(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 449 941**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/66 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10803457 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 2517016**

(54) Título: **Procedimiento y kit para la determinación de metabolitos en muestras de manchas de sangre seca**

(30) Prioridad:

23.12.2009 IT FI20090272

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2014

(73) Titular/es:

AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA MEYER (100.0%)
Viale Pieraccini, 24
50139 Firenze, IT

(72) Inventor/es:

LA MARCA, GIANCARLO;
AZZARI, CHIARA y
RESTI, MASSIMO

(74) Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 449 941 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 y kit para la determinación de metabolitos en muestras de manchas de sangre seca

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento y a un kit para la determinación de metabolitos en muestras de manchas de sangre seca (como las tarjetas de Guthrie), en particular dichos metabolitos incluyen también aquellos debidos a un defecto en la desaminasa de adenosina (ADA) o a un defecto en la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP).

Antecedentes

[0002] La inmunodeficiencia combinada grave (SCID) es un grupo de enfermedades graves que afectan al sistema inmunitario. Los niños con SCID nacen sanos pero mueren por una infección grave recurrente en la infancia salvo que se proporcione una terapia adecuada. Desafortunadamente, la mayoría de los niños con SCID no son identificados en el periodo previo a la infección: el diagnóstico se hipotetiza habitualmente cuando se produce una infección grave. Sin embargo, en ese momento, aunque se inicia una intervención terapéutica correcta, ya puede haber daños presentes debidos a una infección grave (tales como meningitis, encefalitis, neumonía grave) y las secuelas permanentes pueden ser una importante carga tanto para los pacientes como para la familia y la sociedad.

[0003] El SCID debido a un defecto en la desaminasa de adenosina (ADA) o en la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP) es un trastorno hereditario en el metabolismo de la purina. La deficiencia genética de la enzima natural de purina ADA da como resultado unos grados variables de inmunodeficiencia que varían entre una inmunodeficiencia combinada grave de inicio neonatal hasta una inmunodeficiencia de inicio tardío que puede determinar una afectación grave de la función pulmonar en adolescentes o en adultos.

[0004] En su forma típica, la ausencia de la enzima ADA permite la acumulación de metabolitos tóxicos resultantes por un lado de un grave defecto del sistema inmunitario, y por otro lado, de un daño permanente de otros órganos y sistemas tales como el cerebro o el hígado. En estos casos, la SCID-ADA es mortal en los primeros meses de vida si no se trata, y está asociada con graves secuelas si se trata tarde.

[0005] También se ha descrito una ADA-SCID de inicio tardío. En estos casos, los pacientes experimentan infecciones graves recurrentes y enfermedad pulmonar crónica durante la infancia o la adolescencia. Las consecuencias clínicas del defecto en la PNP son muy similares.

[0006] En ambos casos, el transplante de células madre hematopoyéticas es curativo, pero depende de una buena compatibilidad con el donante. La terapia de sustitución enzimática está disponible y determina la eliminación de los metabolitos tóxicos y una buena reconstitución del sistema inmunitario. La terapia génica también es una opción para los pacientes. En cualquier caso, cualquiera que sea la terapia elegida, debería comenzar lo más pronto posible tras el nacimiento con objeto de obtener un buen efecto terapéutico. Por lo tanto, los procedimientos diagnósticos que permitan la realización de un diagnóstico seguro en los primeros días de vida son extremadamente importantes.

[0007] El diagnóstico temprano de la deficiencia en ADA es necesario porque las terapias oportunas (trasplante de células madre, terapia de sustitución enzimática) pueden ser curativas, mientras que la enfermedad es rápidamente mortal si no se trata. El diagnóstico se puede realizar buscando la actividad enzimática de la ADA o la acumulación de metabolitos debida a la deficiencia en la ADA. La evaluación de la actividad de la ADA es compleja y a menudo puede aportar unos resultados engañosos: de hecho, se puede encontrar un defecto grave en la actividad de la ADA en sujetos con una función inmunitaria absolutamente normal, debido a que la actividad residual variable de la ADA expresada en células distintas a las células inmunitarias puede ser suficiente para mantener una función inmunitaria correcta. Por esta razón, la dosis de metabolitos es absolutamente obligatoria para conseguir el diagnóstico de la inmunodeficiencia debida a una deficiencia en ADA o en PNP. Además, la dosificación de metabolitos permite monitorizar la reducción de su actividad tóxica tras el comienzo de la terapia de sustitución enzimática.

[0008] La medición de los metabolitos de purina y de pirimidina presenta problemas complejos para las separaciones. Se usan diferentes procedimientos para la medición en la práctica clínica, que varían desde una HPLC hasta una cromatografía en capa fina. Otros procedimientos incluyen una electroforesis capilar e incluso una HPLC en fase inversa con espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización.

[0009] Sin embargo, todos estos procedimientos se aplican sobre muestras de orina y se usan cuando ya se ha formulado una sospecha clínica de inmunodeficiencia debido al inicio de infecciones graves. Existe un serio inconveniente en los procedimientos, dado que los niños afectados deberían ser diagnosticados antes del inicio de las infecciones para maximizar la oportunidad de un tratamiento que les salve la vida. Los antecedentes familiares pueden ayudar a realizar un diagnóstico temprano, pero los datos obtenidos en los estados unidos muestran que únicamente el 18 % de los pacientes afectados tienen unos antecedentes familiares positivos. El número es probablemente incluso menor en Italia, donde la mayoría de las familias únicamente tienen un hijo.

[0010] El uso de la espectrometría de masas (EM) en los laboratorios clínicos ha aumentado mucho al comienzo del siglo XXI. Este desarrollo es debido obviamente a los grandes avances en las aplicaciones de la espectrometría de masas en los últimos quince años. La espectrometría de masas permite una medición muy rápida de diferentes metabolitos en diferentes muestras biológicas mediante el uso de manchas en papel de filtro o directamente en diferentes fluidos biológicos. Debido a su elevada sensibilidad, esta técnica se puede usar para los análisis cualitativos y cuantitativos de muchos analitos tales como purinas y pirimidinas, aminoácidos y acilcarnitinas, homocisteína, ácido orótico, succinilacetona etc., con los estándares internos apropiados.

[0011] La EM se usa ampliamente para el análisis de metabolitos procedentes de manchas de sangre seca tomadas al nacer (tarjetas de Guthrie), pero entre los metabolitos detectados, aquellos debidos a una deficiencia en la ADA no son detectados porque los procedimientos de extracción no son eficaces. El procedimiento clásico usado habitualmente para un cribado ampliado del recién nacido se realiza mediante el uso de un monoalcohol C1-3 de cadena lineal o ramificada (preferiblemente metanol) (Millington DS, y col., J Inherit Metab Dis. 1990; 13 (3): 321 - 4; Donald H. y col. Clin. Chem., noviembre de 2003; 49: 1797 - 1817; la Marca G. y col., Rapid Commun Mass Spectrom. 2003; 17 (23): 2688 - 92).

[0012] El propósito de la presente invención es proporcionar un procedimiento analítico que podría permitir también la determinación de metabolitos de purina y de pirimidina (incluyendo, en particular, metabolitos por una deficiencia en ADA o en PNP) junto con la determinación de otros metabolitos que se determinan habitualmente en el cribado de metabolitos, especialmente los cribados realizados en manchas de sangre seca tomadas al nacer.

Definiciones y abreviaturas

[0013]

ADA: desaminasa de adenosina
Ado: adenosina
D-Ado: desoxiadenosina
EM: espectrometría de masas
PNP: fosforilasa de nucleósidos de purina
SCID: inmunodeficiencia combinada grave

Sumario de la invención

[0014] El objeto de la presente invención es un procedimiento capaz de individualizar, mediante una EM, con una elevada sensibilidad y especificidad, metabolitos de purina y de pirimidina (incluyendo especialmente metabolitos por una deficiencia en ADA o en PNP) procedentes de sangre seca. El procedimiento descrito en este documento puede usarse para extraer Adenosina y Desoxiadenosina a partir de una muestra de sangre seca en unas condiciones que permiten extraer simultáneamente otros metabolitos, tales como otras purinas y pirimidinas, aminoácidos, carnitina libre o acilcarnitinas. El procedimiento de la invención se caracteriza por el uso de una mezcla de extracción que comprende una mezcla de agua y un monoalcohol C1-3 de cadena lineal o ramificada (preferiblemente metanol) en la que hay presente agua al menos al 10 % v/v. El procedimiento puede usarse, junto con otros cribados neonatales, sobre manchas de sangre seca, preferiblemente absorbidas en una tarjeta, y más preferiblemente en tarjetas de Guthrie, incluso más preferiblemente en las tarjetas de Gurthie obtenidas en el II - IV día de vida, o durante la terapia de sustitución enzimática (para monitorizar la eficacia de la terapia).

[0015] El procedimiento es fiable y reproducible, fácil de realizar y proporciona una respuesta definitiva en poco tiempo (1 - 2 días). El procedimiento permite evitar unas condiciones de extracción molestas (tales como una extremada acidez y elevada temperatura).

[0016] Por primera vez se ofrece la posibilidad de obtener el diagnóstico de ADA-SCID al nacer, antes del inicio de una enfermedad infecciosa. El diagnóstico temprano de la SCID permite tratar a los pacientes afectados muy pronto, de forma que se eviten las graves complicaciones debidas a una enfermedad infecciosa que se esperan siempre en el seguimiento de los pacientes inmunodeficientes. Los costes humanos y monetarios de una hospitalización prolongada, un cuidado intensivo y una muerte temprana que son el resultado de un retraso en el diagnóstico de una SCID, podrían evitarse diagnosticando el paciente afectado al nacer mediante el procedimiento descrito en este documento.

[0017] Un objeto adicional de la invención es un kit según se define en las reivindicaciones. Los kits son útiles para preparar muestras para la detección y/o la medición (mediante el uso de espectrometría de masas en tándem) de Adenosina y Desoxiadenosina junto con otros múltiples analitos (por ejemplo, otras purinas y pirimidinas, aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitina) en una muestra de sangre seca.

Breve descripción de los dibujos

[0018]

La Fig. 1 muestra un barrido de pérdida neutra de m/z 46 en el que se detectan varios aminoácidos en la misma muestra (panel B) y un barrido precursor de m/z 85 en el que se detectan varias acilcarnitinas en la muestra (panel A); en la muestra también había presentes estándares internos, análogos de isótopos pesados estables de Adenosina y Desoxiadenosina (Panel C).

Descripción detallada

[0019] La divulgación presenta procedimientos para la extracción de Adenosina y Desoxiadenosina junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, otras purinas y pirimidinas, aminoácidos, acilcarnitinas y carnitina libre) de la muestra en una única etapa, de forma que las concentraciones de Adenosina y Desoxiadenosina y de uno o más analitos adicionales (por ejemplo, otras purinas y pirimidinas, aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitinas) en el extracto reflejen sus respectivas concentraciones en la muestra.

[0020] Después de la extracción, la presencia o la cantidad de Adenosina y Desoxiadenosina puede ser determinada junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos) mediante el uso de espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas en tándem).

[0021] El procedimiento puede incluir poner en contacto una muestra con una disolución de extracción que contiene un monoalcohol C 1-3 de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metanol, etanol, propanol o isopropanol) y agua.

[0022] La Adenosina y la Desoxiadenosina no son solubles en alcohol absoluto ni en una disolución que contenga menos de un 10 % de agua. Para extraer (liberar) la Adenosina y la Desoxiadenosina junto con uno o más analitos adicionales de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica tal como una mancha de sangre) en una única etapa, la muestra puede ponerse en contacto con una disolución de extracción que contiene un monoalcohol C 1-3 de cadena lineal o ramificada (por ejemplo, metanol, etanol, propanol o isopropanol) con al menos un 10 % de agua.

[0023] Preferiblemente, el procedimiento de la invención se realiza añadiendo la disolución de extracción en dos etapas: en la primera etapa se pone en contacto la muestra con un monoalcohol C 1 -3 de cadena lineal o ramificada que se corresponde con el 100-x % v/v del volumen final; en la siguiente segunda etapa se añade a la muestra agua, que se corresponde con el x % v/v del volumen final v/v; en el que x es el porcentaje de agua en v/v, que varía desde el 10 hasta el 90 %. Preferiblemente, la disolución de extracción contiene un 30 - 50 % v/v de agua; más preferiblemente, la mejor condición analítica se obtiene cuando una disolución de extracción contiene un 60 % de metanol y un 40 % de agua. Además, se obtiene el máximo rendimiento para la extracción de Adenosina y de Desoxiadenosina cuando la adición de la disolución de extracción se realiza en las dos siguientes etapas: en la primera etapa se pone en contacto la muestra con metanol que se corresponde con un 60 % v/v del volumen final. En la siguiente segunda etapa se añade a la muestra agua que se corresponde con un 40 % v/v del volumen final. La primera etapa fijaba proteínas, péptidos y hemoglobina a la celulosa de la tarjeta de Guthrie, reduciendo sistemáticamente su extracción. Las proteínas, los péptidos y la hemoglobina podían ser una interferencia relevante en el análisis por espectroscopia de masas. El procedimiento también puede incluir poner en contacto la muestra directamente con una disolución de extracción que contiene metanol y agua al 60/40 v/v. Pero en este caso la concentración de agua debe ser tal que la disolución de extracción reconstituya algunas de las proteínas y los péptidos, mientras que al mismo tiempo disuelva otros analitos (por ejemplo, Adenosina,

[0024] Desoxiadenosina, acilcarnitinas, carnitina libre y aminoácidos) presentes en la muestra. La disolución de extracción también puede contener un ácido orgánico, tal como ácido acético y/o fórmico, a una concentración de 1 - 5 mM (preferiblemente de 2,5 - 3,5 mM).

[0025] La disolución de extracción también puede contener, opcionalmente, uno o más estándares internos para, por ejemplo, aminoácidos, carnitina libre, acilcarnitinas y Adenosina y Desoxiadenosina, a unas concentraciones conocidas.

[0026] La mezcla de muestra puede incubarse entonces durante un periodo predeterminado de tiempo de al menos 15 minutos (y preferiblemente de no más de 120 minutos) para permitir la extracción de aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitinas, así como la extracción de Adenosina y Desoxiadenosina.

[0027] Entonces el extracto puede ser transferido a un pocillo sin usar de una placa de microtitulación, y después las muestras se analizan mediante espectrometría de masas en tándem, opcionalmente con la ayuda de un dispositivo de manipulación de líquidos para la inyección de la muestra.

[0028] Entonces se establecen los ajustes instrumentales en el espectrómetro de masas en tándem para detectar los respectivos metabolitos de interés (aminoácidos, acilcarnitinas, carnitina libre y Adenosina y Desoxiadenosina), así como sus correspondientes estándares internos de forma múltiple.

[0029] Los analitos adicionales que pueden ser detectados y/o medidos junto con Adenosina y Desoxiadenosina incluyen, por ejemplo, alanina, arginina, citrulina, glicina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, tirosina, valina, y acilcarnitinas tales como libre, Acetilo, Acrililo, Propionilo, Butirilo, Tiglilo, Isovalerilo, 3-OH-butirilo, Hexenoílo, Hexanoílo, 3-OH-Isovalerilo, Heptanoílo, Octenoílo, Octanoílo, Nonanoílo, Malonilo, Decatrienoílo, Decadienoílo, Decenoílo, Decanoílo, Metilmalonilo, Glutarilo, 3-OH-Decanoílo, Dodecenoílo, Dodecanoílo, Deshiroadipilo, Adipilo, 3-OH-Dodecanoílo, Tetradecadienoílo, Tetradecenoílo, Miristoílo, Deshidrosuberilo, Suberilo, 3-OH-Tetradecanoílo, Hexadecenoílo, Palmitoílo, Deshidrosabacilo, Sebacilo, 3-OH-Hexadecanoílo, Linoleílo, Oleílo, Estearoílo. Otras purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a, Uracilo, Citosina, Timina, Adenina, Guanina, Uridina, Citidina, Timidina, Guanosina, Hipoxantina, Desoxiguanosina, Desoxiinosina, Desoxiuridina, 5-OH-Me-uracilo, AICAR (Aminoimidazol-4-carboxamida ribótido), Dihidrouracilo, p-Alanina, Inosina, ácido Úrico, ácido Orótico, ácido p-Aminoisobutírico, Dihidrotimina, Ureidopropionato, Xantina, SAICAr (Succinil-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido) y Succinil-adenosina.

Espectrometría de masas

[0030] La espectrometría de masas en tándem puede usarse para detectar y/o medir Adenosina y Desoxiadenosina y uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos) en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica). En la espectrometría de masas en tándem se conectan en serie dos analizadores de masas a través de una célula de colisión. El primer analizador de masas (primer cuadrupolo) se usa para seleccionar un ión de interés (por ejemplo, un ión con una proporción entre masa y carga en particular (m/z)). Los iones seleccionados se transfieren entonces a una célula de colisión donde son fragmentados mediante colisiones con un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o helio o argón). Este proceso se denomina disociación activada por colisión (CAD) y se realiza en la célula de colisión del espectrómetro de masas. Una vez que los iones precursores se han fragmentado, se usa el segundo analizador de masas (tercer cuadrupolo) bien para barrer y detectar todos los iones producto producidos, o bien para seleccionar y detectar fragmentos de iones en particular.

[0031] Según se detalla en los Ejemplos anexos, se usó la espectrometría de masas en tándem para ionizar las moléculas precursoras de Adenosina y Desoxiadenosina y varios aminoácidos, fragmentar los iones y detectar picos específicos que son indicativos de la presencia de estas moléculas en la muestra. La detección mediante espectrometría de masas en tándem puede llevarse a cabo de varias formas. En un tipo de espectrometría de masas en tándem (realizada habitualmente con espectrómetros de masas en tándem de cuadrupolo triple) los iones que se fragmentan para producir los iones (fragmento) productos habituales pueden ser detectados como una clase mediante la realización de un "barrido de iones precursores", en el que mediante la selección de una masa apropiada para la fragmentación habitual en la célula de colisión, todos los iones que producen los iones fragmento comunes son detectados. Este tipo de barrido se puede usar para detectar las acilcarnitinas en una muestra (y a un precursor de barrido de m/z 85). En una forma diferente de la espectrometría de masas en tándem, los iones que se fragmentan para producir una pérdida neutra común pueden ser detectados como una clase mediante la realización del denominado barrido de pérdida neutra, en el que, estableciendo una compensación de masa apropiada igual a la pérdida neutra común entre el primer y el tercer cuadrupolo, todos los iones que se fragmentan para producir la pérdida neutra especificada son detectados. Este tipo de barrido se realiza para detectar aminoácidos en una muestra (pérdida neutra de m/z 46 si los analitos de la muestra extraída eran ésteres no butilados). La Fig. 1 muestra un barrido de pérdida neutra de m/z 46 en el que se detectaron varios aminoácidos procedentes de la misma muestra y un barrido precursor de m/z 85 en el que se detectaron varias acilcarnitinas en la muestra. En otro tipo más de espectrometría de masas en tándem, conocido como monitorización de reacción múltiple (MRM), se selecciona un ión precursor de interés en el primer cuadrupolo, se fragmenta en la célula de colisión y se selecciona un ión fragmento específico resultante de la activación por colisión en el tercer cuadrupolo, y finalmente se detecta.

[0032] El primer y el tercer cuadrupolo se fijan para que seleccionen respectivamente los correspondientes pares de iones precursores y fragmentos de interés para una cantidad predeterminada de tiempo (unos pocos milisegundos). Si se requiere la detección de analitos adicionales, pueden introducirse transiciones de detección adicionales en el experimento. Los datos de todas las transiciones de masas seleccionadas pueden ser adquiridos secuencialmente para obtener la información deseada. La detección y la cuantificación de Adenosina y de Desoxiadenosina en una mezcla pueden obtenerse empleando la transición de masa específica para cada uno de estos compuestos como sigue: para la Adenosina: primer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión precursor a m/z 268, tercer cuadrupolo fijado para seleccionar y trasmitir el ión producto específico a m/z 136 (transición 1 de MRM); para la Desoxiadenosina: primer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión precursor a m/z 252, tercer cuadrupolo fijado para seleccionar y trasmitir el ión producto específico a m/z 136 (transición 2 de MRM). Estas dos transiciones de MRM pueden ser medidas secuencialmente a partir de la misma muestra durante una cantidad predeterminada de tiempo para detectar la presencia y/o la concentración de una mezcla de estos compuestos en dicha muestra.

[0033] A la muestra se pueden añadir estándares internos estables de isótopos marcados para Adenosina y, mediante lo que puede llevarse a cabo la cuantificación de Adenosina y de Desoxiadenosina, y por lo tanto de las propias Adenosina y Desoxiadenosina. Dichos marcajes de Adenosina y Desoxiadenosina derivatizadas con isótopos estables da como resultado un desplazamiento de la masa, mientras se conservan unas propiedades fisicoquímicas muy similares entre los compuestos marcados y no marcados. Generalmente se pueden añadir uno o más estándares internos a una concentración conocida a una muestra para permitir la cuantificación del analito de

interés (por ejemplo, Adenosina y Desoxiadenosina). Por ejemplo, para una muestra analizada mediante el uso de espectrometría de masas en tándem, se puede usar la proporción entre las señales producidas por la Adenosina y la Desoxiadenosina y su correspondiente estándar interno para determinar las cantidades de este compuesto en la muestra. El estándar interno también puede añadirse para distinguir las moléculas naturales (endógenas). Al igual que anteriormente, los estándares internos pueden prepararse en una disolución de extracción antes de mezclar una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre) con la disolución de extracción. Alternativamente, los estándares internos pueden añadirse a la mezcla en cualquier etapa de la preparación de la muestra que asegure que estos estándares internos no serán eliminados de la mezcla durante el procesado de la muestra (por ejemplo, después de una extracción líquido-líquido o de una extracción en fase sólida). Los estándares internos para un analito de interés (u otras moléculas, por ejemplo, las biomoléculas descritas en este documento) detectados por un procedimiento descrito en este documento pueden ser cualquier modificación o análogo de esa molécula analito que sea detectable mediante espectrometría de masas. Un estándar interno es detectable por separado de la molécula gracias a sus características físicas únicas, tales como una masa o una proporción entre masa y carga únicas. Un estándar interno usado habitualmente en espectrometría de masas es una forma estable marcada isotópicamente o un derivado químico de un analito de interés (por ejemplo, si el analito es Adenosina y Desoxiadenosina, el estándar interno puede ser Adenosina y Desoxiadenosina marcadas isotópicamente). Lo mismo para los analitos adicionales descritos en este documento y referidos como aminoácidos y acilcarnitinas. Por ejemplo, pueden usarse análogos marcados con isótopos estables para cuantificar el correspondiente analito de interés mediante el uso de la técnica conocida como espectrometría de masas por dilución de isótopos, en la que el analito y los estándares internos son procesados en la misma muestra. Los estándares internos pueden ser diseñados de forma que 1) el marcaje provoque un desplazamiento en la masa de al menos 1 unidad de masa, y 2) ninguno de los marcadores del isótopo estable estén ubicados en sitios lábiles, para evitar un intercambio. Los marcadores pueden ser ^{2}H (D), ^{15}N, ^{13}C u ^{18}O en cualquier combinación. La ubicación real de los marcadores en la molécula puede variar siempre que se cumpla el prerrequisito 2 (anterior). Además, también se puede usar la posición de los marcadores y el potencial cambio en la masa de los iones fragmento para confirmar la separación entre el estándar interno y los analitos. Algunos ejemplos de potenciales estándares internos útiles en los procedimientos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, un marcaje isotópico de: Adenosina y Desoxiadenosina (por ejemplo, Ribosina-1-^{13}C-Adenosina y $^{13}C_5$ Desoxiadenosina), carnitina, acilcarnitina o un aminoácido (por ejemplo, fenilalanina, citrulina, ácido glutámico). La detección del estándar interno marcado específico en una mezcla puede obtenerse empleando la transición de masa específica para cada uno de estos compuestos como sigue: para Ribosina-1-^{13}C-Adenosina: primer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión precursor a m/z 269, tercer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión producto específico a m/z 136 (transición 3 de MRM); para $^{13}C_5$ Desoxiadenosina: primer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión precursor a m/z 257, tercer cuadrupolo fijado para seleccionar y transmitir el ión producto específico a m/z 136 (transición 4 de MRM).

Muestras

[0034] Las muestras adecuadas para los procedimientos descritos en este documento incluyen sangre seca absorbida sobre un papel o un sustrato polimérico.

Validación del procedimiento

[0035] Se han obtenido tres pares de manchas de sangre seca (tarjetas de Guthrie) a partir de tres pacientes con SCID-ADA procedentes de aquellas almacenadas en el Neonatal Screening Center de la región de Tuscany. Todos los pacientes habían sido diagnosticados en el primer año de vida mediante el uso de procedimientos convencionales con orina o con muestras sanguíneas obtenidas mediante punción venosa. El diagnóstico fue confirmado mediante el uso de un análisis genético del ADN. Todos los padres de los 3 pacientes resultaron ser portadores de la mutación génica asociada con la SCID-ADA.

[0036] El procedimiento descrito en la presente invención permitió la detección de metabolitos tóxicos de la ADA en los 3 casos, con un análisis cuantitativo. Los niveles de los metabolitos tóxicos eran 10.000 - 30.000 veces mayores que los niveles encontrados en sujetos normales. El procedimiento también se aplicó a 5.000 manchas de sangre seca procedentes de sujetos sanos. En ninguna de ellas se encontró un aumento en el nivel de metabolitos tóxicos de la ADA. En resumen, los resultados obtenidos con el procedimiento de la invención demostraron que la SCID-ADA puede ser diagnosticada con la mayor sensibilidad (100 %) y especificidad (100 %) a partir de manchas de sangre seca tomadas al nacer a través de un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple con una fuente TurbolonSpray.

[0037] Por lo tanto, la tecnología descrita en este documento es aplicable al cribado, el diagnóstico, el pronóstico, la terapia de monitorización y de cumplimiento, y a cualquier otra aplicación en la que es útil la determinación de la presencia o de la cantidad de conjuntos de dos o más biomoléculas, tales como Adenosina y Desoxiadenosina y una o más de un aminoácido, carnitina libre o una acilcarnitina.

Kits

[0038] En este documento también se proporcionan kits según se definen en las reivindicaciones, útiles para la

preparación de las muestras para la detección y/o la medición (mediante el uso de espectrometría de masas en tándem) de Adenosina y Desoxiadenosina junto con otros múltiples analitos (por ejemplo, otras purinas y pirimidinas, aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitina) en una muestra de sangre seca. Los kits incluyen uno o más estándares internos y/o controles para su uso en el subsiguiente análisis por espectrometría de masas según se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, los kits pueden incluir Adenosina y Desoxiadenosina como control y una forma derivatizada (por ejemplo, marcada con un isótopo) de Ribosina-1-^{13}C-Adenosina y de $^{13}C_5$ Desoxiadenosina) marcada como un estándar interno. La Adenosina y la Desoxiadenosina y/o la Adenosina y la Desoxiadenosina derivatizadas pueden proporcionarse cada una en el kit en forma líquida o seca (por ejemplo, liofilizada). La Adenosina y la Desoxiadenosina pueden proporcionarse en una cantidad de 0,1 - 5 mmol. Los kits pueden incluir Adenosina y Desoxiadenosina en un recipiente que contiene uno o más controles o estándares internos adicionales. Por ejemplo, el kit puede incluir un recipiente con un control de Adenosina y la Desoxiadenosina, uno o más controles de aminoácidos y uno o más controles de carnitina (por ejemplo, carnitina libre y acilcarnitinas).

[0039] Una o más de las disoluciones contenidas en el kit pueden almacenarse, por ejemplo, en viales de vidrio silanizado. Uno o más de los componentes del kit puede almacenarse en un recipiente que evite o minimice la pérdida de material o la evaporación de disolvente. Por ejemplo, el recipiente puede estar precintado con un tapón.

[0040] Los kits pueden incluir, por ejemplo, manchas de sangre seca útiles como control. Por ejemplo, la mancha de sangre seca puede estar enriquecida con uno o más analitos (por ejemplo, uno o más analitos a unas concentraciones conocidas) tales como Adenosina y Desoxiadenosina, uno o más aminoácidos, carnitina libre o una o más acilcarnitinas.

[0041] Los kits también pueden incluir, opcionalmente, una disolución de extracción tal como cualquiera de las disoluciones de extracción descritas en este documento. La disolución de extracción puede contener un monoalcohol C 1-3 lineal o ramificado con al menos un 25 % de agua. Los kits también pueden incluir una o más disoluciones disolvente que contienen, por ejemplo, acetonitrilo o isopropanol. Las disoluciones disolvente también pueden contener agua, por ejemplo, una disolución disolvente contiene un 80 % de acetonitrilo y un 20 % de agua.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Ejemplos

Ejemplo 1

[0042] Se prepararon manchas de sangre estándar de referencia (sangre completa) mediante el uso de sangre completa agrupada obtenida a partir de 5 sujetos. La sangre fue procesada mediante el ajuste de la concentración de hemoglobina a 17 mg/dl y la adición de Adenosina y Desoxiadenosina a la sangre a unas concentraciones conocidas. La sangre procesada fue dispensada en tarjetas de papel de filtro para formar manchas de sangre sobre la matriz de papel de filtro. Cada mancha de sangre fue generada mediante la dispensación de 25 µl de sangre procesada. Las manchas de sangre se dejaron secar durante una noche.

[0043] Se perforó un pequeño disco de 3,2 mm de una mancha de sangre seca y se depositó en un pocillo de una placa de micropocillos. La muestra se extrajo dispensando 200 µl de una disolución de extracción que consistía en una mezcla de metanol y agua a una proporción volumétrica relativa aproximada de un 60 % de metanol y un 40 % de agua. También había presentes estándares internos, análogos de isótopos pesados estables de Adenosina y Desoxiadenosina en la disolución de extracción. Los estándares internos incluidos en la disolución están indicados en el barrido de la espectrometría de masas en tándem mostrado en la Fig. 1.

Ejemplo 2.

[0044] Se prepararon manchas de sangre estándar de referencia (sangre completa) mediante el uso de sangre completa agrupada obtenida a partir de 5 sujetos. La sangre fue procesada mediante el ajuste de la concentración de hemoglobina a 17 mg/dl y la adición a la sangre de varios aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas y Adenosina y Desoxiadenosina a unas concentraciones conocidas. La sangre procesada fue dispensada en tarjetas de papel de filtro para formar manchas de sangre sobre la matriz de papel de filtro. Cada mancha de sangre fue generada mediante la dispensación de 25 µl de sangre procesada. Las manchas de sangre se dejaron secar durante una noche.

[0045] Se perforó un pequeño disco de 3,2 mm de una mancha de sangre seca y se depositó en un pocillo de una placa de micropocillos. La muestra se extrajo dispensando 200 µl de una disolución de extracción que consistía en una mezcla de metanol y agua a una proporción volumétrica relativa aproximada de un 60 % de metanol y un 40 % de agua. También había presentes estándares internos (análogos de isótopos pesados estables de los analitos de interés) para diversos aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas y Adenosina y Desoxiadenosina en la disolución de extracción. La muestra extraída se inyectó en un espectrómetro de masas en tándem con cuadrupolo de electronebulización triple con la ayuda de un dispositivo de manipulación de líquidos automatizado. Los datos de los espectros de masas de los aminoácidos se adquirieron mediante un barrido de pérdida neutra de 46 Da. Los datos

de los espectros de masas para la Adenosina y Desoxiadenosina se adquirieron mediante una monitorización de reacción múltiple. La definición de cada uno de los analitos puede encontrarse en la Tabla 1). El porcentaje de recuperación de cada analito se determinó mediante la comparación con un estándar interno para cada analito.

[0046] La imprecisión del ensayo se determinó analizando las muestras descritas en la tabla 1. Cada análisis de la muestra consistió en funciones por sextuplicado de cada muestra, que fueron procesadas y medidas según se describe en el Ejemplo 2. El estudio incluía seis de dichos análisis al día durante un total de seis días. Con esta información se determinaron los siguientes componentes de imprecisión: en el análisis, entre análisis en el día y entre días, a partir de lo que se determinó la imprecisión total. Los resultados de los análisis de imprecisión de Adenosina y Desoxiadenosina se muestran en la Tabla 2.

[0047] Estos datos demuestran que los procedimientos descritos en este documento se pueden usar para extraer y cuantificar simultáneamente Adenosina y Desoxiadenosina, aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas, mediante el uso de espectrometría de masas en tándem.

Tabla 1

Nombre del compuesto	Símbolo	$[M + H]^+$	Masa butilada
Purinas			
Adenosina	Ado	268,2	
Desoxiadenosina	D-Ado	252,2	
Aminoácidos			
Alanina	Ala	90,0	146,1
Aloisoleucina	Allo-Ile	132,1	188,2
Arginina	Arg	175,1	231,2
Ácido argininosuccínico	Asa	291,1	459,3
Asparagina	Asn	133,1	189,1
Ácido aspártico	Asp	134,0	246,2
beta-Alanina		90,0	146,1
Citrulina	Cit	176,1	232,2
Ácido glutámico	Glu	148,1	260,2
Glutamina	Gin	147,1	203,1
Glicina	Gly	76,0	132,1
Histidina	His	156,1	212,1
Hidroxiprolina	HO-Pro	132,1	188,1
Isoleucina	Ile	132,1	188,2
Leucina	Leu	132,1	188,2
Lisina	Lys	147,1	203,2
Metionina	Met	150,1	206,1
Ornitina	Orn	133,1	189,2
Fenilalanina	Phe	166,1	222,2
Prolina	Pro	116,1	172,1
Ácido piroglutámico		130,0	186,1
Tirosina	Tyr	182,1	238,1
Valina	Val	118,1	174,2

Aminoácidos			
Succinilacetona	SA	155,1	211,2
Ácido formiminoglutámico	Figlu	231,2	287,2
Homocitrulina	Hcit	190,1	246,2
Hawkinsina	Hawk	348,3	404,4
Ácido deltaaminolevulínico	D-AL	122,1	188,1
Acilcarnitinas			
Libre	CO	162,1	218,2
Acetil	C2	204,1	260,2
Acrilil	C3:1	216,1	272,2
Propionil	C3	218,1	274,2
Butiril	C4	232,2	288,2
Tiglil	C5:1	244,2	300,2
Isovaleril	C5	246,2	302,2
3-OH-butiril	C4-OH	248,1	304,2
Hexenoil	C6:1	258,2	314,2
Hexanoil	C6	260,2	316,3
3-OH-Isovaleril	C5-OH	262,2	318,2
Heptanoil	C7	274,2	330,3
Octenoil	C8:1	286,2	342,3
Octanoil	C8	288,2	344,3
Nonanoil	C9	302,2	358,3
Malonil	C3DC	248,1	360,2
Decatrienoil	C10:3	310,2	366,3
Decadienoil	C10:2	312,2	368,3
Decenoil	C10:1	314,2	370,3
Decanoil	C10	316,2	372,3
Metilmalonil	C4DC	262,1	374,3
Glutaril	C5DC	276,1	388,3
3-OH-Decanoil	C10-OH	332,2	388,3
Dodecenoil	C12:1	342,3	398,3
Dodecanoil	C12	344,3	400,3
Deshiroadipil	C6:1 DC	288,1	400,3
Adipil	C6DC	290,2	402,3
3-OH-Dodecanoil	C12-OH	360,3	416,3
Tetradecadienoil	C14:2	368,3	424,3
Tetradecenoil	C14:1	370,3	426,4

Miristoil	C14	372,3	428,4
Deshidrosuberil	C8:1 DC	316,2	428,3
Suberil	C8DC	318,2	430,3
3-OH-Tetradecanoil	C14-OH	388,3	444,4
Hexadecenoil	C16:1	398,3	454,4
Palmitoil	C16	400,3	456,4
Deshidrosebacil	C10:1DC	344,2	456,3
Sebacil	C10DC	346,2	458,4
3-OH-Hexadecanoil	C16-OH	416,3	472,4
Linoleil	C18:2	424,3	480,4
Oleil	C18:1	426,4	482,4
Estearoil	C18	428,4	484,4

Tabla 2

Metabolito investigado	**Adición nmoles/l**	**Precisión intradía (n = 6) %**	**Precisión interdía (n = 6) %**		**Lecturas promediadas µMoles/l**	**Precisión n = 6**
Adenosina	0	0	0,0		0,0	
Adenosina	33	3,5	3,1		34,0	103,1
Adenosina	165	4,9	3,7		158,0	95,8
Adenosina	330	7,8	6,0		336,2	101,9
Adenosina	3300	3,8	4,8		3299,7	100,0
Adenosina	6600	2,1	2,6		6594,2	99,9
Adenosina	9900	2,3	2,0		9899,9	100,0
Desoxiadenosina	0	0	0,0		0,0	
Desoxiadenosina	33	19,6	16,9		32,8	92,9
Desoxiadenosina	165	6,6	4,8		169,6	100,3
Desoxiadenosina	330	5,2	3,6		325,4	100,6
Desoxiadenosina	3300	5,6	6,7		3300,2	100,3
Desoxiadenosina	6600	3,4	3,4		6599,2	100,0
Desoxiadenosina	9900	3,1	3,1		9904,9	100,0

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la determinación analítica, mediante EM, de Adenosina y Desoxiadenosina a partir de una muestra de sangre seca, comprendiendo dicho procedimiento la extracción de Adenosina y Desoxiadenosina en unas condiciones que permiten la extracción simultánea de otros metabolitos tales como aminoácidos, carnitina libre o acilcarnitinas, estando dicho procedimiento **caracterizado por** el uso de una mezcla de extracción que comprende una mezcla de agua y un monoalcohol C1-3 de cadena lineal o ramificada en el que el agua está presente al menos al 10 % v/v.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que se realiza añadiendo la mezcla de extracción en dos etapas: en la primera etapa se pone en contacto la muestra con el monoalcohol C 1-3 de cadena lineal o ramificada que se corresponde con el 100-x % v/v del volumen final; en la siguiente segunda etapa se añade a la muestra agua, que se corresponde con el x % v/v del volumen final; donde x es el porcentaje de agua en v/v que varía desde el 10 hasta el 90 %.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho monoalcohol es metanol.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en el que dicha mezcla de extracción contiene un 30 - 50 % v/v de agua.

5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4 en el que la mezcla de extracción contiene un 60 % v/v de metanol y un 40 % v/v de agua.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 en el que la disolución de extracción también contiene un ácido orgánico a una concentración de 1 - 5 mM.

7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6 en el que la mezcla de extracción contiene uno o más estándares internos, por ejemplo, para aminoácidos, carnitina libre, acilcarnitinas y Adenosina y Desoxiadenosina, a unas concentraciones conocidas.

8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 en el que después de la extracción puede determinarse la presencia o la cantidad de Adenosina y Desoxiadenosina junto con uno o más analitos adicionales (por ejemplo, carnitina libre, acilcarnitinas y aminoácidos) mediante el uso de espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas en tándem).

9. Un kit adecuado para el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 para la preparación de muestras para la detección y/o la medición, mediante el uso de espectrometría de masas en tándem, de Adenosina y Desoxiadenosina junto con otros múltiples analitos en una muestra de sangre seca; comprendiendo dicho kit:

- al menos un recipiente que contiene como control Adenosina y Desoxiadenosina y uno o más aminoácidos, carnitina libre, o una o más acilcarnitinas o más analitos como controles adicionales o estándares internos;
- al menos un recipiente que contiene una mezcla de extracción que comprende una mezcla de agua y un monoalcohol C1-3 de cadena lineal o ramificada en el que el agua está presente al menos al 10 % v/v.

10. Kit de acuerdo con la reivindicación 9 en el que hay comprendida adicionalmente al menos una mancha de sangre seca útil como control, en el que dicha mancha de sangre seca está enriquecida con Adenosina y Desoxiadenosina, uno o más aminoácidos, carnitina libre o una o más acilcarnitinas o más analitos, a unas concentraciones conocidas.

11. Un procedimiento para el diagnóstico de la SCID a partir de manchas de sangre seca, preferiblemente en tarjetas de Guthrie obtenidas en el II - IV día de vida, o para monitorizar la eficacia de la terapia durante una terapia de sustitución enzimática, comprendiendo dicho procedimiento el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 o el uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 9.

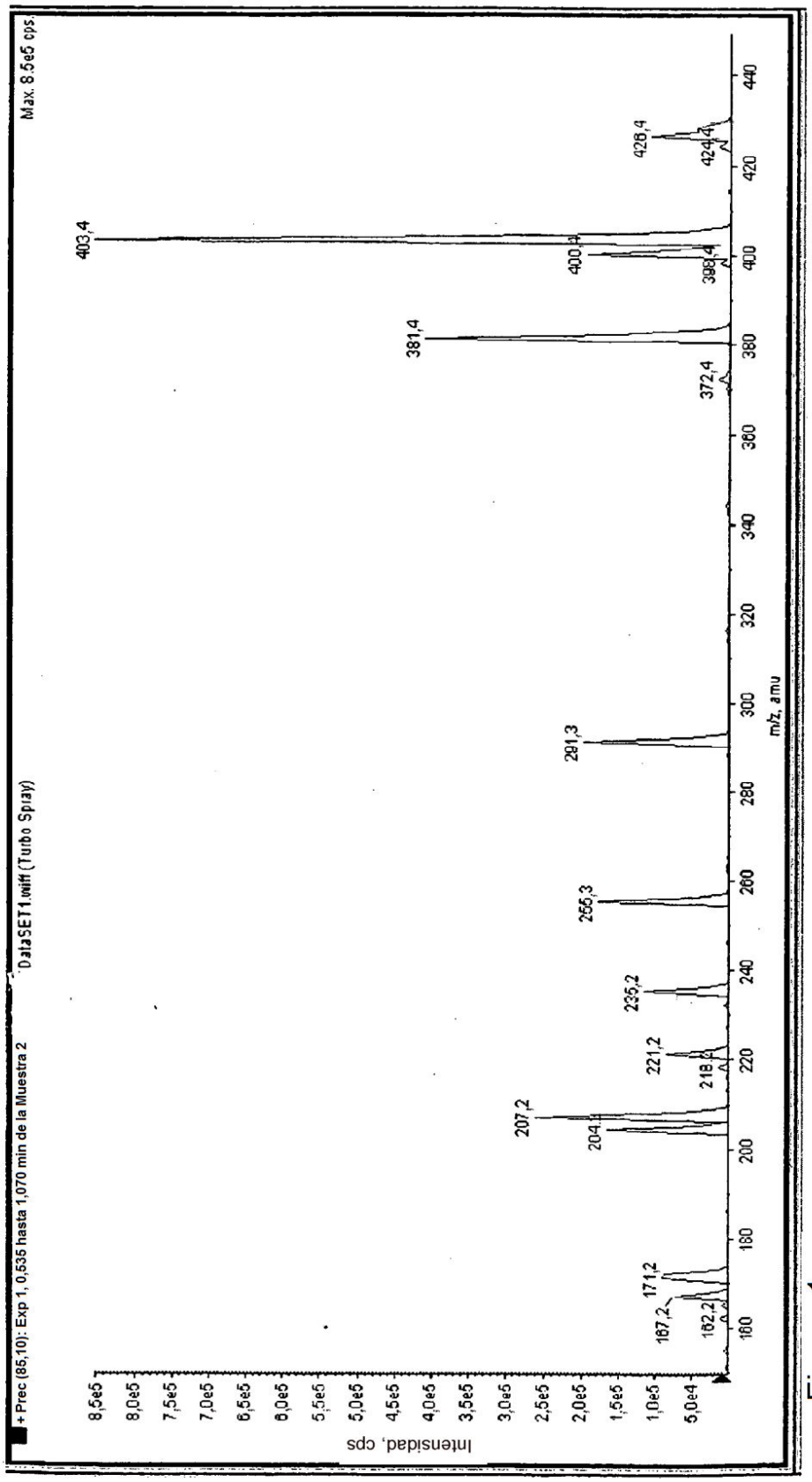
+ Prec (85,10): Exp 1, 0,535 hasta 1,070 min de la Muestra 2
DataSET1.wiff (Turbo Spray)
Max. 8.5e5 cps.
Intensidad, cps
m/z, amu
403,4
381,4
291,3
255,3
235,2
221,2
207,2
204,1
218,1
171,2
187,2
162,2
372,4
400,3
398,4
426,4
424,4

Figura 1a

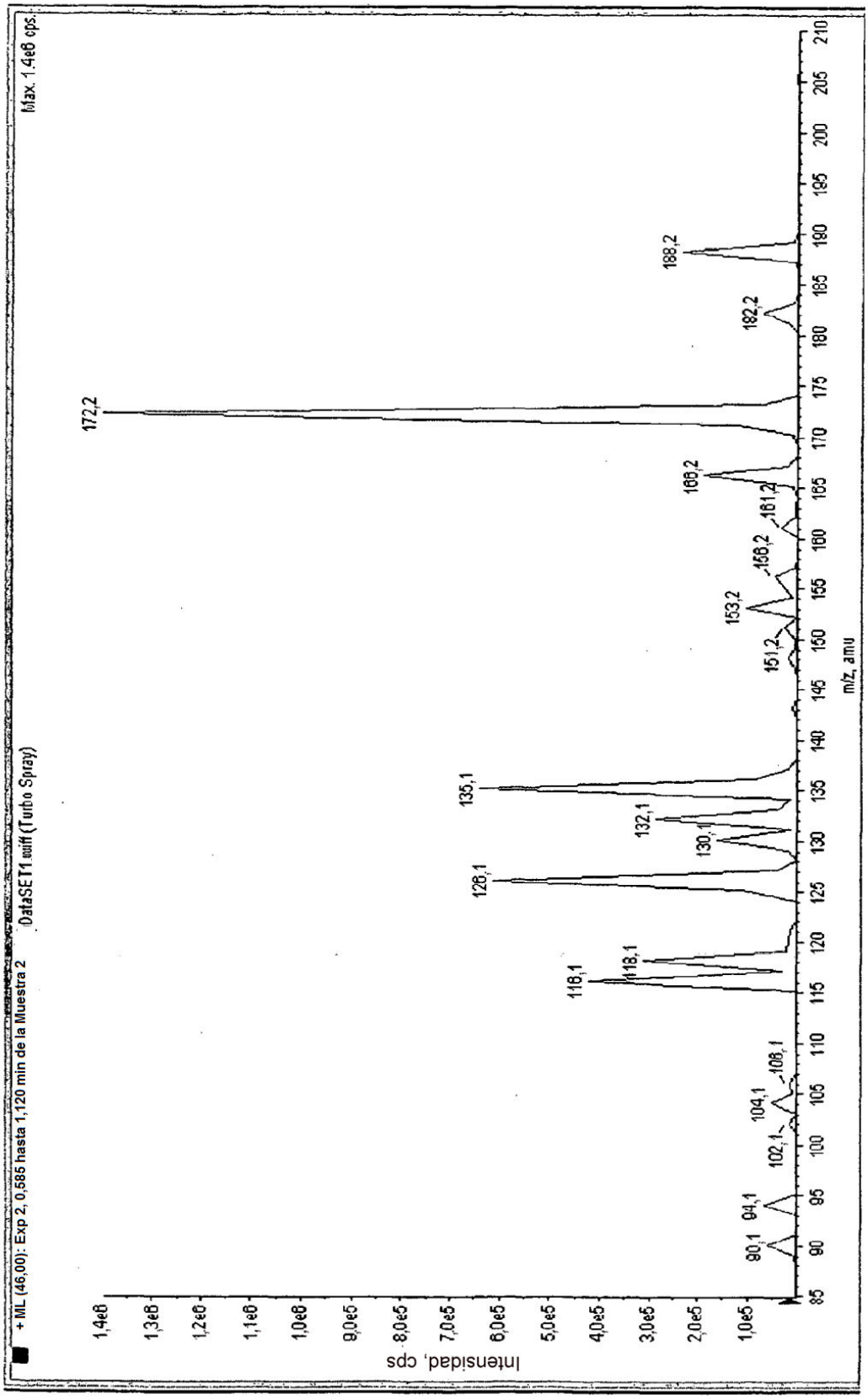
+ ML (46,00): Exp 2, 0,585 hasta 1,120 min de la Muestra 2
DataSET1.wiff (Turbo Spray)
Max. 1.4e8 cps.
Intensidad, cps
m/z, amu
172,2
188,2
182,2
166,2
181,2
158,2
153,2
151,2
135,1
132,1
130,1
128,1
118,1
118,1
108,1
104,1
102,1
94,1
90,1

Figura 1b

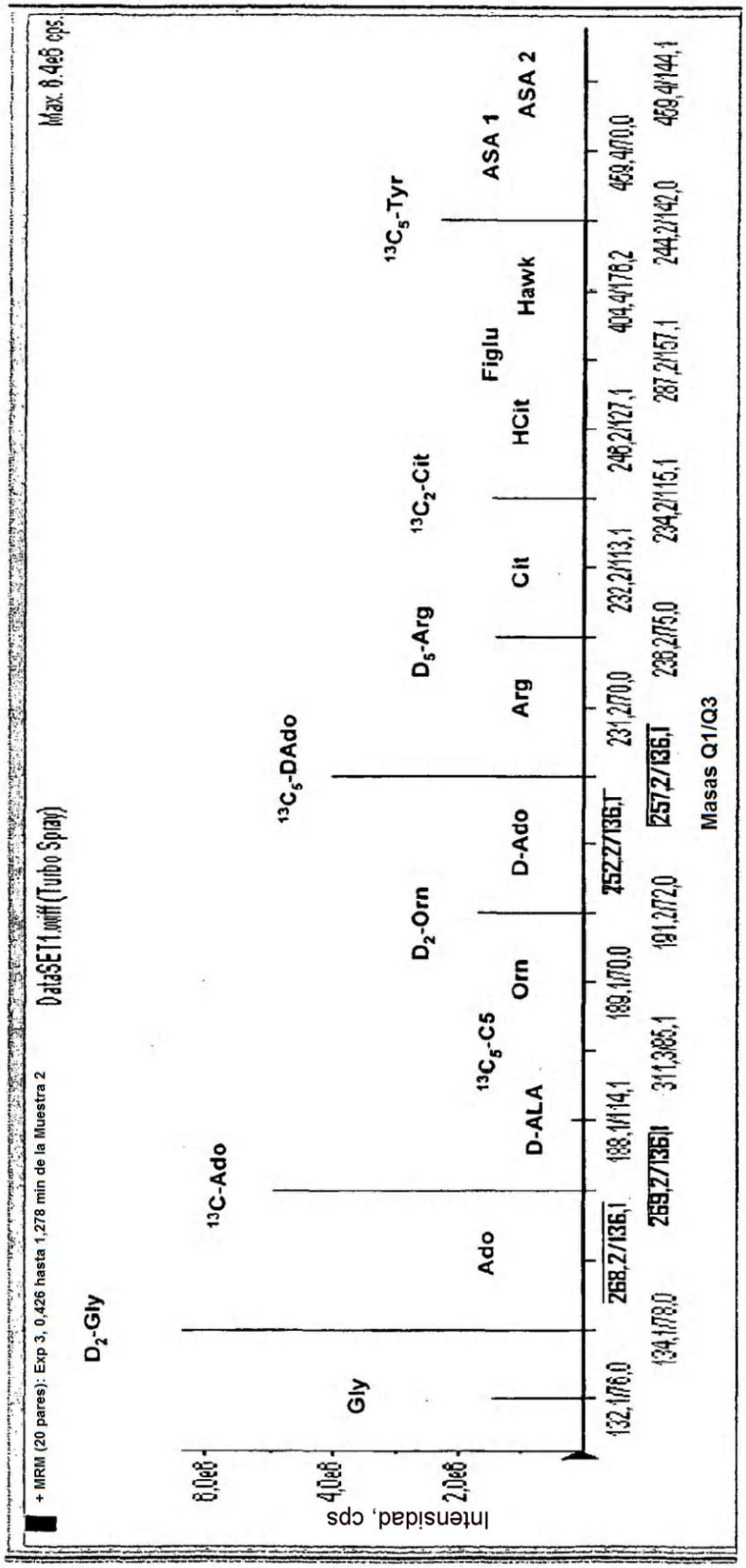
+ MRM (20 pares): Exp 3, 0,426 hasta 1,278 min de la Muestra 2
DataSET1.wiff (Turbo Spray)
Max. 8.4e6 cps.
Intensidad, cps
8,0e6
4,0e6
2,0e6
D2-Gly
Gly
13C-Ado
Ado
13C5-C5
D-ALA
Orn
D2-Orn
13C5-DAdo
D-Ado
D5-Arg
Arg
13C2-Cit
Cit
13C5-Tyr
HCit
Figlu
Hawk
ASA 1
ASA 2
132,1/76,0
134,1/78,0
268,2/136,1
269,2/136,1
188,1/114,1
311,3/85,1
189,1/70,0
191,2/72,0
252,2/136,1
257,2/136,1
231,2/70,0
238,2/75,0
232,2/113,1
234,2/115,1
246,2/127,1
287,2/157,1
404,4/176,2
244,2/142,0
459,4/70,0
459,4/144,1
Masas Q1/Q3

Figura 1c