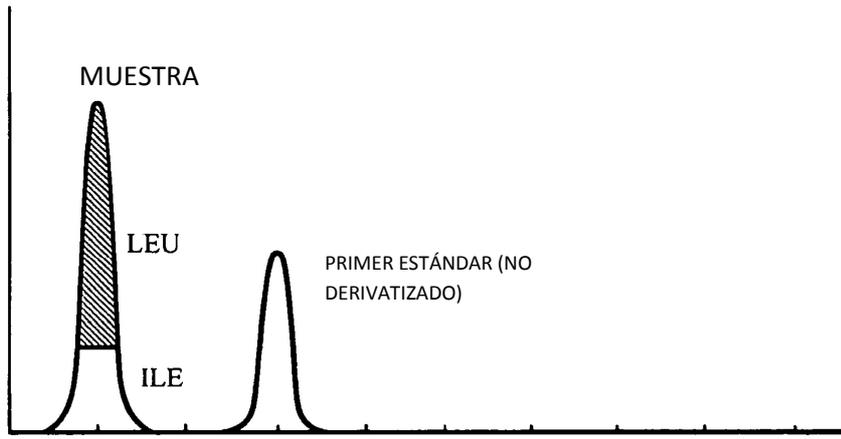


FIG. 5A

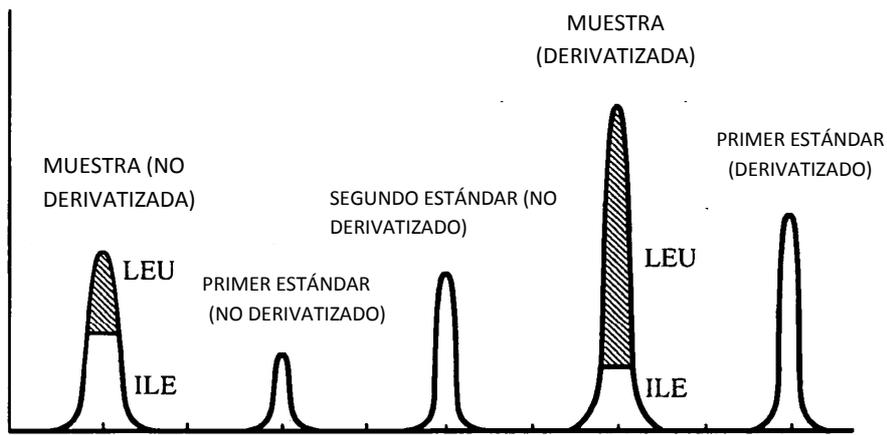


FIG. 5B