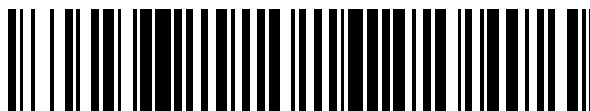


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 025**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

H01J 49/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G06F 19/28 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006 E 06754631 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1897014**

54 Título: **Aparato de análisis de un perfil de metabolitos**

30 Prioridad:

30.06.2005 US 694984 P

30.06.2005 US 694983 P

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

31.03.2014

73 Titular/es:

**BIOCRATES LIFE SCIENCES AG (100.0%)
INNRAIN 66
6020 INNSBRUCK, AT**

72 Inventor/es:

**RAMSAY, STEVEN LEWIS;
STÖGGL, WOLFGANG MARKUS;
WEINBERGER, KLAUS MICHAEL;
GRABER, ARMIN y
GUGGENBICHLER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 452 025 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

Aparato de análisis de un perfil de metabolitos

La presente invención se refiere a un aparato para analizar un perfil de fármacos y/o a un perfil de metabolitos en una muestra biológica.

5 La metabolómica se define generalmente como el análisis de un sustancia o grupo de sustancias necesario para o que forma parte en un proceso metabólico particular en un organismo humano o animal. También se conoce como análisis metabolómico. La metabolómica es una disciplina en desarrollo que estudia huellas dactilares químicas exclusivas que reflejan cambios metabólicos relacionados con la aparición y progresión de enfermedades. El perfil de metabolitos, un área dentro de la metabolómica, mide moléculas pequeñas o metabolitos, contenidos en una
10 célula, tejido u órgano humano, que intervienen en el metabolismo primario e intermedio. La información bioquímica resultante del análisis de metabolitos revela criterios de valoración funcionales asociados con procesos fisiológicos y patofisiológicos, influenciados tanto por predisposición genética como por factores ambientales, tales como nutrición, ejercicio o medicación (Harrigan, G. G. & Goodacre, R. (2003) *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis*. Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London: Schmidt. C. (2004). *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 732-734; Raudys, S. (2001) *Statistical and neural classifiers*. Springer-Verlag, Londres: Daviss, B. (2005) *The Scientist*, 19, 25-28).

El perfil de metabolitos en combinación con estrategias de prospección de datos tiene la posibilidad de revolucionar el diagnóstico clínico y el desarrollo de fármacos. En particular, las grandes compañías farmacéuticas están bajo presión continua para descubrir nuevas dianas y nuevos compuestos más eficaces e inoocuos, y facilitar el descubrimiento de biomarcadores y fármacos, y generalmente reducir costes de desarrollo farmacéutico. Por lo tanto se basan cada vez más en compañías biotecnológicas para cumplir con este espacio innovador y proyectos futuros. En este contexto, las técnicas de extracción de datos y bioanalíticas innovadoras desempeñarán un papel fundamental en el ahorro de costes reduciendo tiempos de comercialización y tasas de atrición de fármacos.

Recientemente, debido a avances significativos en tecnologías de alto rendimiento, un amplio conjunto del metaboloma humano - una fuente de bioinformación hasta ahora bastante inexplorada - es ahora accesible (Beecher, C. (2003). En Harrigan, G. G., Goodacre, R. (Ed). *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis* (págs. 311-319). Kluwer Academic Publishers, Boston/ Dordrecht/Londong; Dunn, W. B., Bailey, N. J. & Johnson, H. E. (2005) *Analyst*, 130, 606-625). La comparación estadística de perfiles de metabolitos puede dar a conocer modelos multifuncionales que tienen la posibilidad de revolucionar el sistema de asistencia sanitaria capturando específicamente señales de aviso latente de enfermedades inminentes antes de que se presente cualquier síntoma de la enfermedad. La identificación y prevención temprana de las enfermedades, a diferencia de la detección tardía de las enfermedades y de las intervenciones terapéuticas costosas, es probablemente la solución principal para cubrir la asistencia médica en el futuro. Por definición, estos supuestos biomarcadores son "indicadores objetivamente medidos de procesos biológicos normales, de procesos patogénicos o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica, y pretenden sustituir un criterio de valoración clínico (predecir un beneficio o un perjuicio) en base a pruebas epidemiológicas, terapéuticas, patofisiológicas u otras pruebas científicas" (Biomarkers Definitions Working Group. (2001) *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69, 89-95). El interés en el descubrimiento de nuevos biomarcadores se origina a partir de su amplia gama de posibles aplicaciones y del impacto fundamental sobre la dinámica de la industria farmacéutica y principios actuales del sector de asistencia médica. La implementación satisfactoria de biomarcadores en el descubrimiento de fármacos puede reducir el tiempo y el coste de desarrollo de fármacos al mismo tiempo que la aplicación para el diagnóstico molecular mejorará la conformidad del paciente en entornos clínicos y reducirá costes innecesarios resultantes de diagnósticos falsos además de la detección tardía de enfermedades (Stoughton, R. B. & Friend, S. H. (2005) *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4, 345-350; Morris, M., & Watkins, S. M. (2005). *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 407-412; McCandless, S. E. (2004). *Primary Care*, 31, 583-604).

Las tecnologías cualitativas y cuantitativas del perfil de metabolitos comprenden una serie de herramientas analíticas y de procesamiento de datos avanzadas, con el objetivo de utilizar posibles marcadores como resultado de la comparación de componentes de molécula pequeña de sistemas biológicos. Por ejemplo, la espectrometría de masas (EM) en tándem detecta simultáneamente cientos de metabolitos de cantidades microlítricas de muestras biológicas, tales como sangre completa, suero, plasma, orina u otros fluidos corporales de cantidades inapreciables, con alta precisión y sensibilidad (Roschinger, W., Olgemoller, B., Fingerhut, R., Liebl, B. & Roscher, A. A. (2003). *European Journal of Pediatrics*, 162 (Suppl 1), S67-76; Strauss, A. W. (2004). *J Clin Invest* 2004; 113: 354-356; Kaltashov, I. A. & Eyles, S. J. (2005) *Mass spectrometry in biophysics: Conformation and dynamics of biomolecules*. Wiley). La cuantificación se realiza en referencia a una amplia serie de patrones internos apropiados. Sin embargo, se requiere interpretar una cantidad muy grande de datos o resultados.

Por ejemplo, el documento WO 03/005628 describe un procedimiento para generar, examinar, interpretar y analizar una base de datos de metabolitos cuantitativa. Adicionalmente, el documento US 2002/0009740 describe procedimientos para el descubrimiento de fármacos y para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades usando metabolómica. El documento US 6.455.321 describe un procedimiento para interpretar datos de espectrometría de

masas en tándem para diagnóstico clínico. El documento US 6.258.605 describe un procedimiento analítico para identificar acilcarnitina y aminoácidos de muestras de sangre de poblaciones de neonatos.

5 El documento WO 2004/038602 A describe un sistema basado en programación informática automatizada, modular e integrado y un procedimiento para el descubrimiento de fármacos, descubrimiento de biomarcadores y exploración de fármacos y otras diversas aplicaciones, incluyendo proteómica y metabolómica. El sistema proporciona el tratamiento automatizado de datos espectrales sin procesar, estandarización de datos, reducción a datos de forma de modelado y construcción de modelos supervisados y no supervisados, visualización, análisis y predicción. El sistema incorpora herramientas de visualización de datos y permite al usuario realizar prospección de datos visuales, análisis estadísticos y extracción de características. El sistema se integra por completo con otros sistemas de laboratorio informatizados que pueden estar presentes en el laboratorio, incluyendo control de instrumentación y sistemas de almacenamiento de datos sin procesar, sistemas de gestión de información de laboratorio y programación informática externa disponible en el comercio para el análisis estadístico y modelado.

10 El documento US 2004/121305 A1 proporciona procedimientos para generar perfiles y firmas eficaces de molécula pequeña, perfiles y firmas de toxicidad de molécula pequeña y perfiles y firmas de enfermedades de molécula pequeña. Describe procedimientos para determinar en su sujeto la eficacia y/o toxicidad de agentes y fármacos desconocidos y procedimientos para diagnosticar en un sujeto una enfermedad o un trastorno desconocido. Además, describe procedimientos para supervisar el avance o la remisión de una enfermedad o un trastorno en un sujeto sometido a tratamiento y procedimientos para medir la eficacia del tratamiento.

15 El documento US 2002/155587 A1 se refiere a un procedimiento para ensayar una muestra biológica que opera en un sistema de ensayo. El sistema de ensayo comprende un instrumento configurado para adquirir datos de una muestra biológica y un procesador. En la realización del procedimiento para ensayar, el instrumento adquiere datos de la muestra biológica y el procesador compara los datos adquiridos con criterios de datos predefinidos. Sensible a comparar los datos adquiridos con los criterios de datos, el instrumento puede ajustarse y adquirirse otro conjunto de datos. Un espectrómetro de masas adquiere datos de una muestra biológica. Los datos adquiridos se comparan con criterios de espectro predefinido. Sensible a la comparación, el espectrómetro de masas puede dirigirse a volver a muestrear la muestra biológica o pasar a otra muestra.

20 El documento US 6.730.517 B1 proporciona un sistema analítico modular completamente automatizado con instrumentación integrada para el análisis de muestras biopoliméricas, tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos y carbohidratos. Los procedimientos analíticos de detección y análisis, tales como espectrometría de masas, radiomarcado, etiquetas de masa, etiquetas químicas y fluorescencia, quimioluminiscencia están integrados con tecnología robótica y sistemas de reacciones químicas automatizados para proporcionar una Línea de Proceso Automatizada (LPA) precisa y de alto rendimiento.

25 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un aparato que pueda identificar información relevante en muestras biológicas para proporcionar un perfil de fármacos y/o de metabolitos de una muestra biológica de una manera fiable en un tiempo razonable.

30 El objeto se resuelve con un aparato de acuerdo con la reivindicación 1. El aparato incluye: una unidad de entrada para introducir el tipo de fármacos y/o metabolitos a explorar, una unidad de control para determinar un conjunto de parámetros para la preparación de la muestra y para el análisis de espectrometría de masas dependiendo de la entrada del tipo de fármacos y/o metabolitos a explorar, una unidad de tratamiento para preparar los fármacos y/o metabolitos a explorar dependiendo del conjunto de parámetros determinado, un espectrómetro de masas para realizar análisis de espectrometría de masas en los fármacos y/o metabolitos preparados dependiendo del conjunto de parámetros, una base de datos para almacenar los resultados del análisis de espectrometría de masas y/o los conjuntos de parámetros utilizados para la preparación de fármacos y/o metabolitos y para el análisis de espectrometría de masas, una unidad de evaluación para evaluar y comparar los resultados obtenidos de la espectrometría de masas utilizando los resultados de referencia almacenados en la base de datos y para producir el análisis del perfil de fármacos y/o metabolitos incluidos en la muestra biológica en estudio.

35 La invención se basa en la idea de que, proporcionando un aparato para preparar una muestra biológica para analizar fármacos y/o metabolitos en una muestra biológica, las condiciones reproducibles para el análisis se mantienen a través de una amplia serie de análisis. Además, proporcionando un proceso automatizado para la preparación de la muestra biológica y para el análisis por espectrometría de masas, puede manejarse la amplia cantidad de datos a procesar. Adaptando la evaluación de los resultados de espectrometría de masas utilizando resultados de referencia almacenados en la base de datos, los resultados de los análisis derivados de los perfiles de fármacos y/o metabolitos podrían mejorarse usando el conocimiento acumulado durante análisis previos. Además, la cuantificación utilizando patrones internos apropiados se usa para cuantificar los fármacos y/o metabolitos en una muestra biológica. Utilizando procedimientos pre-analíticos automatizados, la cantidad de resultados se reduce. Se utiliza una pluralidad de procedimientos operativos estándar (POE) para tratar y manejar una pluralidad de muestras biológicas de una manera estandarizada dependiendo de los fármacos y/o metabolitos a explorar.

A continuación, la invención se describe con respecto al análisis de perfiles de metabolitos. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita a ello, sino que también puede aplicarse al análisis de perfiles de fármacos (es decir, para la monitorización terapéutica de fármacos (MTF), en una manera similar.

5 Preferentemente un procedimiento para el análisis de un perfil de metabolitos en una muestra biológica comprende las etapas de: proporcionar la muestra biológica a un aparato para analizar al menos un metabolito, proporcionar al aparato información de los metabolitos a explorar, preparar la muestra biológica dependiendo de la información de los metabolitos a explorar, extraer los metabolitos preparados, proporcionar al espectrómetro de masas el extracto de muestra, realizar uno o más análisis de espectrometría de masas en los metabolitos preparados, procesar y evaluar resultados de espectrometría de masas de los metabolitos a explorar y comparar con valores de referencia y anotando previamente información de los metabolitos diana y generando datos de salida.

10 Por tanto, el procedimiento para el análisis de un perfil de metabolitos comprende generalmente las etapas de preparación de la muestra y separación de los metabolitos, realizar un análisis utilizando espectrometría de masas y procesamiento de los datos.

15 Existen dos tipos de estrategias que pueden aplicarse para el perfil de metabolitos. Cuando se usa espectrometría de masas basada en perfil de metabolitos puede utilizarse un enfoque cualitativo no dirigido y cuantitativo dirigido. El grado y tipo de procesamiento de datos posterior se determina dependiendo de la estrategia seleccionada.

20 Para explorar cuantitativamente metabolitos conocidos de molécula pequeña se utiliza un esquema de perfilado dirigido de acuerdo con la invención utilizando el espectro de monitorización de múltiples reacciones (MRM), el espectro de ión precursor (*precursor ion scan*) y el espectro de pérdida constante de fragmentos neutros. Para el análisis se selecciona una pluralidad de clases de compuestos diferentes (por ejemplo, aminoácidos, péptidos, acilcarnitinas, monosacáridos, lípidos y fosfolípidos etc.). Estos compuestos incluyen rutas metabólicas relevantes de una enfermedad que se está investigando. La cuantificación de los metabolitos en los compuestos de la muestra biológica se realiza por referencia a patrones internos apropiados.

25 Por tanto, la invención utiliza una cantidad conocida de un patrón interno, que se combina con la muestra biológica. Usando el aparato y el procedimiento para el perfil de metabolitos las partes o alícuotas de la muestra biológica a explorar se combinan con una pluralidad de patrones internos diferentes. Los patrones internos se identifican y cuantifican y, por lo tanto, dan como resultado datos de espectrometría de masas, que corresponden a la concentración conocida. Además, al dividir la muestra biológica en una pluralidad de alícuotas solo se requieren pequeñas cantidades de muestra biológica. Cada alícuota se trata y se prepara de una manera estandarizada, que se controla mediante el uso de un conjunto de parámetros derivado del procedimiento operativo estándar (POE). Usando la preparación (tratamiento) y separación (por ejemplo, derivatización, extracción) de muestras automatizada, dependiendo de los metabolitos a explorar, es posible realizar un análisis de espectrometría de masas en cada extracto de una alícuota respectiva generando un resultado de espectrometría de masas que tiene una pluralidad de picos de los metabolitos incluidos en la alícuota preparada y separada y los picos de los patrones internos correspondientes a concentraciones conocidas.

35 Después, en los resultados del análisis de espectrometría de masas, se realiza el procesamiento de datos de espectrometría de masas. El procesamiento de datos puede utilizar procedimientos quimiométricos y estadísticos utilizando corrección de isótopos, filtración de interferencia, normalización y graduación, filtración de los resultados basada en contenido y cuantificación y anotación de los metabolitos diana detectados utilizando las características conocidas de los patrones internos apropiados y anotando previamente información en la base de datos. Los resultados procesados se almacenan y se comparan con valores de referencia almacenados en la base de datos para deducir información sobre si en los resultados los metabolitos pertenecen, por ejemplo, a un paciente sano o enfermo, o son característicos de una determinada patología, o respuesta refleja a una sustancia farmacológica o fármaco. La base de datos puede adaptarse en base a la información deducida durante la comparación de los resultados de la espectrometría de masas con valores de referencia almacenados en la base de datos. Este proceso de aprendizaje puede usarse para proporcionar una adaptación de los conjuntos de parámetros y/o procedimiento operativo estándar, utilizados para tratar las muestras biológicas en el análisis de los perfiles de metabolitos. Los resultados del procedimiento del análisis de perfiles de metabolitos pueden denominarse biomarcadores, caracterizando al menos uno o más metabolitos muy significativos para indicar una enfermedad o un cambio de un estado de un paciente sano normal, o una respuesta a una sustancia farmacológica o fármaco.

De las reivindicaciones dependientes pueden deducirse ventajas adicionales de la presente invención.

A continuación, se describirán realizaciones ejemplares con los dibujos adjuntos, en los que

55 La Fig. 1 muestra un diagrama de bloques de un aparato de acuerdo con la presente invención;
La Fig. 2 muestra un diagrama esquemático que ilustra componentes de la unidad de tratamiento de acuerdo con la presente invención;
La Fig. 3 muestra un flujograma simplificado de acuerdo con un procedimiento correspondiente;
La Fig. 4 muestra una vista esquemática de un ensayo preclínico que utiliza el aparato de la invención;

La Fig. 5 muestra una ilustración esquemática para la comparación del perfil de metabolitos dirigido y no dirigido;

La Fig. 6 ilustra resultados de una espectrometría de masas para metabolitos y patrones internos de acuerdo con la presente invención utilizando perfil de metabolitos dirigido;

5 La Fig. 7 describe una vista transversal de un dispositivo singular preferentemente utilizado de acuerdo con la invención que contiene pocillos o viales y su ensamblaje a partir de componentes individuales. El número de referencia (1) muestra un pocillo/vial. El número de referencia (2) muestra un inserto que comprende una fase de inmovilización estacionaria de vidrio, celulosa u otro material adecuado (es decir, un soporte poroso) conteniendo opcionalmente patrones internos con (micro)encapsulación opcional; el número de referencia (3) muestra un dispositivo de retención para sujetar el soporte poroso en el pocillo o vial, que es químicamente inerte a derivados y disolventes; el número de referencia (4) muestra un filtro; el número de referencia (5) muestra una salida, que se abre bajo una presión de fuerza centrífuga o gravitacional o vacío;

10 La Fig. 8 describe un espectro de pérdida constante de fragmentos neutros de 135 en modo negativo usando espectrometría de masas en tándem con iones de derivados del aminoácido feniltiurea (PTU), mostrando aminoácidos de una muestra de células sanguíneas y sus correspondientes patrones internos de isótopos estables preparados con un multidispositivo descrito en el Ejemplo 2;

15 La Fig. 9A describe un espectro de ión precursor de 184 en modo ión positivo (A), que muestra la capacidad de los multidispositivos para extraer fosfolípidos de una muestra de células sanguíneas del Ejemplo 2. Por ejemplo las esfingomielinas y las fosfatidilcolinas pueden observarse en el intervalo m/z de 700 - 840, y las liso fosfatidilcolinas en el intervalo m/z de 400 - 650;

20 La Fig. 9B describe un espectro de MRM (monitorización de múltiples reacciones) en modo ión positivo del Ejemplo 2;

25 La Fig. 10 describe un ejemplo de cómo se analizan los fármacos inmunoterapéuticos Sirolimus, Everolimus, Ciclosporina A, Tacrolimus y los patrones internos, Ascomicina y Ciclosporina D de una muestra de sangre de control de calidad con LCMS para generar datos cuantitativos. El área bajo los picos integrados de los patrones internos, Ciclosporina D y Ascomicina, de concentraciones conocidas, se usan para comparación frente al área bajo el pico de los inmunosupresores en las cinco muestras de control de calidad que contienen cantidades de concentración conocidas. Esto proporciona una medida de precisión de los cuatro fármacos;

30 La Fig. 11 describe una curva de calibración de calibradores para Sirolimus obtenida a partir del multidispositivo con inserto de celulosa (Ejemplo 3);

La Fig. 12 describe una curva de calibración de calibradores para Everolimus obtenida a partir del multidispositivo con inserto de celulosa (Ejemplo 3);

35 La Fig. 13 describe una curva de calibración de calibradores para Ciclosporina A obtenida a partir del multidispositivo con inserto de celulosa (Ejemplo 3);

La Fig. 14 describe una curva de calibración de calibradores para Tacrolimus obtenida a partir del multidispositivo con inserto de celulosa (Ejemplo 3).

Antes de explicar las realizaciones basadas en las figuras, se proporcionan algunas definiciones o explicaciones.

Patrón interno

40 Un patrón interno, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier referencia a materiales de cantidades absolutas conocidas que se utiliza para realizar comparaciones con compuestos similares o idénticos con objeto de cuantificar cantidades desconocidas de compuestos presentes en una muestra determinada. Preferentemente, el patrón interno es un patrón interno orgánico. Los patrones internos, tal y como se usa en la presente invención, pueden pertenecer al mismo grupo o familia de compuestos a analizar en la muestra biológica. Sin embargo, preferentemente se marcan con isótopos para permitir diferenciar adecuadamente entre los 45 metabolitos de la muestra y del patrón interno. Sin embargo, también puede utilizarse cualquier otra forma de diferenciar los metabolitos de la muestra de los patrones internos. Por ejemplo, como patrones internos también pueden utilizarse compuestos de origen no natural.

En la Tabla 1 se indican ejemplos específicos de los patrones internos, como se usa en la presente invención.

Tabla 1

Lípidos:		
abreviatura	Nombre completo	Comentarios
		Longitud de cadena de ácido graso
SM(d18:1/6:0)	N-hexanol-esfing-4-enine-1-fosfocolina	6
GPCho(9:0/0:0)	1-nonanoil-sn-glicero-3-fosfocolina	9

(continuación)

Lípidos:		
abreviatura	Nombre completo	Comentarios
		Longitud de cadena de ácido graso
GPCho(14:0/14:0)	1,2-ditetradecanosil-sn-glicero-3-fosfocolina	28
GPIIns(16:0/16:0)	1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-mioinositol)	32
GPCho(20:0/20:0)	1,2-di-(3,7,11,15 tetrametil hexadecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina	40
GPSer(20:0/20:0)	1,2-di-(3,7,11,15 tetrametil hexadecanoil)-sn-glicero-3-fosfoserina	40
GPSer(6:0/6:0)	1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfoserina	12
Aminoácidos		
abreviatura	Nombre completo	Comentarios
13C2-15N-Gly	13C2-15N-glicina	
D4-DL-Ala	D4-DL-alanina	
15N2-L-Argl	15N2-L-arginina HCl	
D3-DL-Asp	D3-DL-ácido aspártico	
15N2-L-Asn	15N2-L-asparagina H2O	
D3-L-Glu	D3-L-ácido glutámico	
D5-L-Gln	D5-L-glutamina	
13C6-L-His	13C6-L-histidina H2O	
13C6-L-Ile	13C6-L-isoleucina	
13C-L-Lys	13C-L-lisina 2HCl	
D3-L-Met	D3-L-metionina	
D6-L-Orn	D6-L-ornitina HCl	
D5-L-Phe	D5-L-fenilalanina (anillo 5-fe)	
D7-L-Pro	D7-L-prolina	
D3-DL-Se	D3-DL-serina	
13C4-L-Thr	13C4-L-treonina	
15N2-L-Trp	15N2-L-triptófano	
D4-L-Tyr	D4-L-tirosina (anillo 4-tir)	
D8-DL-Val	D8-DL-valina	

(continuación)

Acilcarnitinas		
Abreviatura	Nombre completo	Longitud de cadena lateral
D3-C0	[d3-metil]-carnitina.HCl	C=0
D9-C0	[d9-trimetil]-carnitina.HCl	C=0
D3-C2	[d3]-acetil-L-carnitina.HCl	C=2
D3-C3	[3,3,3-d3]-propionil-L-carnitina.HCl	C=3
D3-C4	[4,4,4-d3]-butiril-L-carnitina.HCl	C=3
D7-C4	[d7]-isobutiril-L-carnitina.HCl	C=4
D3-C5	[5,5,5,-d3]-valeril-L-carnitina.HCl	C=4
D9-C5	[d9]-isovaleril-L-carnitina.HCl	C=5
D3-C6	[6,6,6-d3]-hexanoil-L-carnitina.HCl	C=6
D3-C8	[8,8,8-d3]-octanoil-L-carnitina.HCl	C=8
D3-C10	[10,10,10-d3]-decanoil-L-carnitina.HCl	C=10
D3-C12	[12,12,12-d3]-dodecanoil-L-carnitina.HCl	C=12
D3-C14	[14,14,14-d3]-tetradecanoil-L-carnitina.HCl	C=14
D3-C16	[16,16,16-d3]-hexadecanoil-L-carnitina.HCl	C=16
D3-C18	[18,18,18-d3]-octadecanoil-L-carnitina.HCl	C=18
Monosacáridos reductores		
Abreviatura	Nombre completo	Comentarios
13C6-Glc	13C6-glucosa	
Piruvato/Lactato		
Abreviatura	Nombre completo	Comentarios
13C3-Pyr	13C3-piruvato	
Creatinina		
Abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	[d3-metil]-creatinina	

(continuación)

Inmunosupresores		
Abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	Ascomicina	
	Ciclosporina D	
	32-desmetoxirapamicina	

Muestra biológica

- 5 Una muestra biológica, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier muestra de, relacionada con, ocasionada por o que afecta a la vida, a organismos vivos y a procesos biológicos, tales como crecimiento y digestión.

Como ejemplos de muestras biológicas pueden incluirse, pero sin limitación, sangre, sobrenadante de cultivo celular, saliva, lágrimas, orina, suero, plasma, sudor, líquido vaginal, semen, heces, mucosidad, leche materna, líquido ascítico, linfa, derrame pleural, líquido sinovial, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y lavados de cavidades corporales (por ejemplo, lavado bronquial), pelo, tejido, huesos o dientes.

- 10

Preferentemente, la muestra biológica es una muestra líquida. Más preferentemente, la muestra biológica es sangre, y más preferentemente sangre humana. Líquido significa un estado de materia con volumen definido pero sin forma definida a 25 °C, como el agua.

- 15 **Consumible**

Un consumible debe entenderse que es cualquier compuesto adecuado para usarse en derivatización y extracción de los metabolitos.

Perfil de metabolitos

- 20 Un perfil de metabolitos, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier conjunto de valores de resultados cuantitativos definido para metabolitos que pueden usarse para realizar la comparación con valores de referencia o perfiles derivados de otra muestra o de un grupo de muestras. Por ejemplo, un perfil de metabolitos de una muestra de un paciente enfermo podría ser significativamente diferente de un perfil de metabolitos de una muestra de un paciente sano similarmente comparable.

- 25 Los metabolitos, tales como, pero sin limitación aminoácidos, péptidos, acilcarnitinas, monosacáridos, lípidos y fosfolípidos, prostaglandinas, ácidos hidroxieicosanotetranoicos, ácidos hidroxioctadecadienoicos, esteroides, ácidos biliares y gluco- y fosfolípidos pueden detectarse y/o cuantificarse.

En la Tabla 2 se indican ejemplos de metabolitos, que pueden detectarse y/o cuantificarse. En particular, se muestran especies de lípidos de C4:X a C46:X (donde el grado de saturación X varía de 0 a 8 en cualquier resto de ácido graso determinado). Los lípidos incluyen también esfingolípidos y glucoesfingolípidos.

- 30 Los aminoácidos que pueden detectarse y cuantificarse, son aminoácidos proteogénicos o no proteogénicos. Como se indica en la Tabla 2 se prefieren los aminoácidos proteogénicos y los no proteogénicos.

Las acilcarnitinas de C4:X a C18:X (donde el grado de saturación X varía de 0 a 8 en cualquier resto ácido determinado) pueden detectarse y/o analizarse. En la Tabla 2 también se indican ejemplos de acilcarnitinas preferidas.

- 35 Los monosacáridos son preferentemente carbohidratos reductores o no reductores. En la Tabla 2 también se indican ejemplos de monosacáridos.

Tabla 2 – Metabolitos que pueden tratarse en los análisis de espectrometría de masas de acuerdo con la invención

Lípidos:			
Abreviatura	Nombre completo de subtipo de lípido		Comentarios
	Glicerofosfolípidos, glucoesfingolípidos	esfingolípidos	y Longitud de cadena de ácido graso
Sph	esfingosina		ninguna
Cer	ceramida		C6:X - C36:X
SM	esfingomielina		C6:X - C36:X
Sph pchol	esfingosilfosforilcolina		ninguna
Sph dh	dihidroesfingosina		ninguna
PC	fosfatidilcolina		C4:X - C46:X
PI	fosfatidilinositol		C4:X - C46:X
PS	fosfatidilserina		C4:X - C46:X
PC (a)	lisofosfatidilcolina		C4:X - C32:X
PI (a)	lisofosfatidilinositol		C4:X - C32:X
PS (a)	lisofosfatidilserina		C4:X - C32:X
PC (e)	plasmenilfosfatidilcolina		C4:1 - C32:X
PC (e)	plasmanilfosfatidilcolina		C4:0 - C32:X
Aminoácidos			
Aminoácidos proteinogénicos			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
A	Ala	Alanina	
D	Asp	Ácido aspártico	
E	Glu	Ácido glutámico	
F	Phe	Fenilalanina	
G	Gly	Glicina	
H	His	Histidina	
	Xle	Leucina/Isoleucina	
K	Lys	Lisina	
M	Met	Metionina	
P	Pro	Prolina	
R	Arg	Arginina	
S	Ser	Serina	
T	Thr	Treonina	

(continuación)

Aminoácidos			
Aminoácidos proteinogénicos			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
V	Val	Valina	
W	Trp	Triptófano	
Y	Tyr	Tirosina	
	ADMA	Dimetil arginina asimétrica	Procedimiento CL EM
	SDMA	Dimetil arginina simétrica	Procedimiento CL EM
Q	Gln	Glutamina	
N	Asn	Asparagina	
Aminoácidos no proteinogénicos			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
O	Orn	Ornitina	
	Cit	Citrulina	
Acilcarnitinas			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	C0	Carnitina (carnitina libre)	C0
	C2:X a C18:X	Acilcarnitina	C0:X a C26:X
	C3:X-OH a C18:2-OH	Hidroxilacilcarnitina	C3-OH a C18:2-OH
	C3:0-DC a C18:2-DC	Dicarboxilacilcarnitinas	C3:0-DC a C12:0-DC
Monosacáridos reductores			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	H	Hexosa	
	P	Pentosa	
	dH	Desoxihexosa	
Otros			
	abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	Cr	Creatinina	
		Espermidina	Procedimiento CL EM
		Espermina	Procedimiento CL EM
		Putrescina	Procedimiento CL EM
		Dopamina	Procedimiento CL EM
		Serotonina	Procedimiento CL EM

(continuación)

Otros		
abreviatura	Nombre completo	Comentarios
	Prostaglandinas	Procedimiento CL EM
	Hidroxiieicosatetraenoico (HETE)	Procedimiento CL EM
	Hidroxiioctadecadienoico (HODE)	Procedimiento CL EM
	Leucotrienos	Procedimiento CL EM
	Tromboxanos	Procedimiento CL EM
	Ácidos biliares	Procedimiento CL EM
	Esteroles	Procedimiento CL EM
	Colesteroles	Procedimiento CL EM
	Vitaminas y cofactores	
	Fármacos y metabolitos farmacológicos	Procedimiento CL EM

Perfil farmacológico

5 Un perfil farmacológico, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier conjunto definido de valores de resultados cuantitativos para uno o más fármacos o metabolitos farmacológicos en una muestra especificada. Es más, como ejemplos específicos pueden detectarse y cuantificarse inmunosupresores. Por ejemplo, un perfil farmacológico de un paciente trasplantado proporcionaría al médico las cantidades circulantes inmediatas de una o más terapias farmacológicas en uso, y las futuras dosificaciones podrían por lo tanto aumentarse o disminuirse de acuerdo con las cantidades medidas para conseguir el mejor intervalo terapéutico. Dicho análisis se diseña como una monitorización terapéutica de fármacos (MTF). Los inmunosupresores de acuerdo con la presente invención deben entenderse como fármacos que pueden usarse en terapia inmunosupresora para inhibir o prevenir la actividad del sistema inmunitario. Clínicamente se usan para prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados y en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Los inmunosupresores, como se define en el presente documento, pueden clasificarse básicamente en cuatro grupos: glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos y fármacos que actúan sobre inmunofilinas. Son ejemplos preferidos de inmunosupresores, como se usa en la presente invención, Ciclosporina A, Sirolimus, Everolimus y Tracolumus.

Dispositivo múltiple

20 Un dispositivo múltiple, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquiera de los dispositivos múltiples agrupados para formar un dispositivo múltiple, tal como un formato convencional de placa de microtitulación.

25 Una placa de microtitulación, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier portamuestras de plástico utilizado en centros de investigación biológica o química. La placa de microtitulación convencional la formalizó la Society for Biomolecular Screening (SBS) en 1996. Típicamente tiene 6, 24, 96, 384 o 1536 pocillos de muestra dispuestos en una matriz rectangular 2:3. La norma regula las dimensiones del pocillo (por ejemplo diámetro, espacio y profundidad) así como las propiedades de la placa (por ejemplo, dimensiones y rigidez).

El dispositivo en formato múltiple del presente documento, denominado dispositivo múltiple, también puede tener un formato diferente. Pre-incorporando diversos viales, como ejemplo 6 pocillos, se obtiene un punto de calibración de 6 con compuestos de calibrado múltiple. También pueden pre-incorporarse muestras de control de calidad que contienen metabolitos conocidos y/o concentraciones de fármacos múltiples.

30 El dispositivo de acuerdo con una realización preferida de la presente invención comprende adicionalmente un soporte poroso, tal como, por ejemplo, celulosa o fibra de vidrio, preferentemente contenido en al menos un pocillo mediante una estructura de retención químicamente inerte. Preferentemente el soporte poroso tiene incorporado patrones internos en estado seco; opcionalmente está microencapsulado (revestido) con un material protector o de revestimiento o mezcla de compuestos químicos, por ejemplo, polietilenglicol 1000, fosfatidilcolina, glicerol o sorbitol.

35 **Inserto**

El término "inserto", como se usa de acuerdo con una recepción particular preferida de la invención, debe entenderse que es un soporte poroso que contiene los patrones internos con un protector químico opcional como se menciona anteriormente. El inserto puede tener cualquier forma geométrica siempre que los insertos se adapten al pocillo o vial del dispositivo. En una realización preferida el inserto se dispone dentro del pocillo o vial del dispositivo utilizando un dispositivo de retención. En la Figura 7, dicho dispositivo de retención se indica con el número de referencia (3). En una realización preferible el dispositivo de retención (3) permite colocar el inserto dentro del pocillo sin establecer contacto directo entre el inserto y el pocillo. Por tanto, el inserto se sitúa por encima de la base del pocillo preferentemente a una distancia de 2 a 10 mm, más preferentemente de 3 a 5 mm usando el dispositivo de retención. En otras palabras, en una realización preferida, entre el fondo del pocillo y el inserto y/o entre las paredes del pocillo y el inserto hay lo que se denomina un "espacio" o una "distancia". Como dispositivo de retención en la realización preferida cualquier dispositivo de retención es adecuado siempre que permita la formación del espacio entre el fondo del pocillo y el inserto. Dicha disposición permite un área de superficie máxima del soporte para que las muestras precipiten sobre el mismo. El diseño también garantiza que el inserto sea completamente accesible a flujo de aire u otro gas secante alrededor del inserto que permita secar rápidamente la muestra después de la aplicación. Este diseño principal también garantiza que el inserto sea completamente accesible a flujo de disolvente desde todos los lados que permita extraer el metabolito o el fármaco de la muestra con contaminantes proteicos y salinos minimizados. Por tanto, los poros del soporte permiten realizar una reacción (derivatización) dentro del propio soporte, minimizando el uso de disolventes y también proporciona la retirada posterior, como evaporación de exceso de derivado y disolventes, por un área de superficie máxima para la circulación de gases secantes (aire o nitrógeno) alrededor de la muestra. El área de superficie aumentada y la movilidad del disolvente alrededor de todo el soporte también garantizan alta eficacia de extracción utilizando disolventes apropiados. En otras palabras, el espacio mencionado anteriormente permite una disposición casi libre del inserto dentro del pocillo y una circulación mejorada de líquidos que fluyen a través del pocillo.

Por otra parte, de acuerdo con una realización preferida de la invención, el dispositivo puede comprender más de un inserto apilado, en el que los insertos respectivos se disponen más preferentemente con el espacio anteriormente mencionado entre cada uno de ellos para permitir la circulación de líquidos.

Soporte

El soporte, como se usa en la invención, puede ser cualquier soporte preferentemente con al menos un grado medio, preferentemente un grado alto de porosidad. Dicho soporte se conoce en principio en la técnica anterior y también se encuentra disponible en el comercio.

La porosidad " Φ " de un medio (es decir, el soporte) se define como la proporción del volumen no sólido con respecto al volumen total de material, y se define mediante la relación:

$$\Phi = V_p / V_m$$

en la que V_p es el volumen no sólido (poros y líquido) V_m es el volumen total de material, incluyendo las partes sólidas y no sólidas.

Por tanto, la porosidad es un valor entre 0 y 1, típicamente variando de menos de 0,01 para el granito sólido a más de 0,5 para la turba y la arcilla, aunque también puede presentarse en términos de porcentaje multiplicando la fracción por 100%. El soporte poroso de la invención tiene una porosidad de al menos 30%, más preferentemente al menos 50%, incluso más preferentemente al menos 70%, y más preferentemente al menos 90%.

El soporte poroso, como se usa en el inserto, puede ser de cualquier material adecuado, pero es preferentemente un soporte sólido. Más preferentemente, el soporte poroso se compone de un material sorbente para líquidos, (denominado también material sorbente de líquidos). Aún más preferentemente, el soporte está constituido por el material sorbente de líquidos. El material sorbente puede ser un material adsorbente o un material absorbente.

Un material sorbente de líquidos, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier material que permita que las soluciones de patrones internos y muestras posteriores para el análisis se adsorban o se adsorban uniformemente a través de los poros permitiendo adicionalmente retirar el disolvente transportador por evaporación.

El líquido a adsorber o absorber por el material de soporte puede ser cualquier tipo de líquido, pero es preferentemente un líquido volátil a presión atmosférica, por ejemplo, un líquido que tiene un punto de ebullición menor de aproximadamente 250 grados Centígrados (C) a presión atmosférica.

Más preferentemente, el material sorbente de líquidos comprende al menos uno de un material de carbohidrato, tal como material de celulosa, fibras de vidrio, perlas de vidrio, gel de poliacrilamida, polímero inerte de plástico poroso y grafito poroso. Dicho material sorbente poroso puede estar más preferentemente constituido por un material carbohidrato o derivado del mismo, tal como agarosa, agar, celulosa, dextrano, quitosano, o konjac, carragenano, gelano o alginato. Sin embargo, el material sorbente de líquidos está más preferentemente fabricado de celulosa o de fibras de vidrio. La forma del soporte o material sorbente de líquidos no está particularmente limitada pero tiene preferentemente una dimensión circular, cuadrada o de rosca o espiral. La forma del soporte o material sorbente está adaptada a la forma del pocillo o vial del dispositivo. Como se ha mencionado, el soporte poroso o material

sorbente puede fijarse o sujetarse en su posición en el pocillo o vial mediante una estructura de fijación tal como un dispositivo de retención (indicado como (3) en la Figura 7).

El soporte poroso que comprende el material sorbente de líquidos tiene principalmente dos funciones. La primera es incorporar los patrones internos (material de referencia) como se describe más adelante a una concentración predefinida lista para la adición de la muestra biológica. La segunda es la inmovilización del contenido de cada muestra. Esta etapa de inmovilización induce la retención de la lisis celular, inmovilización/precipitación de proteínas y sales y de cualquier otro fármaco o metabolito de cada una de las muestras. La porosidad del soporte es por tanto esencial para una exposición máxima tanto a los agentes derivatizantes como también a la extracción de disolvente a añadir para el análisis.

10 **Encapsulación de los patrones**

El patrón interno de acuerdo con un ejemplo se encapsula con un material de revestimiento o material protector que protege el patrón interno de la degradación y reactividad química antes de su uso. La protección del patrón interno de la degradación y reactividad química puede prevenir muchas formas de descomposición o modificación química del patrón interno, tal como la prevención de la acción de la luz del sol, temperatura y microorganismos, en particular prevención de cualquier proceso que transforme el patrón interno en productos de descomposición o degradación, por lo tanto ejerciendo influencia en el resultado de un análisis cuantitativo.

Un material protector/de revestimiento como se usa en la invención debe entenderse que es cualquier material para blindar o que esté diseñado para blindar el patrón (o patrones) interno contra la degradación.

El material protector/de revestimiento puede ser cualquier material adecuado para proteger el patrón interno de una influencia ambiental como se ha mencionado anteriormente. El material de revestimiento de acuerdo con la invención comprende preferentemente al menos uno de un polímero, un compuesto formador de micelas, un compuesto formador de liposomas y un compuesto polihidroxi o cualquiera de sus mezclas.

Si el material de revestimiento es un polímero, dicho polímero como se usa en la invención no está particularmente limitado y se entiende que es un compuesto orgánico de alto peso molecular, tal como con un peso molecular promedio en peso de al menos 500 g/mol o al menos 1.000 g/mol o al menos 5.000 g/mol o al menos 10.000 g/mol, que es natural o sintético, cuya estructura puede representarse mediante una unidad pequeña repetida de un monómero. Un polímero sintético se forma de una manera conocida en la técnica tal como por adición o reacción de polimerización de condensación de monómeros. El polímero también puede ser un copolímero, cuando intervienen dos o más monómeros diferentes. Un homopolímero es un polímero que se forma a partir de un solo tipo de monómero.

Preferentemente el polímero es un homopolímero o copolímero de polialquilenglicol o una mezcla de los mismos. El peso molecular promedio en peso es preferentemente de aproximadamente 1000 daltons (Da). Más preferentemente el polímero es un polietilenglicol (PEG) o propilenglicol (PPG), preferentemente PEG 1000 que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 1000 Da, ya que es soluble o miscible con disolventes muy polares y menos polares a no polares.

Si el material de revestimiento es un compuesto formador de micelas dicho compuesto como se usa en la invención debe entenderse que es cualquier compuesto que puede inducir agregación submicroscópica de moléculas, como gotitas en un sistema coloidal. El compuesto formador de micelas es preferentemente un tensioactivo.

Un tensioactivo como se usa en la invención se entiende que es cualquier compuesto químico que reduzca la tensión superficial entre dos líquidos; o cualquier agente activo en superficie que aumente las propiedades emulsionantes, formadoras de espuma, dispersantes, difusoras y humectantes de un producto, en particular cualquier compuesto orgánico cuyas moléculas contengan un grupo hidrófilo en un extremo y un grupo lipófilo en el otro extremo. Los tensioactivos adecuados comprenden tensioactivos catiónicos, aniónicos, no aniónicos y anfotéricos. Preferentemente, el tensioactivo es fosfatidil (C17:0)₂.

Si el material de revestimiento es un compuesto formador de liposomas dicho compuesto como se usa en la invención debe entenderse que es cualquier compuesto que pueda construir vesículas microscópicas artificiales que constan de un núcleo acuoso incluido en una o más capas fosfolípicas, utilizado para transportar vacunas, fármacos, enzimas u otras sustancias a células u órganos diana.

Un fosfolípido, como se usa en la invención, se entiende de un modo general en la técnica y debe comprender fósforo que contiene lípido, tal como lecitina y cefalina, constituido por glicerol y ácidos grasos, con un grupo fosfato unido. Más preferentemente, el compuesto formador de liposomas es un fosfolípido, tal como fosfatidil colina o una fosfatidil etanolamina o sus derivados.

Si el material de revestimiento es un compuesto polihidroxi dicho compuesto, como se usa en la invención, debe entenderse que comprende al menos dos grupos hidroxilo. Más preferentemente el compuesto polihidroxi es sorbitol y/o glicerol.

Preferentemente, la encapsulación es una microencapsulación. Una microencapsulación, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier encapsulación de microcápsulas, que son pequeñas cápsulas, preferentemente microscópicas, diseñadas para liberar su contenido cuando se rompen por presión, se disuelven o se funden. En particular, las cápsulas tienen preferentemente un diámetro menor de 100 micrómetros, más preferentemente menor de 10 micrómetros y más preferentemente menor de 1 micrómetro.

Los patrones internos microencapsulados son fuertes en cuanto a su almacenamiento y expedición y son estables en lo que respecta a los procesos de oxidación y degradación, y tienen una vida útil relativamente larga. La microencapsulación es preferentemente estandarizada para preparar material de control de calidad sintético basado en componentes microencapsulados. Esto se consigue típicamente secando los patrones internos u otras muestras protegidas con el material de revestimiento que es un disolvente adecuado para estos compuestos como una mezcla de cloroformo/metanol para fosfolípidos. Típicamente la adición de agua a estas muestras induce la aparición de formaciones de micelas y/o liposomas y por tanto es posible incluir en agua estos compuestos protegidos lipófilos convencionales internos o externos.

Por ejemplo, el dispositivo se prepara de la siguiente manera: en una pipeta se mide una cantidad conocida del patrón interno, disuelto en un disolvente adecuado, y se añade sobre un soporte poroso y se seca. Este procedimiento se repite en cada patrón interno o clase de patrones internos a emplear en el dispositivo. Si se proporciona una encapsulación, como la etapa final, el material de encapsulamiento/revestimiento, preferentemente en un disolvente adecuado, se pone sobre el soporte que incluye los patrones internos (por ejemplo, el inserto) y se secan. Después, el inserto se inserta en el pocillo, preferentemente usando un medio de sujeción o una estructura de fijación, tal como un dispositivo de retención. Como una alternativa, el soporte puede insertarse sobre el pocillo antes de realizar la medición con pipeta de los patrones internos y el material de revestimiento opcional sobre el soporte.

Pocillo

Un pocillo, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier vial o tubo que consiste en un material, que es preferentemente resistente a disolventes y derivados, en el que puede producirse una reacción de extracción o química. Uno o más pocillos (indicado como (18) en la Figura 1 y como (1) en la Figura 7) del dispositivo comprende preferentemente al menos un filtro para separar sólidos de tamaño micrométrico, más preferentemente exactamente un filtro para separar sólidos de tamaño micrométrico (indicado como (4) en la Figura 7). El uno o más pocillos del dispositivo comprenden preferentemente al menos una salida (indicada como (5) en la Figura 7) para descargar el filtrado. Un filtro contenido en el pocillo, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier material poroso a través del cual pasa un líquido o gas para separar el líquido de la materia particulada suspendida. El filtro tiene preferentemente un tamaño de poro de 50 a 0,01 micrómetros, más preferentemente de 5 a 0,1 micrómetros, e incluso más preferentemente de 1 a 0,3 micrómetros. Más preferentemente, el filtro tiene un tamaño de poro de 0,45 micrómetros. El filtro se sitúa en el pocillo. Además, la salida de acuerdo con la invención se abre preferentemente al aplicar una fuerza centrífuga o una presión reducida, preferentemente por debajo de 0,05 MPa (500 mbar). La presión reducida se aplica preferentemente sobre el lado de la salida del pocillo. Como alternativa, puede aplicarse una presión aumentada en la parte superior del pocillo para garantizar un flujo desde el pocillo hacia la salida.

Aparato

Adicionalmente, la placa de microtitulación, como se ha descrito anteriormente, también puede usarse en un aparato para el análisis cuantitativo de un perfil de metabolitos en una muestra biológica. Dicho aparato comprende una unidad de tratamiento para preparar el metabolito a explorar que comprende un sistema de manipulación de líquidos automatizado, típicamente combinado con dispositivos para derivatización de los metabolitos presentes en la muestra y para la posterior extracción de los derivados; un espectrómetro de masas para el análisis dirigido cuantitativo basado en espectrometría de masas y una base de datos para almacenar resultados del análisis.

El aparato, denominado también plataforma, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier aparato que permita la preparación completa de una muestra biológica lista para el análisis por espectrometría de masas. Esto incluye procesos de derivatización, desalinización, concentración y extracción. Esto también incluye todas las posibles combinaciones de algunos o de todos estos procesos en un procedimiento totalmente automatizado, incorporando preferentemente un sistema de manipulación de líquidos en combinación con un dispositivo de centrifugado de muestras, y un dispositivo de calentamiento y enfriamiento de muestras, un dispositivo de agitación de muestras, un dispositivo de secado de muestras, un dispositivo de medición con pipeta de muestras y un dispositivo de homogeneización de muestras. Un sistema de manipulación de líquidos, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier dispositivo mecánico que permita aspirar y distribuir con precisión los muchos tipos de disolventes dentro y fuera de los viales y placas de microtitulación. Un sistema de manipulación de líquidos puede estar controlado por un ordenador y en dicho sistema de manipulación de líquidos se utiliza un programa informático de control.

Una base de datos, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier recopilación de datos dispuestos para facilitar y agilizar su búsqueda y recuperación.

Un análisis de espectrometría de masas dirigido, como se usa en la invención, debe entenderse que es cualquier análisis de espectrometría de masas, en el que se usan uno o más pares iónicos predeterminados, que definen y representan específicamente un metabolito conocido mediante un modelo de fragmentación conocido que es característico del analito correspondiente, para la identificación del metabolito diana. Las intensidades iónicas obtenidas se usan junto con el patrón interno apropiado para calcular la concentración del metabolito diana. El patrón interno se identifica utilizando un par iónico (o varios) característico, sus intensidades iónicas obtenidas están relacionadas con la concentración conocida del patrón interno lo que permite la cuantificación de un metabolito diana correspondiente. El conjunto de metabolitos diana se conoce por adelantado y puede anotarse previamente. Por lo tanto, los metabolitos detectados y cuantificados ya previamente anotados permiten realizar una interpretación rápida y directa. En particular se prefiere un espectrómetro de masas en tándem como un espectrómetro de masas capaz de realizar análisis MSMS para diferenciar más específicamente especies iónicas. Preferentemente, el aparato permite la preparación automatizada de muestras estandarizadas y realizar procedimientos analíticos de masas en tándem a alta resolución. En particular, el procedimiento automatizado de preparación de muestras aumenta la reproducibilidad diaria de resultados fiables y reduce los coeficientes de varianza (CV). Cuando se analiza, por ejemplo, un azúcar derivatizado con un espectro de ión precursor, el propio derivado puede detectarse mediante el espectrómetro de masas. Preferentemente, la formación de la fenilmetilpirazolona (PMP) se realiza en un modo ión positivo (MH)+ión a una m/z de 175. Puede detectarse la composición del propio carbohidrato o de isómeros distintos.

Procedimiento Operativo Estándar (POE)

Los POE son instrucciones detalladas, por escrito, con objeto de garantizar una alta calidad y uniformidad de la realización del análisis de metabolitos. En este contexto, se definen todas las etapas de trabajo y de procesamiento con los parámetros correspondientes, tales como, por ejemplo, procesamiento, análisis de espectrometría de masas y procesamiento de datos, facilitando un conjunto estandarizado de muestras de metabolitos, la manipulación, preparación, análisis y el procesamiento de datos, lo que conduce a resultados reproducibles con una variabilidad intra- e inter-diaria baja. Típicamente, un POE específico se refiere al análisis de una o más clases de metabolitos para uno o más tipos materiales de muestras.

Conjunto de parámetros

Todas las etapas y parámetros correspondientes del POE se almacenan y gestionan en una base de datos. Después de diseñar uno o varios POE para una muestra o conjunto de muestras (es decir muestras en una placa de microtitulación), todos los parámetros para la preparación de la muestra se envían a la unidad de control para gestionar y monitorizar el proceso de preparación de la muestra en la unidad de tratamiento. Todas las etapas, incluyendo la medición con pipeta, la derivatización, incubación y extracción, se controlan mediante el conjunto de parámetros correspondiente. El análisis de espectrometría de masas (EM) lo controla, de manera similar, la unidad de control aplicando los parámetros correspondientes del conjunto de parámetros. Los parámetros definen el procedimiento de EM, tal como tiempos de espectro e ionización positiva o negativa para espectros de monitorización de múltiples reacciones (MRM), ión precursor y pérdida constante de fragmentos neutros. Además, en el conjunto de parámetros se incluyen todos los parámetros de identificación de metabolitos diana y patrones internos relacionados, tales como pares de masas y tolerancias de masas y de cuantificación, tal como la concentración de patrones internos, factores de respuesta, límite de detección e intervalo lineal.

Filtración

El procesamiento de datos implica típicamente la etapa de reducción de datos denominada filtración. Los filtros de interferencia reducen los datos en base a un umbral de interferencia calculado. En este sentido, se filtran los datos por debajo de una determinada proporción de señal con respecto a interferencia. El contenido basado en filtración de los resultados utiliza, por ejemplo, conocimiento específico de la enfermedad para concentrarse en aspectos metabólicos relevantes de la enfermedad que se está investigando

Comparación y evaluación

Después de haber validado técnicamente los datos previamente procesados obtenidos del análisis de espectrometría de masas, puede realizarse un análisis estadístico. Dependiendo del diseño del estudio del perfil de metabolitos, una o varias muestras derivadas de pacientes y controles sanos se comparan para mostrar diferencias relevantes, es decir, los biomarcadores que pueden utilizarse para caracterizar una enfermedad a nivel molecular. En otra realización, las muestras proceden de pacientes que participan en un ensayo clínico en el que se está investigando un nuevo compuesto farmacológico y se comparan con un fármaco aprobado. La evaluación del perfil de metabolitos muestra los perfiles farmacodinámicos y las diferencias de los compuestos o dosificaciones investigados. Estos perfiles farmacodinámicos indican la eficacia y los efectos secundarios ocasionados por los compuestos individuales.

A continuación, se describe una configuración ilustrativa de un aparato de acuerdo con la presente invención. En relación a la Fig. 1 el aparato 10 incluye una unidad de tratamiento 11 y el espectrómetro de masas 14. Además, hay una unidad de control 12 acoplada a una unidad de entrada 16. La unidad de control 12 está conectada a una base

de datos 13. La base de datos 13 está acoplada a una unidad de evaluación/comparación y salida 20. La base de datos 13 recibe resultados de una unidad de procesamiento 15. La unidad de procesamiento 15 recibe los resultados del espectrómetro de masas 14. La unidad de procesamiento 15 puede combinarse con la unidad de control 12 o puede realizarse como una unidad individual.

5 A continuación, se describen con más detalle los componentes de la unidad de tratamiento 11, como se muestra en la Figura 2. La unidad de tratamiento 11 comprende un robot, que manipula la placa de microtitulación 22. Además, manipula la introducción de patrones internos, consumibles o disolventes en los pocillos de la placa de microtitulación 22. La unidad de tratamiento 11 incluye un sistema de manipulación de líquidos. La unidad de tratamiento 11 incluye adicionalmente un automuestreador que divide la muestra biológica en una pluralidad de
10 alícuotas, que se proporcionan en los pocillos de las placas de microtitulación 22.

En un ejemplo, la placa de microtitulación 22 incluye alícuotas, que procede de una sola muestra biológica. Sin embargo, también es posible tener diferentes muestras biológicas que se distribuyan en diferentes pocillos de la placa de microtitulación 22.

15 La unidad de tratamiento 11 incluye adicionalmente recipientes que incluyen diferentes patrones internos, consumibles o disolventes. El robot accede a los diferentes recipientes para añadir los patrones internos consumibles o disolventes a las respectivas alícuotas en los pocillos.

Para preparar la pluralidad de alícuotas combinadas se requieren compuestos adicionales. Puede ser necesario poner las alícuotas al vacío o a presión. Adicionalmente, para proporcionar una mezcla fiable de los patrones internos, consumibles y disolventes con las alícuotas se coloca un agitador y/o una centrífuga. Otros componentes
20 de la unidad de tratamiento son, por ejemplo, la campana de extracción y la unidad de lavado de pipetas.

La placa de microtitulación 22 incluye una placa superior y una placa inferior, que pueden separarse entre sí después del tratamiento de las muestras combinadas en la unidad de tratamiento 11. La placa superior tiene un detentor o dispositivo de retención para sujetar un soporte, que puede impregnarse con uno o más patrones internos, consumibles o disolventes.

25 En lugar de suministrar los patrones internos, consumibles o disolventes en forma líquida estos pueden suministrarse sobre el soporte poroso. El soporte poroso puede insertarse en el pocillo en la placa superior. Por tanto las alícuotas de la muestra biológica pueden disolverse en los patrones internos, consumibles o disolventes durante el tratamiento.

30 A continuación se explica el procedimiento para analizar el perfil metabólico en una muestra biológica, en base a la Figura 3.

En la etapa S1 se suministra la muestra biológica a investigar, por ejemplo sangre de una persona sana, a la unidad de tratamiento 11, en la que se divide en una pluralidad de alícuotas 18n mediante el uso de un automuestreador. Las alícuotas se suministran a los pocillos de la placa de microtitulación 22 que tiene 96 pocillos. Después, el robot
35 desplaza la placa de microtitulación 22 a un lugar para insertar patrones internos, consumibles o disolventes. La determinación, sobre que patrones internos, consumibles o disolventes son necesarios para combinarse con una determinada alícuota se realiza en base a la información en función de los metabolitos que deben explorarse. En particular asignando el POE y el conjunto de parámetros correspondiente a una muestra o colección de muestras, se define y estandariza la forma de cómo manipular la muestra (o las muestras).

40 En la etapa S2, la información sobre los metabolitos que van a explorarse se introduce a través de la unidad de entrada 16, que se proporciona a la unidad de control 12. Basándose en esta información, la unidad de control 12 determina el conjunto de parámetros/POE que se utiliza para la preparación y separación de la muestra y para el análisis de espectrometría de masas de las muestras biológicas combinadas y separadas correspondientes. El conjunto de parámetros refleja las etapas de procesamiento y los parámetros del procedimiento operativo estándar (POE) correspondiente. La unidad de control 12 accede a la base de datos 13 que contiene datos de los conjuntos
45 de parámetros/POE necesarios para el tratamiento de una muestra biológica y para realizar el análisis de espectrometría de masas. Derivando un conjunto de parámetros/POE fuera de la base de datos 13 la unidad de control 12 determina como realizar la preparación de la muestra, derivatización y extracción de los metabolitos. Este conjunto de parámetros puede incluir valores de tiempo para el tratamiento, valores de temperatura para el calentamiento y el tipo de consumibles/disolventes, que deben combinarse con determinadas muestras etc.

50 Al usuario se le puede solicitar introducir información relacionada con el proyecto y la muestra en un sistema de gestión de información de laboratorio (LIMS), definir la lista de trabajo con los identificadores de muestra únicos, códigos de barras y asignar los procedimientos operativos estándar (POE). El LIMS puede utilizarse para rastrear las muestras biológicas durante la preparación, el tratamiento y el análisis de espectrometría de masas y para el control y gestión de calidad. En una realización, el LIMS puede comprender la unidad de entrada, control, procesamiento y
55 evaluación y la base de datos pero también puede realizarse como una unidad distinta con interfaces para las otras unidades.

En la etapa S5 las alícuotas 18n de la muestra biológica se combinan con al menos uno de un patrón interno, consumible y disolventes. En particular, es posible combinar diferentes consumibles/disolventes en cada alícuota.

Después de combinarse, la pluralidad de muestras o alícuotas combinadas se tratan en la etapa S6 dependiendo de los metabolitos que vayan a explorarse. La información sobre el tipo de metabolito que va a explorarse la introduce, por ejemplo, un usuario en la unidad de entrada 16. Adicionalmente es posible introducir la información sobre los metabolitos que van a explorarse a través de un dispositivo de lectura automatizado que lee, por ejemplo, un código de barras sobre el dispositivo que contiene la muestra biológica antes o durante el suministro a la unidad de tratamiento 11. El código de barras indica que metabolitos van a explorarse. El tratamiento se realiza en el sistema de manipulación de líquidos, que puede incluir extracción, de acuerdo con la polaridad de las mezclas de disolvente, adición de la muestra, el secado de la muestra sobre el soporte poroso, derivatización, secado y extracción por centrifugación (o al vacío). Después del tratamiento, la placa superior de la placa de microtitulación 22 se retira. La placa inferior contiene los metabolitos extraídos que se proporcionan para el análisis de espectrometría de masas.

En la etapa S7 el extracto de cada alícuota 18n se proporciona por separado al espectrómetro de masas 14 mediante el uso de un automuestreador.

En la etapa S8 se realiza la espectrometría de masas. El análisis de espectrometría de masas lo controla de una manera similar la unidad de control aplicando los parámetros correspondientes del conjunto de parámetros 14. Los parámetros definen el procedimiento de EM, tal como tiempos de espectro e ionización positiva o negativa para espectros de monitorización de múltiples reacciones (MRM), ión precursor y pérdida constante de fragmentos neutros. Además, en el conjunto de parámetros se incluyen todos los parámetros de identificación de metabolitos diana y patrones internos relacionados, tales como pares de masas y tolerancias de masas y de cuantificación, tal como la concentración de patrones internos, factores de respuesta, límite de detección e intervalo lineal. En la etapa S9 se recibe el resultado del análisis de espectrometría de masas.

Como se ha explicado anteriormente, cada extracto de una muestra de alícuota se proporciona individualmente al análisis de espectrometría de masas. Por tanto, las etapas S7 a S9 se realizan 96 veces ya que hay 96 pocillos en una placa de microtitulación 22.

Los resultados se reciben en la unidad de procesamiento 15. En la unidad de procesamiento 15 la etapa S10 se realiza incluyendo el procesamiento de datos, que incluye la filtración de interferencia, la filtración de resultados en base al contenido, cuantificación y anotación de los metabolitos detectados. Los resultados procesados y filtrados se almacenan en una base de datos 13 en la etapa S11. La unidad de procesamiento 15 detecta los metabolitos diana y los patrones internos correspondientes y calcula las concentraciones de los metabolitos, ya que se conocen las concentraciones del patrón interno de una muestra respectiva 18n. Después de calcular las concentraciones se realiza la filtración. Dado que existe una enorme cantidad de datos de espectrometría de masas, los resultados obtenidos requieren filtrarse, en el que para reducir las cantidades de datos pueden aplicarse diferentes métodos de filtración. Después, los datos filtrados se almacenan. Después de haber almacenado los resultados preparados o procesados del análisis de espectrometría de masas los resultados pueden compararse con valores de referencia, que están almacenados en la base de datos 13 en la etapa 12 para obtener la información, que indica una patología normal o patógena o la respuesta farmacológica a la intervención terapéutica.

Los resultados se producen en la etapa S13 mediante el uso de un monitor o una impresión. Basándose en la información, que puede obtenerse durante la comparación de los resultados de la espectrometría de masas con valores de referencia almacenados en una base de datos 13, la base de datos puede adaptarse. Este proceso de aprendizaje puede usarse para proporcionar una adaptación de los conjuntos de parámetros, que se usan para tratar las muestras biológicas para el análisis del perfil de metabolitos.

Con referencia a la Figura 4 se proporcionará un ejemplo para obtener una pluralidad de resultados para crear un perfil de metabolitos de una muestra biológica.

Se realizó un ensayo preclínico sobre la diabetes mellitus de tipo II aprovechando una estrategia de perfil de metabolitos cualitativa y cuantitativa para la caracterización metabólica de un modelo murino de enfermedad y descripción farmacodinámica detallada de una nueva clase de fármaco candidato. Se estudiaron seis grupos que consistían en ratones sanos y enfermos tratados, no tratados o tratados con un fármaco aprobado.

Los seis grupos están en la primera fila incluyendo un grupo enfermo (T2D), un grupo sano, un grupo enfermo tratado con un fármaco candidato, un grupo sano tratado con un fármaco candidato, un grupo enfermo tratado con un fármaco aprobado y un grupo sano tratado con un fármaco aprobado. Para cada grupo se ensayó un número de animales predeterminado. Para cada animal se utilizaron cuatro materiales como muestras biológicas. En esta realización, de cada animal se extrajo, una muestra de orina, una muestra de plasma, una muestra de glóbulos rojos y una muestra de hígado. Cada muestra se suministró al aparato de la invención y se ensayó en cuatro clases de metabolitos diferentes. Cada clase de metabolitos (aminas, carnitinas, azúcares, lípidos) se caracterizó mediante un procedimiento operativo estándar (POE) específico. Debe observarse que para analizar los glóbulos rojos se requiere un procedimiento diferente que para ensayar la orina. Además, los patrones internos, consumibles y disolventes a combinar son diferentes. Por último, el tratamiento y la separación de las alícuotas combinadas son

diferentes. Sin embargo, para realizar un ensayo corroborado cada muestra de cada grupo se explora mediante el uso de cuatro POE diferentes.

Después de realizar todo el procedimiento se obtuvieron más de 120.000 características cuantitativas de estos ensayos. Estas características cuantitativas requieren analizarse mediante el uso de procedimientos estadísticos. Adicionalmente, puede realizarse el uso de una exploración de datos de bases de datos conocidas.

Para obtener información para el perfil de metabolitos por LC-EM cualitativa, se separaron muestras de orina y plasma de ratón por cromatografía de fase inversa y se analizó con un espectrómetro de masas cuadrupolo con tiempo de vuelo (qTOF) equipado con una fuente de electropulverización. Se filtraron, se alinearon y se graduaron espectros originales, seguido de análisis estadístico de los datos. Para el análisis EM/EM dirigido cuantitativo, se obtuvieron muestras de orina, plasma, eritrocitos e hígado de ratón (aminoácidos, acilcarnitinas, azúcares) y se extrajeron por fase sólida o en solución de Folch (gluco y fosfolípidos) con un sistema de manipulación de líquidos y se analizó mediante inyección de flujo en combinación con espectros de monitorización de múltiples reacciones (MRM), ión precursor y pérdida constante de fragmentos, con una EM de triple cuadrupolo (QqQ) equipada con una fuente de electropulverización. Las concentraciones se calcularon a partir de los espectros de EM originales, se filtraron, se normalizaron (con respecto a creatinina, proteína total) y se graduaron, seguido de análisis estadístico e interpretación bioquímica de los metabolitos pre-anotados. El procedimiento se ilustra en la Figura 5.

El perfil de metabolitos dirigido cuantitativo se concentra en analitos (patrones internos) que se pre-definen, pre-anotan y detectan por espectros de MRM, ión precursor y pérdida constante de fragmentos neutros. El análisis por inyección de flujo (AIF) permite determinar el promedio de señal sobre una corriente continua de iones (TIC) que conduce a fuertes señales. Para la identificación de metabolitos y patrones internos asociados (IS) se usan transiciones de masa características. La eliminación de isótopos se usa para análisis de proteínas. Además, también se recomienda la corrección de isótopos para determinados compuestos y clases de molécula pequeña. Estos algoritmos utilizan porcentajes de isótopos calculados de analitos diana para corregir las intensidades de pico medidas por su solapamiento isotópico. Finalmente, se calculan las concentraciones de metabolitos relacionando las concentraciones conocidas de patrones internos con los recuentos de iones medidos por segundo (rps).

La metodología de perfil de metabolitos dirigida de la invención utilizada en un sistema de manipulación de líquidos para la preparación de muestras completamente automatizada y en paralelo en un formato de microtitulación garantiza una alta reproducibilidad y bajos coeficientes de variación (CV). Además, los analitos y metabolitos correspondientes se anotaron por adelantado para permitir la interpretación bioquímica y biológica rápida y directa.

Se obtuvieron hasta 825 metabolitos de cada compartimento y la comparación de los grupos permitió la identificación del modelo de enfermedad animal y facilitó la caracterización biológica inmediata de los efectos farmacológicos.

La Figura 6 ilustra el resultado de espectrometría de masas, en el que se muestran diferentes aminoácidos en comparación con picos de patrones internos conocidos (indicados con *).

El perfil de concentración de metabolitos dirigido facilita mayor rendimiento y la versatilidad de análisis estandarizados de diversos fluidos biológicos y tejidos, que es especialmente importante para caracterizaciones exhaustivas de enfermedad y valoraciones de eficacia y toxicidad en experimentos con modelos animales. Los marcadores directos o sustitutos, uni- o multi-variables se manifiestan por técnicas de extracción de datos con el objetivo de describir enfermedades a nivel molecular, que posteriormente a menudo se usan para estudiar cambios metabólicos y farmacodinámicos en diversos compartimentos y órganos.

En general, puede aplicarse la misma tecnología en las diversas fases del desarrollo de fármacos, variando de sistemas basados en células y modelos animales a estudios clínicos. Por ejemplo, supuestos biomarcadores descubiertos y verificados en la fase preclínica, tales como para la caracterización de procesos biológicos y patogénicos normales o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica, pueden validarse clínicamente con la misma tecnología analítica en estudios realizados en seres humanos. En una aplicación de diagnóstico deseada, los estudios clínicos tendrán que evaluar el comportamiento predictivo y el poder de generalización de biomarcadores candidatas en la rutina clínica, en la que típicamente se requiere una alta especificidad para descartar otras enfermedades.

Cada estudio satisfactorio sobre el descubrimiento de biomarcadores del perfil de metabolitos se basa en un diseño experimental cuidadosamente planificado con objetivos claros definidos, un plan detallado y procedimientos de control de calidad por adelantado, como es práctica habitual en los ensayos clínicos controlados. Los diseños experimentales bien concebidos maximizan la información obtenida de un proyecto experimental determinado produciendo conclusiones válidas y objetivas.

Los fallos y sesgos experimentales comprometen el comportamiento predictivo y el poder de generalización de biomarcadores estadísticamente determinados. En este contexto, el perfil de metabolitos debe aprender del pasado, en el que el diseño experimental insuficiente y la mala reproducibilidad en estudios tempranos de validación clínica han restringido el uso ampliamente generalizado de tecnologías de perfil de proteínas séricas.

Por supuesto, bajo el significado estadístico subyace el problema del significado biológico. Solo porque un cambio en la expresión o concentración sea estadísticamente significativo no siempre implica que el cambio tenga algún efecto sobre la biología subyacente. Algunos genes, proteínas o metabolitos están estrechamente regulados de tal manera que pequeños cambios en abundancia son biológicamente relevantes, mientras que otros están poco regulados y pueden variar considerablemente sin efecto biológico.

En resumen, cuando se realiza el análisis de un perfil de metabolitos de acuerdo con la invención puede analizarse una cantidad de cientos de metabolitos simultáneamente a partir de cantidades de microtitulación de material biológico a alta, velocidad, precisión y sensibilidad usando etapas preanalíticas. A partir de muestras individuales se generan datos de garantía de calidad (GC) en cuestión de minutos y se interpretan empleando herramientas de programación informática estadísticas de vanguardia. Este procedimiento también supera, hasta ahora, los cuellos de botella analíticos existentes a través de la estandarización y automatización preanalítica, e interpretación de datos bioquímicos y estadísticos de fácil manejo. Esta integración de todos los componentes en el procedimiento dentro de una nueva plataforma tecnológica marcará una "huella dactilar bioquímica" accesible para extender la aplicación y agilizará la difusión de la metabolómica.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Preparación y condiciones del dispositivo múltiple

Se preparó un dispositivo múltiple utilizando, como soporte poroso, aplicaciones de celulosa de 7 mm (cortadas de un cartón genérico - 10 539 859. Schleicher Schuell Biosciences GmbH. Dassel, Alemania) en cada uno de los 96 pocillos de una placa de microtitulación Solvinert (MSRP NO4. Millipore Corp. MA. USA). Estas se fijaron en el sitio con dispositivos de retención elaborados fabricados hechos con polipropileno (Biocrates, Tirol, Austria).

Para analizar un subconjunto de metabolitos seleccionado, en este caso, aminoácidos, acilcarnitinas y fosfolípidos de una muestra, se utilizó una selección de patrones internos adecuados de aminoácidos, acilcarnitinas y lípidos marcados con isótopos estables para representar los veinte aminoácidos proteogénicos, fosfatidilcolinas, esfingomielinas y especies liso de cada uno. Estos se embebieron previamente en el soporte poroso del dispositivo múltiple midiendo con pipeta cantidades conocidas de una clase de patrón interno, lo que permite que cada una se seque dentro del soporte poroso antes de añadir la siguiente mezcla de patrones internos, dejando secar y así sucesivamente. En este ejemplo se añadieron acilcarnitinas y después aminoácidos y finalmente una mezcla de patrones internos de fosfolípidos en una solución acuosa que contenía polietilenglicol 1000 (PEG 1000) al 0,1% p/p, un compuesto que se utilizó con doble propósito. Como un tensioactivo, PEG 1000 reside en los poros del soporte poroso que reviste todos los patrones internos ofreciendo una barrera protectora contra acciones, de algún modo degradativas, de exposición a oxígeno y agua.

Después, cuando se secó por completo, las muestras de validación técnica del dispositivo múltiple se añadieron a los cinco primeros pocillos del dispositivo múltiple.

Pocillo 1: un blanco,
 Pocillos 2 y 3: mezclas control de metabolitos no marcados;
 Pocillo 4: un control de calidad con metabolitos a baja concentración (niveles normales o 1 vez), y
 Pocillo 5: un control de calidad con metabolitos a alta concentración (niveles 10 veces lo normal).

El dispositivo múltiple, que contenía patrones internos previamente embebidos con muestras de control adicionales en los pocillos 1 a 5, se conservó después listo para su uso a 4 °C.

Procedimiento de uso del dispositivo múltiple

[Ejemplo 1]

Únicamente como ejemplo, lo siguiente es una descripción de cómo se usa el dispositivo, especificado anteriormente, para procesar muestras para análisis de una selección de metabolitos.

Para analizar un subconjunto de metabolitos, aminoácidos, acilcarnitinas y fosfolípidos de una muestra, se utilizó una selección de patrones internos adecuados de aminoácidos acilcarnitinas y lípidos, marcados con isótopos estables para representar los veinte aminoácidos proteogénicos, las acilcarnitinas y los fosfolípidos más abundantes, incluyendo fosfatidilcolinas, fosfoesfingomielinas y especies liso de cada uno. Después añadir una cantidad predefinida de muestra, típicamente 10 µl de plasma, los patrones internos y aminoácidos de la muestra se mezclaron dentro de los confines de los poros del inserto. Cualquier tratamiento posterior que produzca la pérdida o degradación de metabolitos será por lo tanto correlacionado por el patrón interno. La derivatización de los aminoácidos puede tener lugar dentro de los confines de los poros del inserto. El reactivo derivatizante en este ejemplo consiste en 15 µl de fenilisotiocianato al 5% en una solución 1:1:1 de piridina, agua, etanol. Este proceso de derivatización se produce a temperatura ambiente en menos de 20 minutos. Como la solución de derivatización es completamente volátil esta puede eliminarse simplemente con un vapor suave de nitrógeno o al vacío a temperatura

ambiente. La adición de una solución de metanol que contiene acetato de amonio 10 mM extrae los aminoácidos derivatizados, las acilcarnitinas y los fosfolípidos simultáneamente del dispositivo poroso dentro del disolvente metanol. La placa de microtitulación de elección para esta finalidad tiene propiedades adicionales. Tiene un filtro de 0,45 micrómetros y una salida de líquidos, que solo se abre bajo fuerza centrífuga o al vacío, construida en la base de cada pocillo. El extracto de metanol de la muestra se recoge después simplemente por centrifugación en una placa de microtitulación de captura, colocada debajo del dispositivo que contiene la placa de microtitulación. Después se realiza el análisis de espectrometría de masas de la solución de cada pocillo, típicamente utilizando un instrumento de automuestreo para suministrar la muestra al espectrómetro de masas.

[Ejemplo 2]

10 A continuación se demostrará que el dispositivo puede usarse para procesar muestras para análisis de una selección de metabolitos.

Después una adición exacta de 10 μ l de muestras de sangre de un paciente a cada pocillo del dispositivo múltiple se mezcló con los patrones internos dentro de los confines de los poros del soporte poroso (inserto). Por lo tanto, cualquier tratamiento posterior que produzca la pérdida o degradación de metabolitos estará correlacionado con el patrón interno. La derivatización puede realizarse con en el Ejemplo 1 y las soluciones resultantes de cada pocillo se analizan después mediante procedimientos de espectrometría de masas, típicamente utilizando un instrumento automuestreador para suministrar la muestra al espectrómetro.

Los resultados de las mediciones de la espectrometría de masas de los metabolitos derivatizados y extraídos con el dispositivo múltiple se representan gráficamente en las Figuras 8 y 9, que muestran los aminoácidos, los fosfolípidos y las acilcarnitinas, respectivamente.

Las cantidades de los metabolitos de aminoácidos y acilcarnitinas se muestran en la Tabla 3, que también muestra la precisión y la varianza de los valores obtenidos usando el dispositivo múltiple.

Tabla 3 – Las cantidades exactas y la reproducibilidad de los aminoácidos, lípidos, lactato, creatinina y glucosa de una sola muestra medida 10 veces se muestra en la Tabla 3 y se obtuvieron usando el dispositivo múltiple.

Aminoácidos

Nombre de la Muestra	GCBaja C2	GCBaja C3	GCBaja C4	GCBaja C5	GCBaja C6	GCBaja C7	GCBaja C8	GCBaja C9	C.Permitt C10	C.Permitt C11	GCBaja C12	Media [μmol/l]	dtp	VC [%]
Arginina-PTC	64,8	71,0	67,5	68,7	62,3	63,1	67,9	65,6	67,4	66,5	63,7	66,2	2,6	4,0
Fenilalanina-PTC	74,0	71,6	72,1	81,5	70,1	69,2	70,4	73,6	72,5	72,9	76,2	73,1	3,4	4,7
Prolina-PTC	114,4	117,1	124,5	120,4	120,2	120,6	137,2	118,2	127,5	126,3	120,6	122,5	6,2	5,1
Lisina-PTC	102,2	94,4	108,4	110,5	93,0	102,1	102,1	98,1	98,9	101,8	102,1	101,2	5,2	5,1
Histidina-PTC	90,0	97,0	95,4	89,4	93,0	89,2	97,7	82,5	88,5	95,3	100,6	92,6	5,2	5,6
Triptófano-PTC	35,8	39,0	42,7	38,2	36,6	36,6	37,4	38,9	34,8	34,8	35,7	37,3	2,3	6,2
Tirosina-PTC	93,4	99,9	95,7	92,7	94,8	103,7	95,2	97,2	198	87,4	83,6	93,6	6,0	6,4
α-Leucina-PTC	174,5	181,2	158,1	191,9	164,1	153,8	167,5	157,2	150,2	158,6	157,1	164,9	12,8	7,8
Valina-PTC	117,0	96,9	108,7	121,7	116,3	114,6	115,7	134,2	111,7	116,9	121,0	115,9	9,1	7,9
Ornitina-PTC	78,7	81,7	58,8	67,9	69,3	68,9	71,6	68,9	74,8	74,9	74,4	71,8	6,2	8,6
Metionina-PTC	44,4	38,2	34,9	41,5	44,7	38,8	37,8	43,2	36,2	36,0	36,3	39,3	3,6	9,1
Citrulina-PTC	28,3	24,8	28,0	23,5	20,6	25,2	26,1	25,0	28,0	294	25,8	25,9	2,5	9,7
Glutamina-PTC	455,8	455,6	445,7	364,4	352,0	372,8	369,0	374,2	3220	355,7	369,1	385,1	45,6	11,8
Serina-PTC	182,1	153,7	176,7	177,1	191,9	188,5	173,4	137,8	132,6	134,0	154,9	163,9	22,1	13,5
Treonina-PTC	21,3	26,0	31,0	34,4	23,5	29,5	25,7	29,4	250	24,2	29,0	27,2	3,8	14,0
Alanina-PTC	219,6	316,7	227,8	282,3	298,7	267,5	205,8	177,8	203,0	245,4	210,9	241,4	44,4	18,4
Asparagina-PTC	236,4	250,9	204,5	179,4	168,4	136,5	170,1	192,4	230,5	206,7	157,0	193,9	35,7	18,4
Glicina-PTC	320,9	282,0	272,0	297,9	412,6	422,9	252,8	268,5	225,1	8922	278,0	296,3	66,2	22,4
Ácido glutámico-PTC	2115,4	1508,6	1694,6	1220,8	2118,8	1560,0	2137,9	2770,8	2137,9	1563,6	1984,8	1892,1	431,0	22,8

Acilcarnitinas

Nombre de la muestra	GCBaja C2	GCBaja C3	GCBaja C4	GCBaja C5	GCBaja C6	GCBaja C7	GCBaja C8	GCBaja C9	GCBaja C10	C.Permitt C11	GCBaja C12	Media [μmol/l]	dtp	VC [%]
C2	8,487	9,674	9,529	9,007	8,845	9,105	9,847	9,477	9,928	8,552	9,137	9,24	0,49	5,4
C18:1	0,161	0,233	0,218	0,216	0,193	0,193	0,207	0,225	0,205	0,191	0,180	0,20	0,02	10,4
C8:1	0,161	0,233	0,218	0,216	0,193	0,193	0,207	0,225	0,205	0,191	0,180	0,20	0,02	10,4
C0	38,351	48,949	51,179	53,867	53,869	52,218	61,745	60,195	56,018	52,762	56,524	53,24	6,21	11,7
C12-DC	0,021	0,015	0,017	0,013	0,015	0,017	0,015	0,017	0,016	0,017	0,017	0,02	0,00	12,4
C14:2	0,041	0,050	0,044	0,035	0,047	0,052	0,041	0,050	0,035	0,047	0,045	0,04	0,01	13,1
C8	0,232	0,306	0,352	0,274	0,200	0,212	0,264	0,250	0,258	0,276	0,299	0,27	0,04	16,4
C12	0,043	0,051	0,071	0,047	0,043	0,043	0,044	0,048	0,046	0,045	0,055	0,05	0,01	16,7
C12:1	0,028	0,025	0,030	0,031	0,027	0,035	0,035	0,030	0,040	0,034	0,019	0,03	0,01	18,6
C16:1	0,038	0,016	0,036	0,037	0,030	0,035	0,030	0,033	0,024	0,030	0,035	0,03	0,01	20,2
C3	0,293	0,401	0,524	0,376	0,274	0,324	0,309	0,435	0,423	0,473	0,423	0,39	0,08	20,5
C14:1	0,110	0,106	0,103	0,113	0,113	0,141	0,174	0,118	0,172	0,108	0,117	0,13	0,03	20,6
C4:1	0,110	0,106	0,103	0,113	0,113	0,141	0,174	0,118	0,172	0,108	0,117	0,13	0,03	20,6
C7-DC	0,050	0,036	0,044	0,052	0,040	0,039	0,066	0,055	0,036	0,064	0,041	0,05	0,01	22,5
C5-M-DC	0,192	0,204	0,184	0,202	0,191	0,209	0,210	0,316	0,177	0,136	0,160	0,20	0,05	22,7
C4-0H	0,106	0,080	0,100	0,167	0,138	0,129	0,170	0,151	0,175	0,115	0,121	0,13	0,03	23,7
C11	0,006	0,008	0,010	0,010	0,013	0,008	0,010	0,007	0,012	0,008	0,006	0,01	0,00	23,9
C16	0,136	0,204	0,188	0,169	0,127	0,096	0,132	0,137	0,100	0,124	0,178	0,14	0,04	24,6
C4:1-DC	0,148	0,182	0,241	0,167	0,111	0,097	0,165	0,146	0,226	0,127	0,218	0,17	0,05	28,3

Lípidos

Nombre de la Muestra	GCBaja C2	GCBaja C3	GCBaja C4	GCBaja C5	GCBaja C6	GCBaja C7	C. Permit C8	C. Permit C9	GCBaja C10	GCBaja C11	GCBaja C12	Media [μmol/l]	dtp	VC [%]
GPCho 36:3a	190,12	219,29	195,68	224,001	250,66	236,77	231,16	199,46	207,93	210,60	198,76	214,9	19,2	8,9
SM α18:1/16:0	311,11	387,86	330,25	339,33	346,71	381,94	419,57	307,61	337,20	348,34	380,74	353,7	34,8	9,8
GPCho 36:2e	22,84	25,00	20,99	22,67	21,71	21,29	23,19	23,91	27,44	19,20	21,12	22,7	2,2	9,9
GPCho 32:1a	55,79	50,54	58,33	55,17	58,33	67,42	64,89	62,50	67,03	56,25	48,00	58,6	6,4	10,9
GPCho 32:0a	7,69	7,37	7,73	5,20	7,87	6,71	7,82	6,63	7,74	9,23	7,07	7,4	1,0	13,6
LGPCCho 18:2a	6,17	6,43	6,17	6,00	8,55	6,45	6,52	4,35	7,93	7,28	6,21	6,6	1,1	16,7
GPCho 34:1p	76,84	76,34	87,50	93,10	73,96	82,02	80,85	127,50	82,42	83,33	82,00	86,0	14,7	17,2
GPCho 36:1p	243,16	268,82	354,16	327,59	300,00	277,53	288,30	425,00	290,11	269,79	259,00	300,3	51,8	17,3
LGPCCho 18:1p	160,00	174,19	215,28	168,97	165,62	180,90	156,38	257,50	180,22	138,54	164,00	178,3	32,4	18,2
LGPCCho 18:0e	40,24	47,37	51,38	43,35	47,19	65,10	53,63	59,64	50,97	67,69	37,88	51,3	9,7	18,8
GPCho 38:1a	18,95	21,51	29,17	17,24	25,00	22,47	28,72	25,00	26,37	25,00	34,00	24,9	4,8	19,3
LGPCCho 18:0p	17,28	28,57	21,61	16,67	24,34	21,94	27,54	19,02	17,68	26,49	18,01	21,7	4,4	20,2
GPCho 30:0a	11,73	21,43	12,35	12,67	14,47	14,19	15,22	9,78	13,41	15,89	16,15	14,3	3,0	21,2
GPCho 38:2a	41,86	56,25	63,42	80,00	65,85	87,50	78,12	82,35	70,27	79,31	50,00	68,6	14,6	21,3
GPCho 34:0e	6,79	8,57	6,79	9,33	11,84	9,03	11,59	13,04	12,20	10,60	9,32	9,9	2,1	21,3
GPCho 32:1p	25,26	15,05	30,56	19,54	19,79	22,47	22,34	23,75	16,48	17,71	16,00	20,8	4,6	22,3
GPIns 38:4	13,52	20,27	15,11	14,77	10,75	17,97	16,27	15,24	15,62	13,51	11,61	15,0	2,7	18,0
GPIns 36:2	7,32	5,48	4,00	8,00	3,58	5,22	6,78	6,35	6,88	4,32	3,23	5,6	1,6	29,2

Lactato, Glucosa y Creatinina

Nombre de la Muestra	GCBaja C2	GCBaja C3	GCBaja C4	GCBaja C5	GCBaja C6	GCBaja C7	GCBaja C8	GCBaja	GCBaja C10	GCBaja C11	GCBaja C12	Media [μmol/l]	dtp	VC [%]
Lactato	21513	24282	25798	25443	22912	22519	23778	21673	22400	24968	23625	25537	1473	6,3
Glucosa	3826	4250	4383	4104	4235	4288	4486	4156	3949	3983	3981	4149	202	4,9
Creatinina	213,62	270,39	247,02	243,48	242,64	233,51	280,19	263,16	262,74	238,50	244,91	249,1	18,7	7,5

[Ejemplo 3]**Monitorización terapéutica de fármacos**

Después de un trasplante se requieren inmunosupresores para inhibir el rechazo de órganos. Los inmunosupresores utilizados son Everolimus, Ciclosporina A, Tacrolimus, Sirolimus y ácido Micofenólico. Los resultados de la monitorización terapéutica de fármacos preparados a partir de un dispositivo múltiple preparado adecuadamente, como se describe anteriormente de manera similar, se muestra aquí para ilustrar adicionalmente el uso del dispositivo múltiple y respalda las reivindicaciones de la invención.

Preparación y condiciones del dispositivo múltiple

Este dispositivo múltiple se preparó exactamente con el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, pero en cambio utilizando, como soporte poroso, una sola aplicación de celulosa de 8 mm (corte de cartón genérico - 10 539 859, Schlicher Schuell, Biosciences GmbH, Dassel, Alemania).

En los pocillos de dos dispositivos múltiples se colocó una solución de metanol (20 μ l) que contenía Everolimus (200 ng/ml) (Sigma, Viena, Austria), un patrón interno para Sirolimus y Tacrolimus y Ciclosporina D (400 ng/ml) (Sigma, Viena, Austria), un patrón interno para Ciclosporina A, se pipeteó (pipeta Gilson 20 μ l) sobre el soporte poroso del dispositivo múltiple y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de calibración y los niveles de control de calidad I-V (conjunto de calibrador de sangre completa (nivel 0-6) para inmunosupresores, control de sangre completa ClinChek R para inmunosupresores, Recipe Chemicals and Instruments GmbH, Munich, Alemania) se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y ambos se conservaron a -20 °C. Antes del uso, seis soluciones de calibración con concentraciones en aumento de Ciclosporina D y Everolimus y cinco soluciones de control de calidad con diversas concentraciones de Ciclosporina A, Tacrolimus, Sirolimus y Everolimus se descongelaron y se dejaron llegar a temperatura ambiente alrededor de 23 °C. En seis pocillos se pipetearon 20 μ l de cada uno de los seis calibradores (pipeta Gilson 20 μ l) sobre el soporte poroso del dispositivo múltiple. Los cinco controles de calidad se pipetearon en cinco soportes porosos de pocillos distintos del dispositivo múltiple. Al dispositivo múltiple se añadió acetonitrilo (de calidad HPLC) inmediatamente (pipeta Gilson 200 ml) sobre los soportes porosos de los dispositivos múltiples e instantáneamente se agitaron con un agitador orbital a menos de 600 rpm durante 30 minutos. El eluente se recogió colocando una placa captura de microtitulación de capacidad 300 μ l debajo del dispositivo y después por centrifugación de dos a 500 g durante 6 minutos. Después, el eluente se analizó mediante una técnica de espectrometría de masas basada en el procedimiento publicado (T. Koal, M. Deters, B. Casetta, V. Kaefer, Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 15 de junio de 2004, 805(2); 215-222). En la Figura 10 se presenta un ejemplo representativo de cómo se obtienen y calculan los resultados del análisis de Ciclosporina A con CLEM para generar datos cuantitativos. Las áreas bajo los picos integrados del patrón interno Ciclosporina D se usaron para comparación frente al área bajo el pico de la Ciclosporina A inmunosupresora en las cinco muestras de control de calidad que contenían cantidades conocidas.

Las Figuras 11 a 14 muestran curvas patrón lineales de los cuatro inmunosupresores, Ciclosporina A, Tacrolimus, Everolimus y Sirolimus utilizando soportes de celulosa como insertos dentro del dispositivo múltiple. La Tabla 4 muestra la concentración calculada y la real para comparaciones precisas de los cinco materiales de garantía de calidad analizados.

	Concentración de Analito (ng/ml)	Concentración Calculada (ng/ml)	Precisión (%)			Concentración de Analito (ng/ml)	Concentración Calculada (ng/ml)	Precisión (%)
Ciclosporina A	Calibrador0	0,2	0,201	101	Sirolimus	Calibrador0	0 Sin Pico	N/A
	Calibrato1	46,7	43,8	93,7		Calibrato1	2,4	2,81
	Calibrador2	115	116	101		Calibrador2	6,6	6,38
	Calibrador3	304	315	103		Calibrador3	12,7	12,8
	Calibrador4	483	472	97,7		Calibrador4	19,6	19,6
	Calibrador5	777	820	106		Calibrador5	29	31,5
	Calibrador6	1940	1900	97,9		Calibrador6	49,4	46,7
	GC1	61	45,3	74,2		GC1	3,04	2,46
	GC2	116	95,5	82,3		GC2	8,65	10,1
	GC3	254	220	86,7		GC3	15,3	12,6
	GC4	474	391	82,6		GC4	0 Sin Pico	N/D
	GC5	1340	1310	98,1		GC5	0 Sin Pico	N/D
Tacrolimus	Calibrador0	0,1	Sin Pico	N/D	Everolimus	Calibrador0	0 <0	N/D
	Calibrador1	2,1	2,17	103		Calibrato1	2,1	2,46
	Calibrador2	5,6	5,38	96		Calibrador2	6	5,71
	Calibrador3	10,9	10,5	95,9		Calibrador3	12,3	12,5
	Calibrador4	15,8	16,1	102		Calibrador4	18,2	18,3
	Calibrador5	21,9	22	101		Calibrador5	25,3	27,1
	Calibrador6	38,8	38,9	100		Calibrador6	46,5	44,4

(continuación)

		Concentración de Analito (ng/ml)	Concentración Calculada (ng/ml)	Precisión (%)			Concentración de Analito (ng/ml)	Concentración Calculada (ng/ml)	Precisión (%)
	GC1	3,23	3,69	114		GC1	3,48	3,18	91,3
	GC2	6,6	7,35	111		GC2	11,1	10,8	97,3
	GC3	13,2	14,8	112		GC3	18,2	18,5	102
	GC4	0	0,246	N/D		GC4	0	Sin Pico	N/D
	GC5	0	0,355	N/D		GC5	0	Sin Pico	N/D

Aplicabilidad industrial

- 5 La invención hace posible un análisis versátil y estandarizado de diversos fluidos biológicos y tejidos. Por ejemplo, habilidades actuales internas pueden demostrar la preparación y el análisis de muestras simultáneas y completamente automatizadas generando más de 100 puntos de datos cuantitativos y anotados de 10 μ l de sangre seca a los 6 minutos de tiempo de aparato de EM incluyendo diversas clases de metabolitos dentro de más de 100 rutas anotadas. Por lo tanto, por primera vez, la supera la mayoría de los cuellos de botella en (pre)analítica, automatización y procesamiento e interpretación de datos que ha prohibido hasta ahora la extracción de datos metabolómica cuantitativa.
- 10 En comparación con los procedimientos y dispositivos analíticos de la técnica anterior, el análisis cuantitativo de la invención es extremadamente fuerte y los resultados son muy reproducibles. En particular, los datos de metabolitos son mucho mejores que los datos de proteoma y transcriptoma comparables. Solo se necesitan 10 μ l de sangre o suero o 20 μ l de orina o menos de 100.000 células cultivadas.
- 15 Las características de funcionamiento del procedimiento analítico y del dispositivo pueden cumplir con la aplicación de investigación (descubrimiento) y posteriormente con patrones de diagnóstico clínicos. Esto garantiza o posibilita datos de garantía de calidad, datos estandarizados que son comparables entre laboratorios, un tiempo de respuesta rápido, una implementación "ya lista" (aciertos), interpretación y visualización de datos fácilmente recibidos y un grado muy elevado de automatización y estandarización (POE). Los costes/puntos de datos globales hacen que los órdenes de magnitud de la información metabolómica sean menos costosos que los de la información de proteoma.
- 20 La información cuantitativa obtenida por el procedimiento o el dispositivo de la invención incluye rutas y metabolitos en un contexto sistémico (biología de sistemas) y de una manera gradual. Por lo tanto, finalmente puede obtenerse una imagen funcional representativa o una captura de pantalla o huella dactilar metabólica del metabolismo intermedio a partir de matrices de metabolitos marcadores.
- 25 Además, la información de valoración funcional que está anotada y que puede asociarse convenientemente a fuentes de información del proteoma, transcriptoma y genoma, necesita reclutar información metabolómica para biología de sistemas. El dispositivo y el método pueden usarse en una herramienta integrada (programación informática y analítica) adecuada para establecer un nuevo "patrón" para la generación simultánea de perfiles de metabolitos identificados y anotados cuantitativos a gran escala y el estudio de patrones biomarcadores dinámicos múltiples y complejos. Además, componentes hardware disponibles en el comercio, que consisten en un sistema de manipulación de líquidos para preparación de muestras automatizada y estandarizada y un espectrómetro de masas para analítica EM-EM, pueden integrarse mediante programación informática de aplicación y productos basados en consumibles diseñados protegidos y patentados, que comprenden procedimientos (pre-) analíticos y módulos innovadores para el procesamiento de datos de control de calidad, validación técnica y documentación, análisis estadísticos e interpretación bioquímica.
- 30 El tiempo de preparación de muestras de la presente invención (basado con éxito en lotes de 90 muestras/bandeja de microtitulación) apenas es de 2 horas y se reducirá adicionalmente mediante la paralelización a través de un programa informático de planificación. Una amplia serie de patrones internos específicos para la cuantificación se pre-formula en química patentada como parte integral de usualmente una o dos preparación de reacción en etapas y aciertos de aplicación, ya que contiene todo el material necesario para CC y GC en combinación con programación informática y POE.
- 35 Las aplicaciones industriales incluyen el descubrimiento y la comercialización de biomarcadores con el objetivo de utilizar biomarcadores validados para diagnósticos de enfermedades, eficacia o toxicidad de tratamiento. Las principales aplicaciones en el desarrollo farmacéutico incluyen las áreas del metabolismo de fármacos y farmacocinética, toxicología y seguridad, eficacia farmacológica y farmacodinámica. Otros campos comprenden diagnósticos clínicos y tratagnosis, en los que, por ejemplo, diagnósticos tempranos, sensibles y específicos y graduación precisa facilitan la prevención de enfermedades en lugar de intervenciones costosas y permiten el tratamiento personalizado y en el que los efectos terapéuticos puede monitorizarse específicamente respaldando un tratamiento personalizado. Otras áreas de aplicación incluyen, pero sin limitación, industria de la nutrición, sanidad, seguridad interior y biología básica.
- 40
- 45

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (10) para analizar fármacos y/o metabolitos en una muestra biológica que comprende:

- una unidad de entrada (16) para introducir el tipo de fármaco y/o metabolito a explorar;

5 - una unidad de control (12) para determinar un conjunto de parámetros (21) para la preparación de fármacos y/o de metabolitos y para el análisis por espectrometría de masas dependiendo de la entrada del tipo de fármaco y/o metabolito a explorar;

- una unidad de tratamiento (11) para preparar los fármacos y/o los metabolitos a explorar dependiendo del conjunto de parámetros determinado (21), comprendiendo la unidad de tratamiento (11):

(a1) un sistema de manipulación de líquidos automatizado, y

10 (a2) un robot que manipula un dispositivo múltiple y que manipula la introducción de uno o más patrones internos, consumibles o disolventes en los pocillos del dispositivo múltiple, comprendiendo adicionalmente el dispositivo múltiple:

(i) al menos un inserto (2) que comprende un soporte poroso en cuyo interior se integran uno o más patrones internos en estado seco y encontrándose encima de la base de un pocillo (1) y

15 (ii) un dispositivo de retención (3) para disponer el inserto (2) en el interior del pocillo (1) sin ningún contacto directo entre el inserto (2) y el pocillo (1);

en el que el tratamiento se realiza en el sistema de manipulación de líquidos, que incluye la extracción de acuerdo con la polaridad de las mezclas del disolvente, la adición de la muestra, el secado de la muestra sobre dicho soporte poroso, la derivatización, el secado y extracción por centrifugación o al vacío,

20 - un espectrómetro de masas (14) para realizar análisis por espectrometría de masas sobre los fármacos y/o metabolitos preparados dependiendo del conjunto de parámetros (21);

- una unidad de procesamiento (15) para procesar los datos recibidos del análisis por espectrometría de masas;

25 - una base de datos (13) para almacenar los resultados procesados del análisis por espectroscopía de masas y conjuntos de parámetros (21) para la preparación de fármacos y/o metabolitos y para los análisis por espectrometría de masas;

- una unidad de evaluación (20) para comparar los resultados procesados del análisis por espectrometría de masas con resultados de referencia almacenados en la base de datos (13).

30 2. El aparato como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la unidad de procesamiento (15) es para al menos una de las etapas de filtración de datos, cálculo de concentración, normalización, verificación y anotación de resultados de espectrometría de masas.

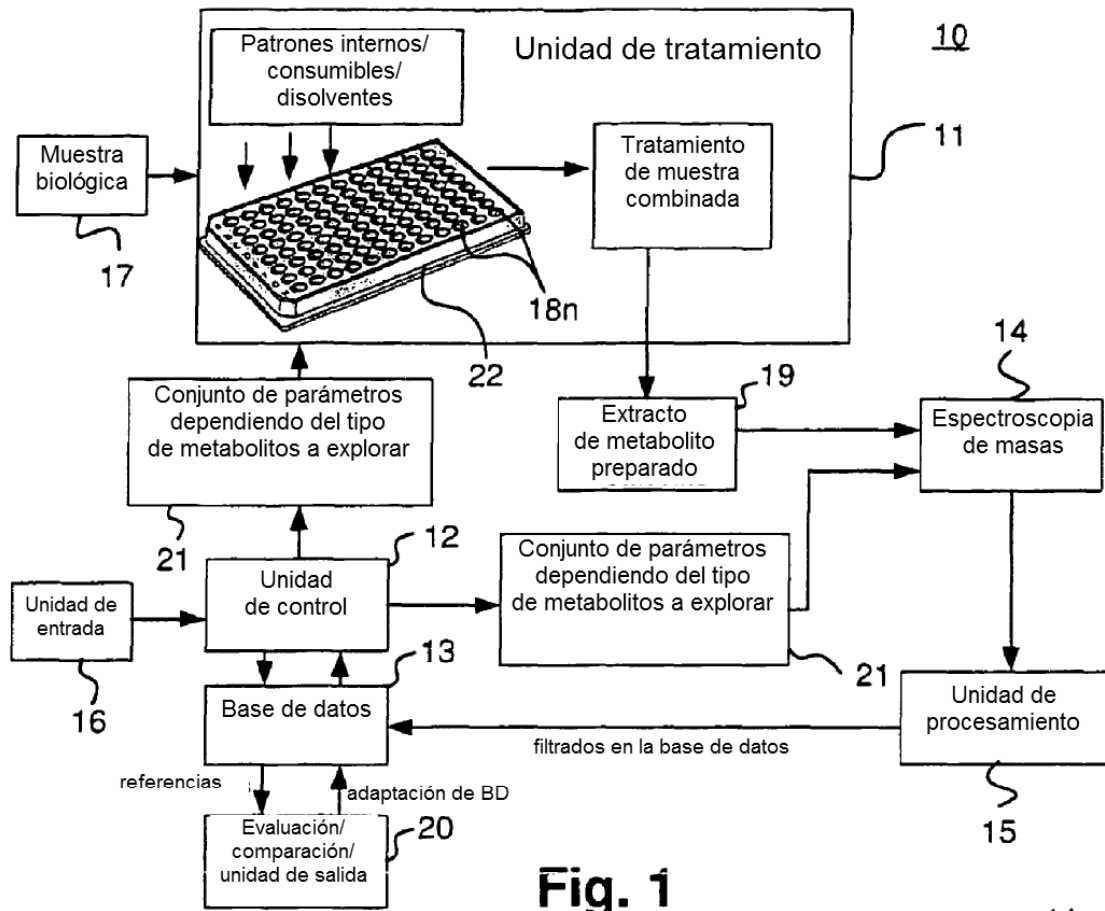


Fig. 1

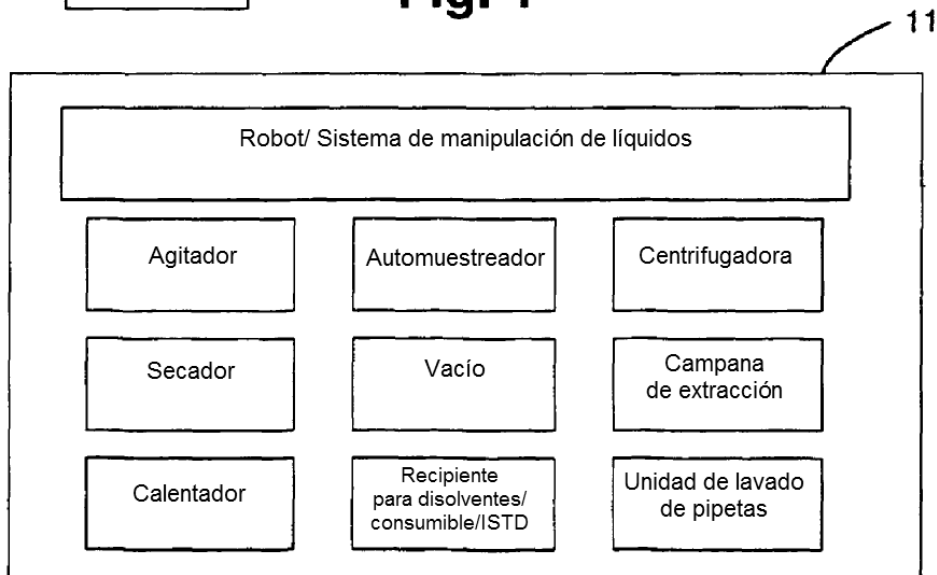


Fig. 2

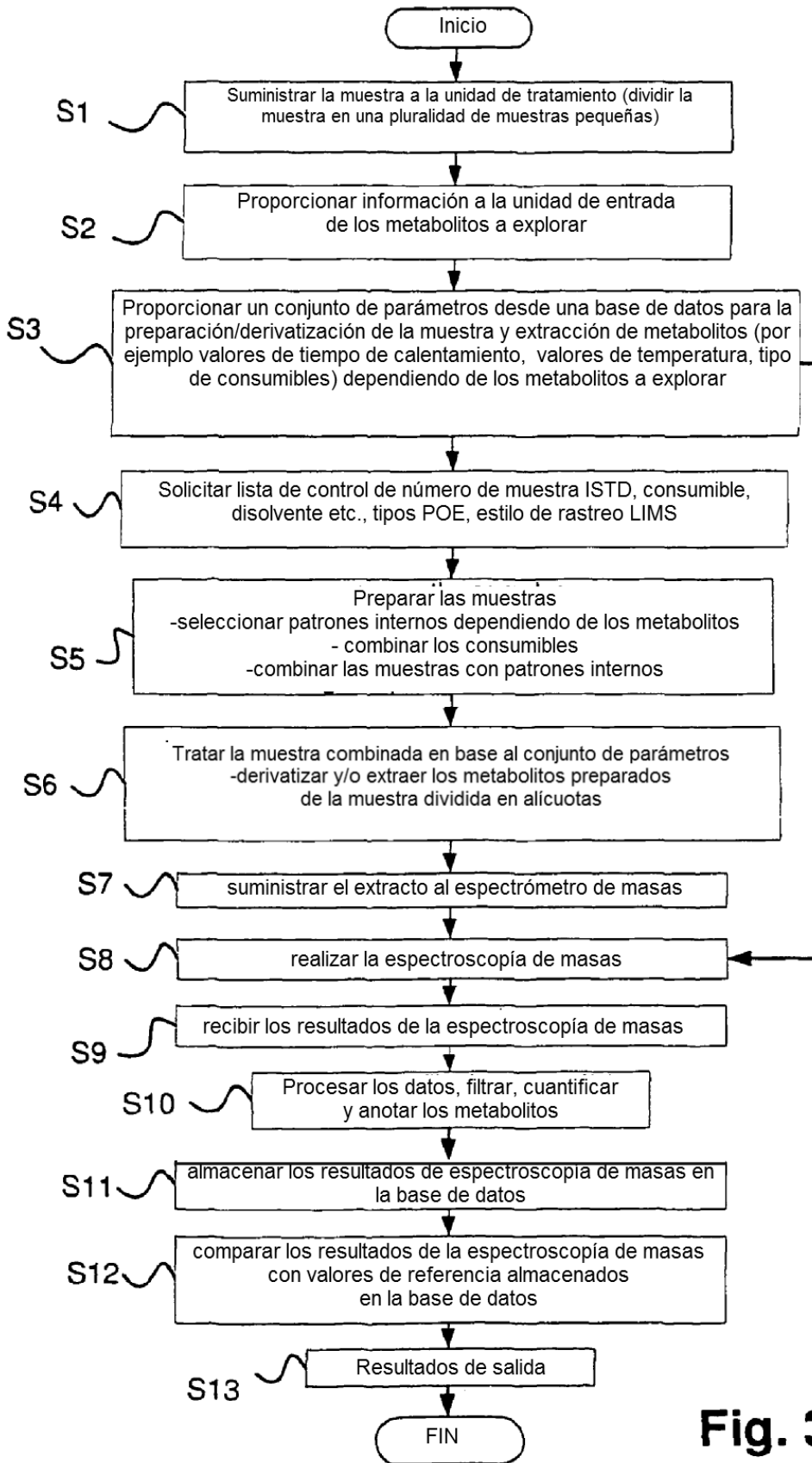


Fig. 3

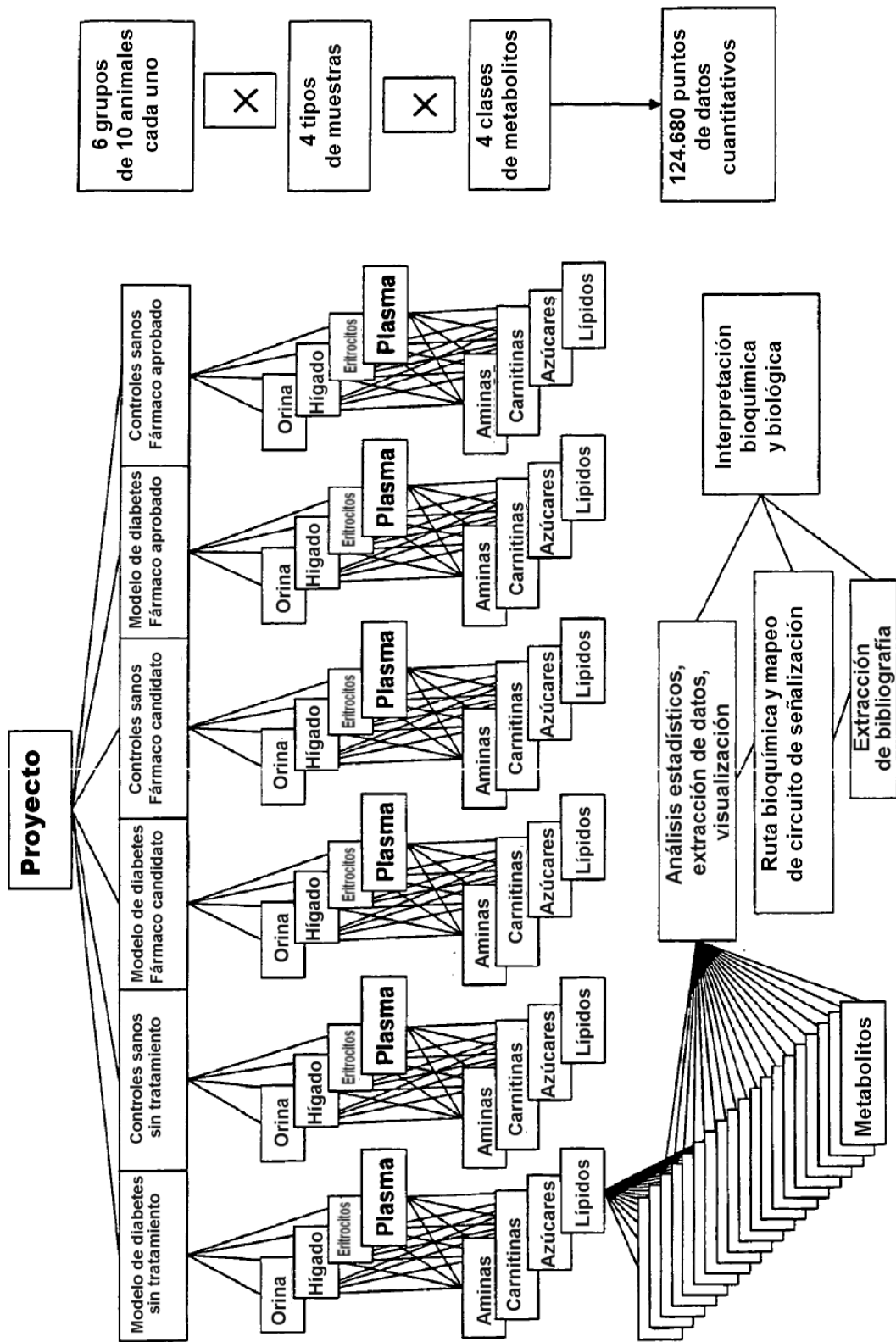


Fig. 4

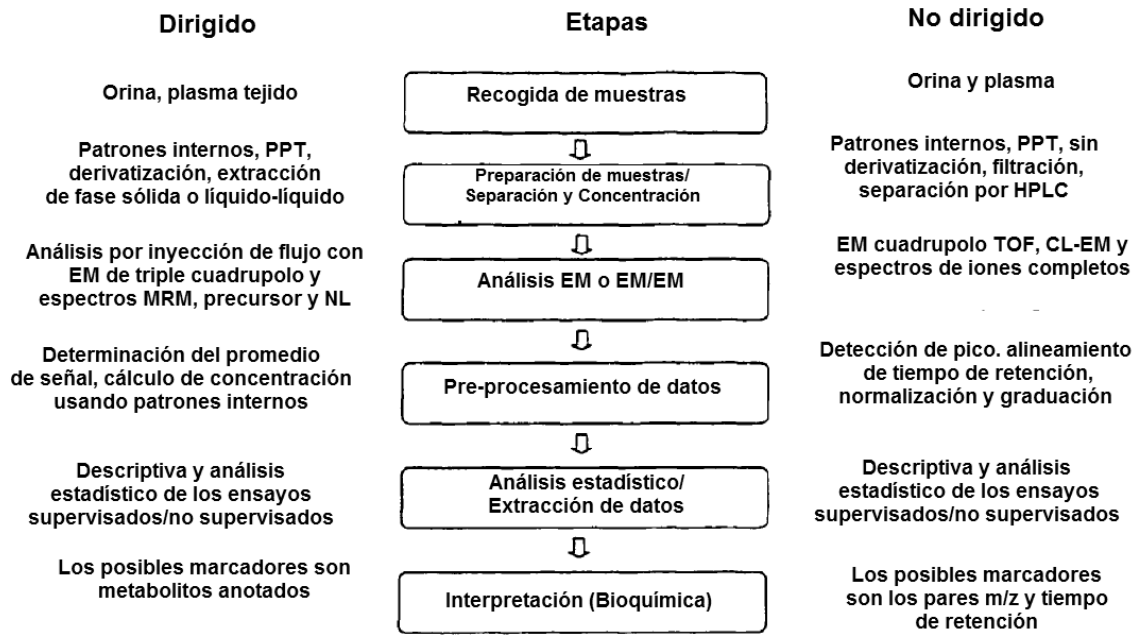


Fig. 5

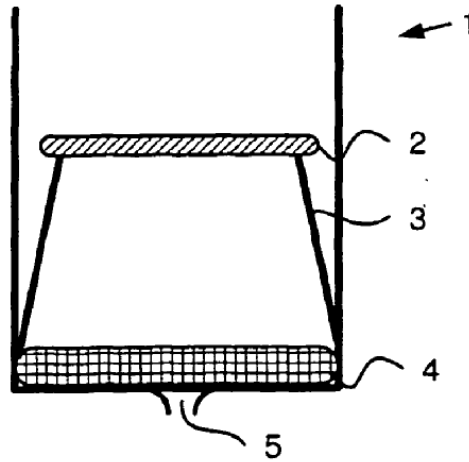


Fig. 7

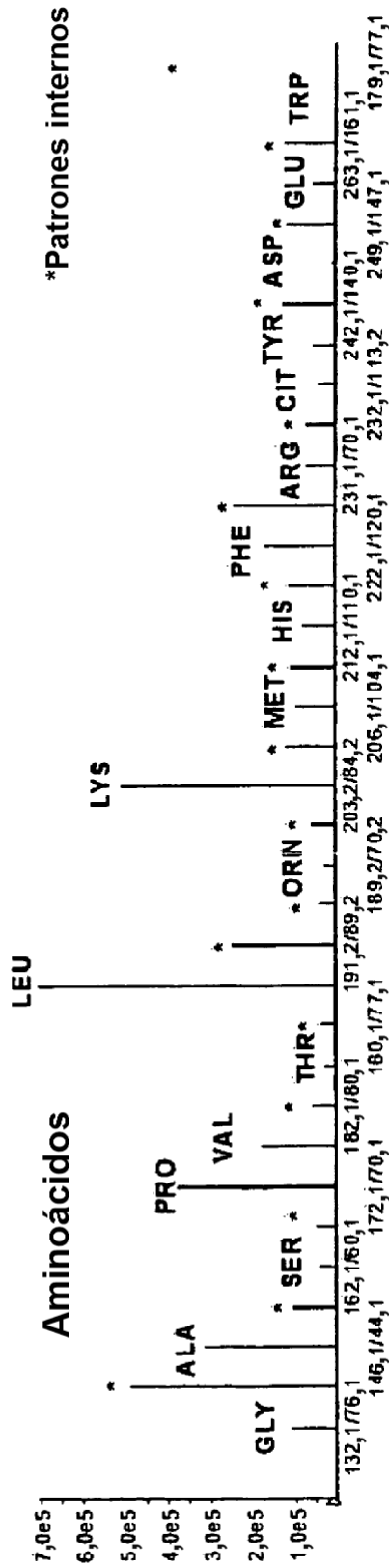


Fig. 6

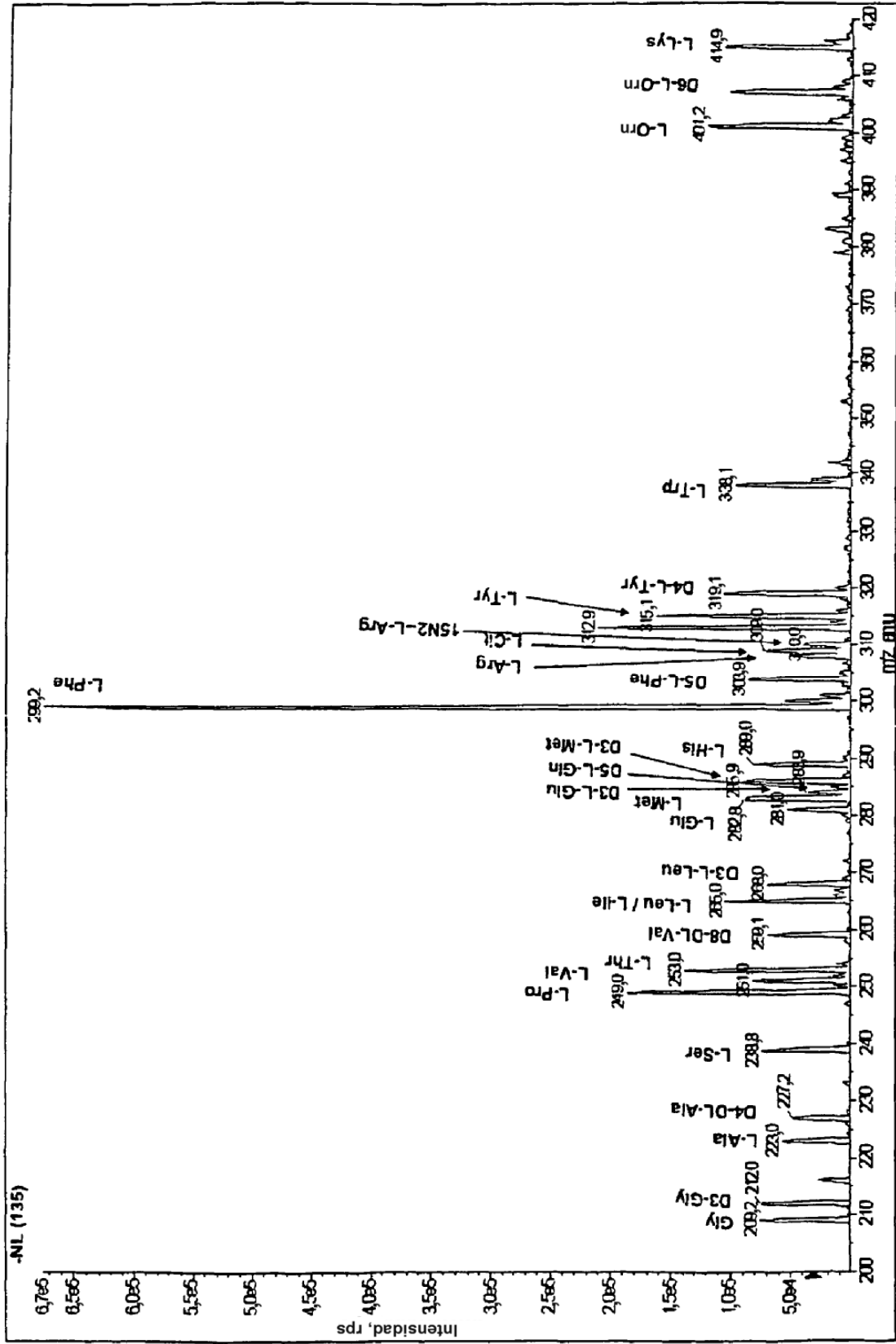


Figura 8. Derivados de feniltiourea de una selección de patrones de aminoácidos y patrones internos (isotipos estables)

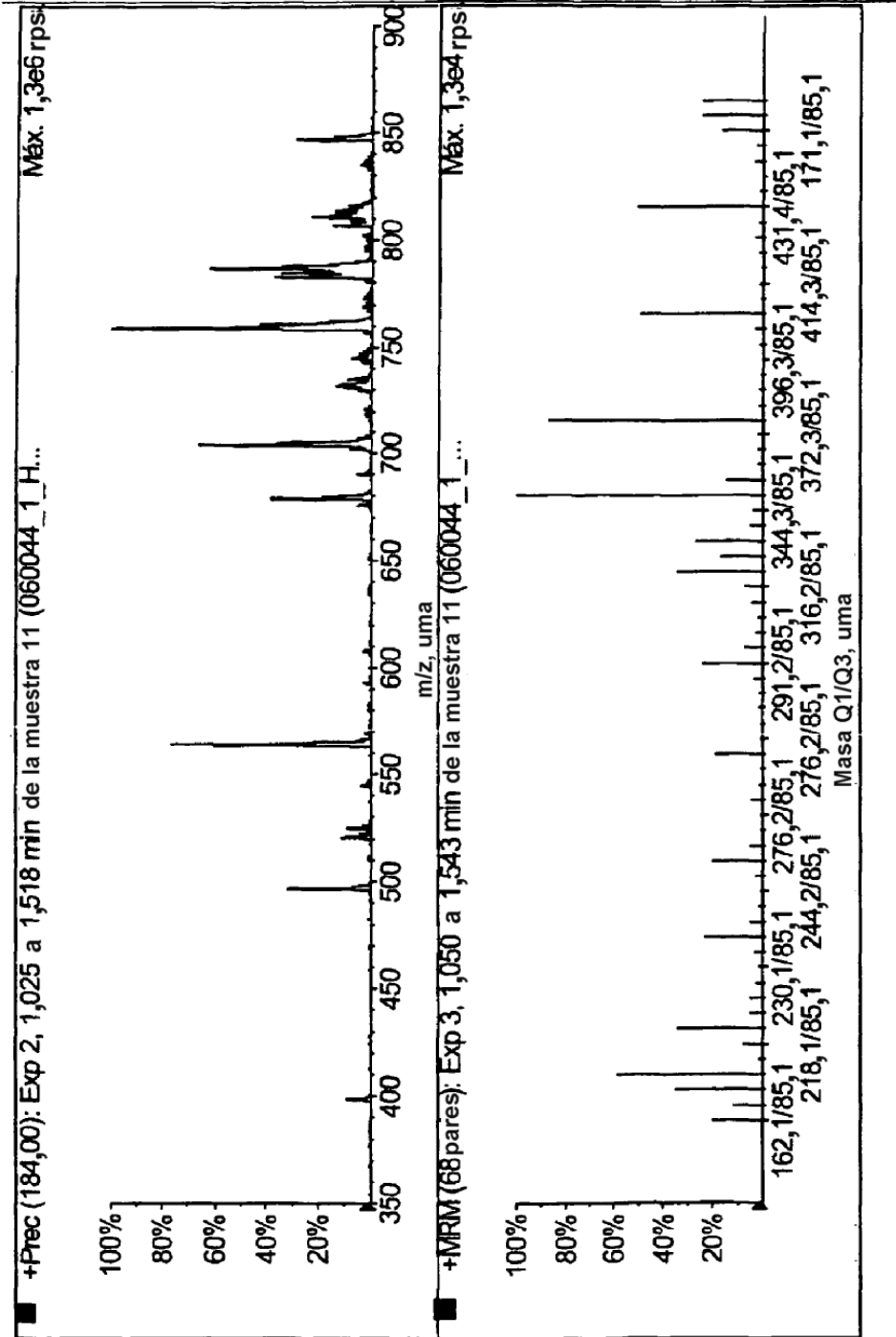


Figura 9. A muestra un espectro de ion precursor de 184 específico de lípidos que contiene colina como esfingomielinas y fosfatidilcolinas y B; muestra un espectro de MRM (monitorización de múltiples reacciones) de acilcarnitinas individuales, todas extraídas de plasma.

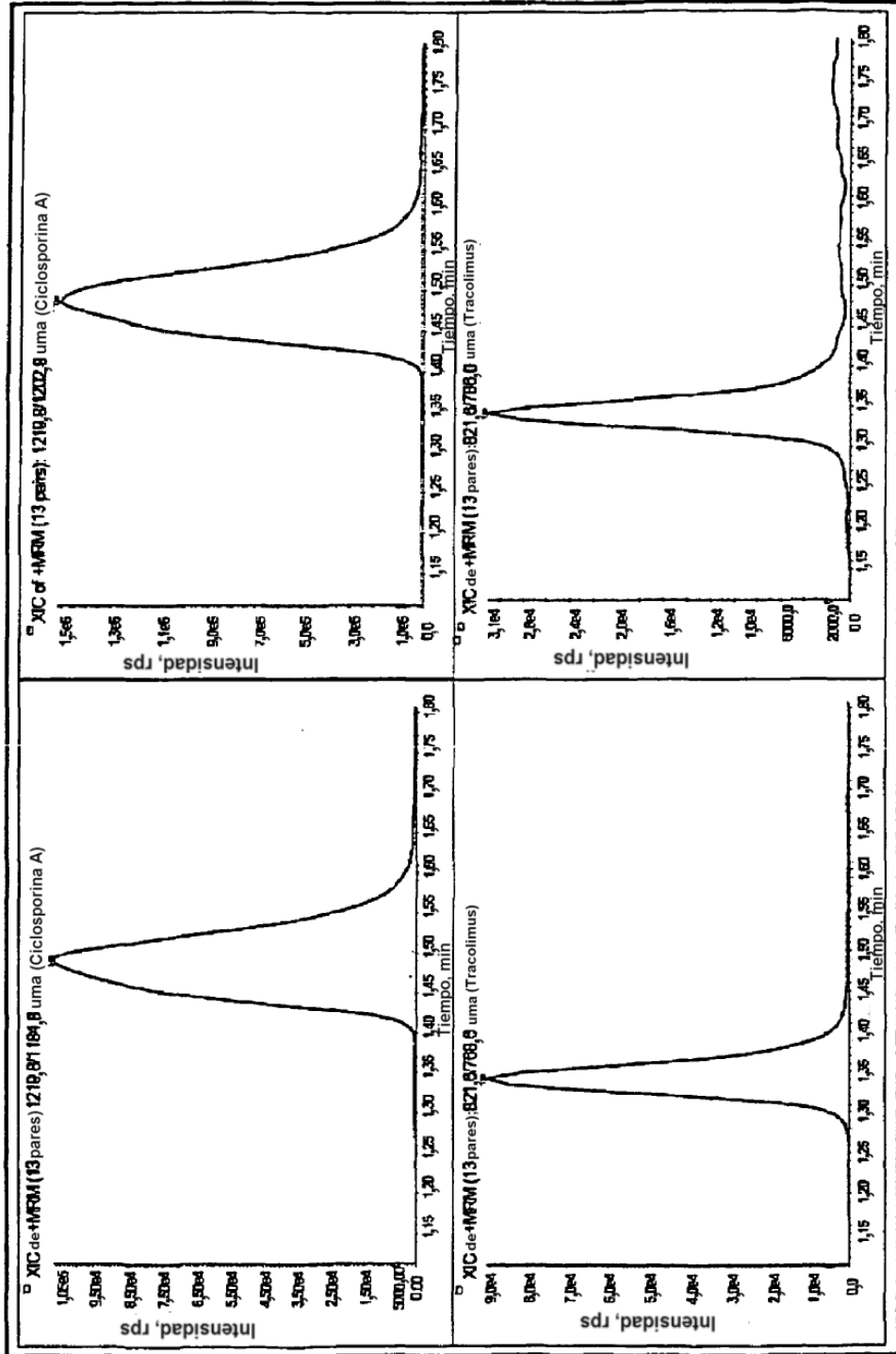


Figura 10a. Transiciones MRM múltiples de fármacos terapéuticos ciclosporina y tracolimus de una muestra de sangre de control de calidad

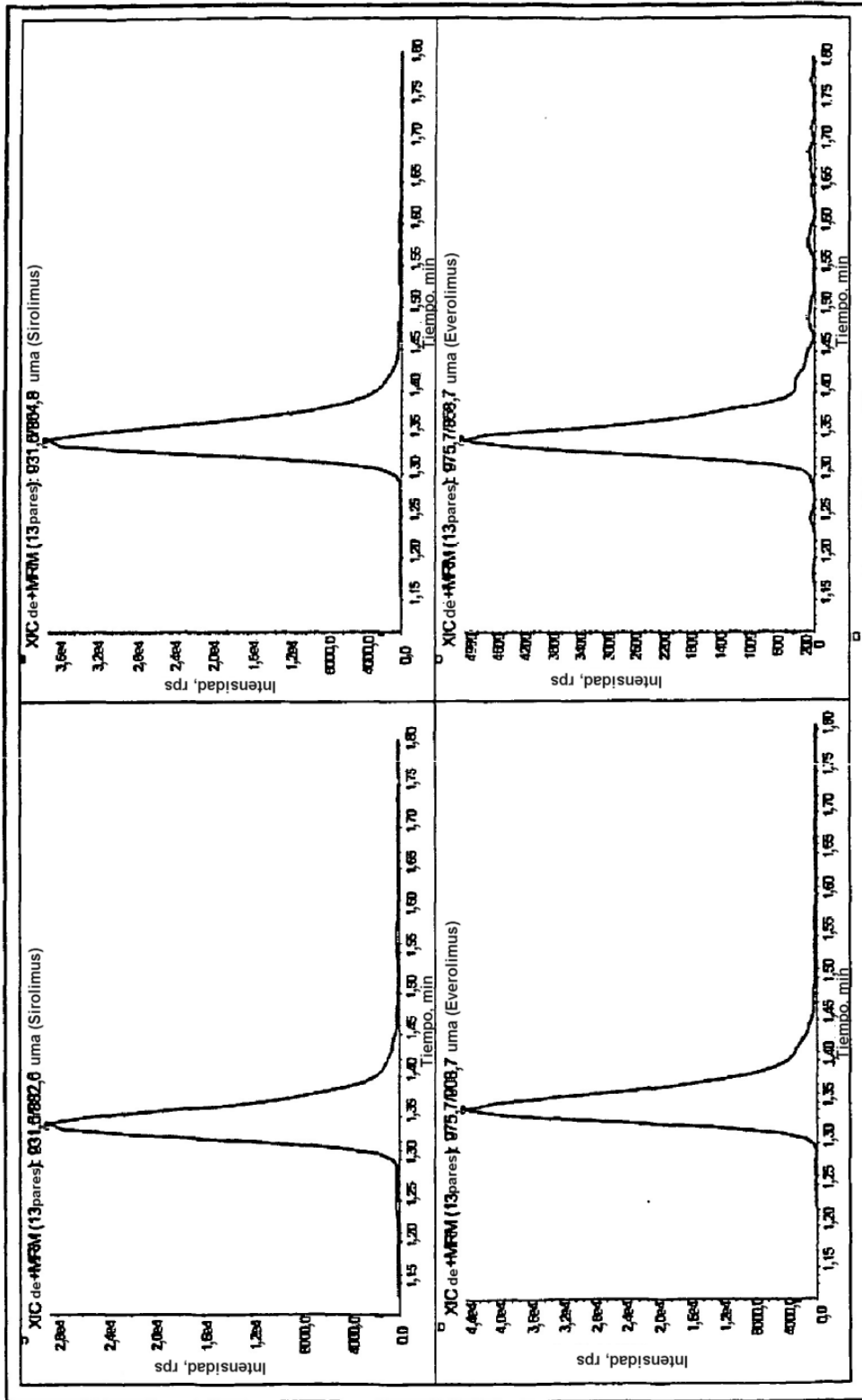


Figura 10b. Transiciones MRM múltiples de fármacos terapéuticos Sirolimus y Everolimus de una muestra de sangre de control de calidad.

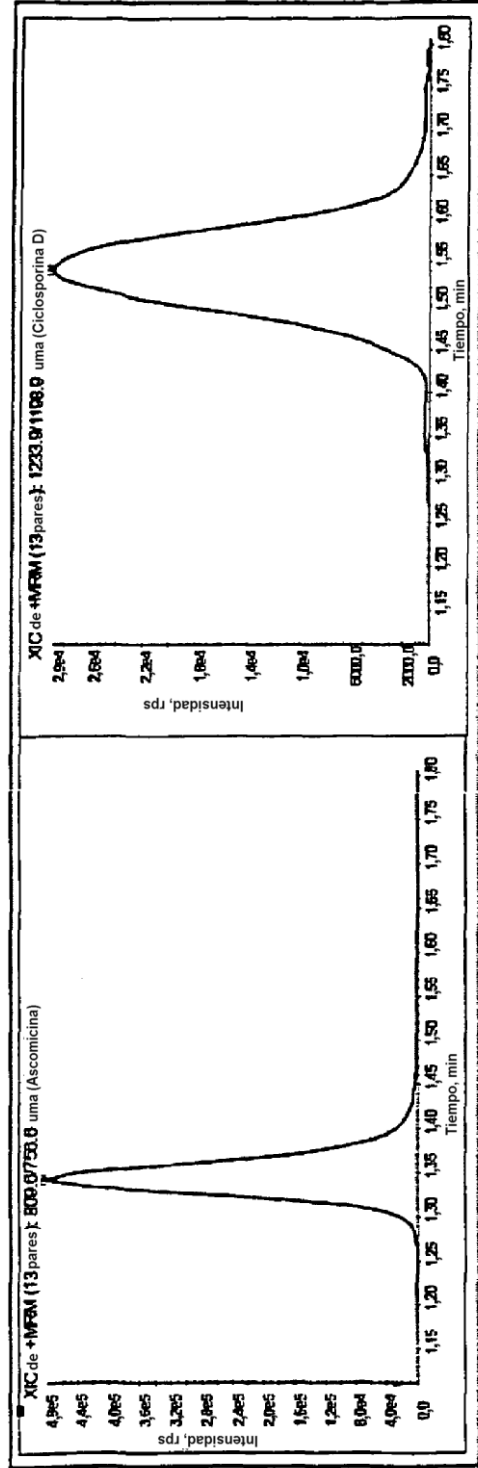


Figura 10c. Transiciones MRM múltiples de patrones internos, Ascomicina y Ciclosporina D de una muestra de sangre de control de calidad.

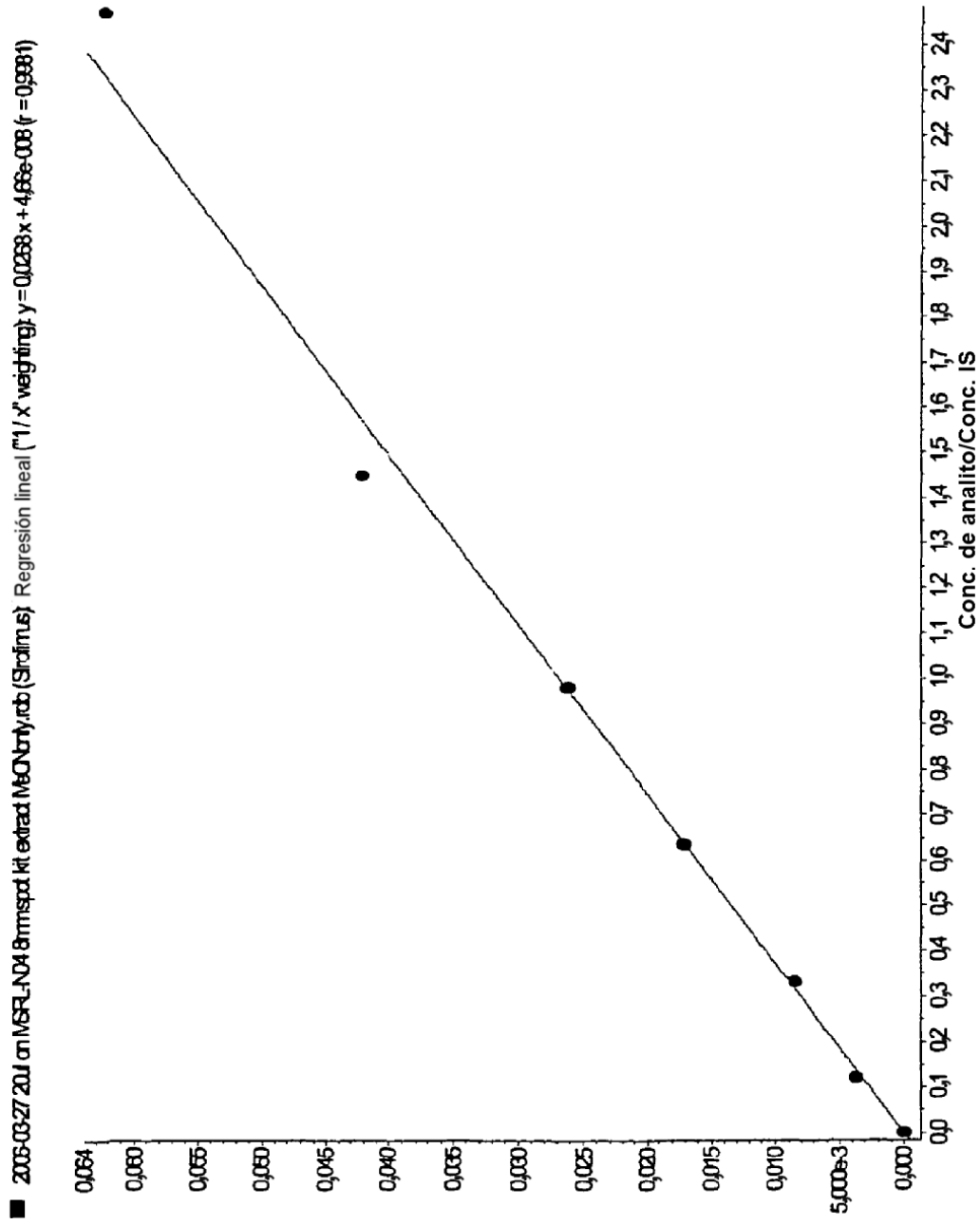


Figura 11. Curva de calibrado de Sirolimus ($r = 0,9981$)

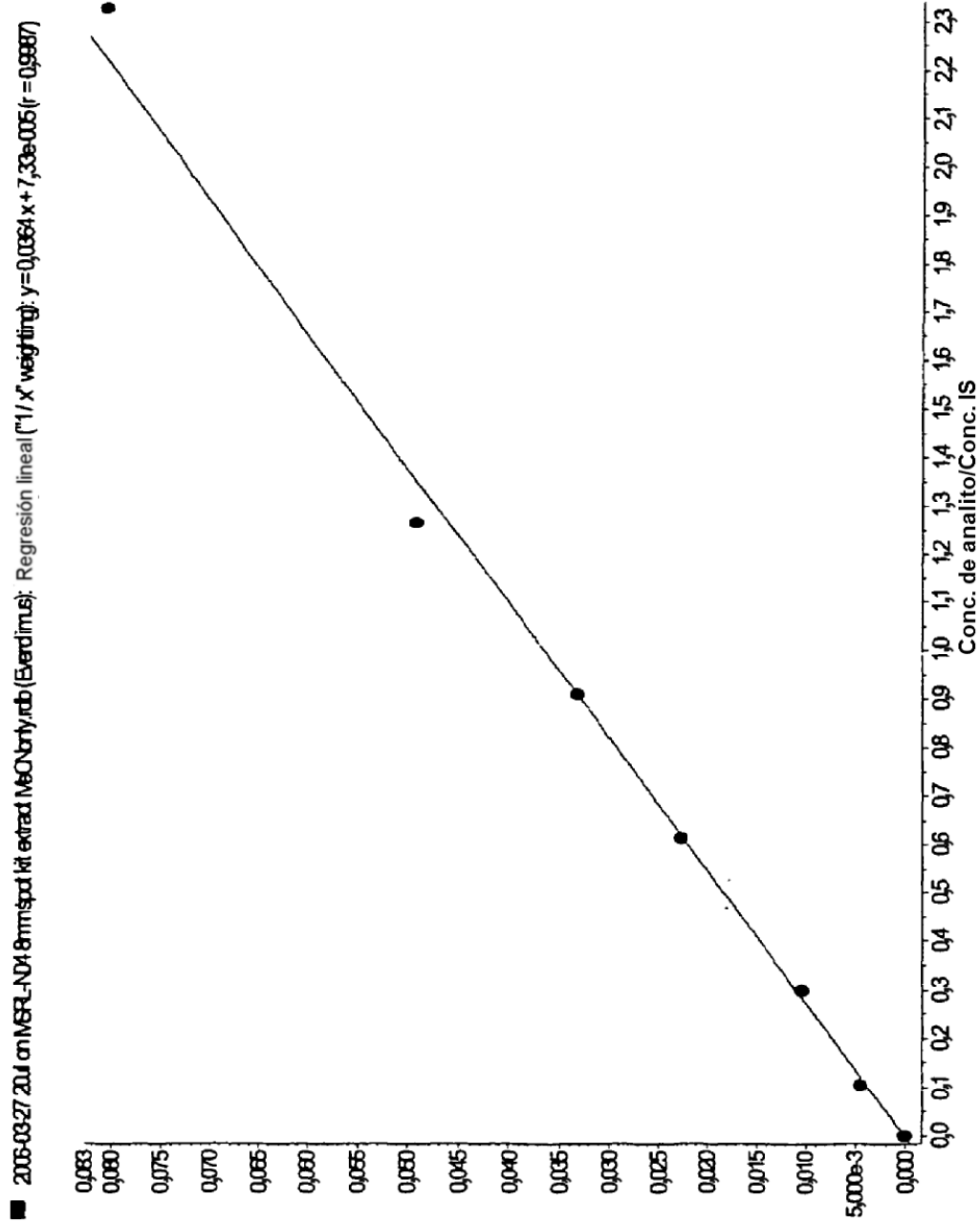


Figura 12. Curva de calibrado de Everolimus ($r = 0,9987$)

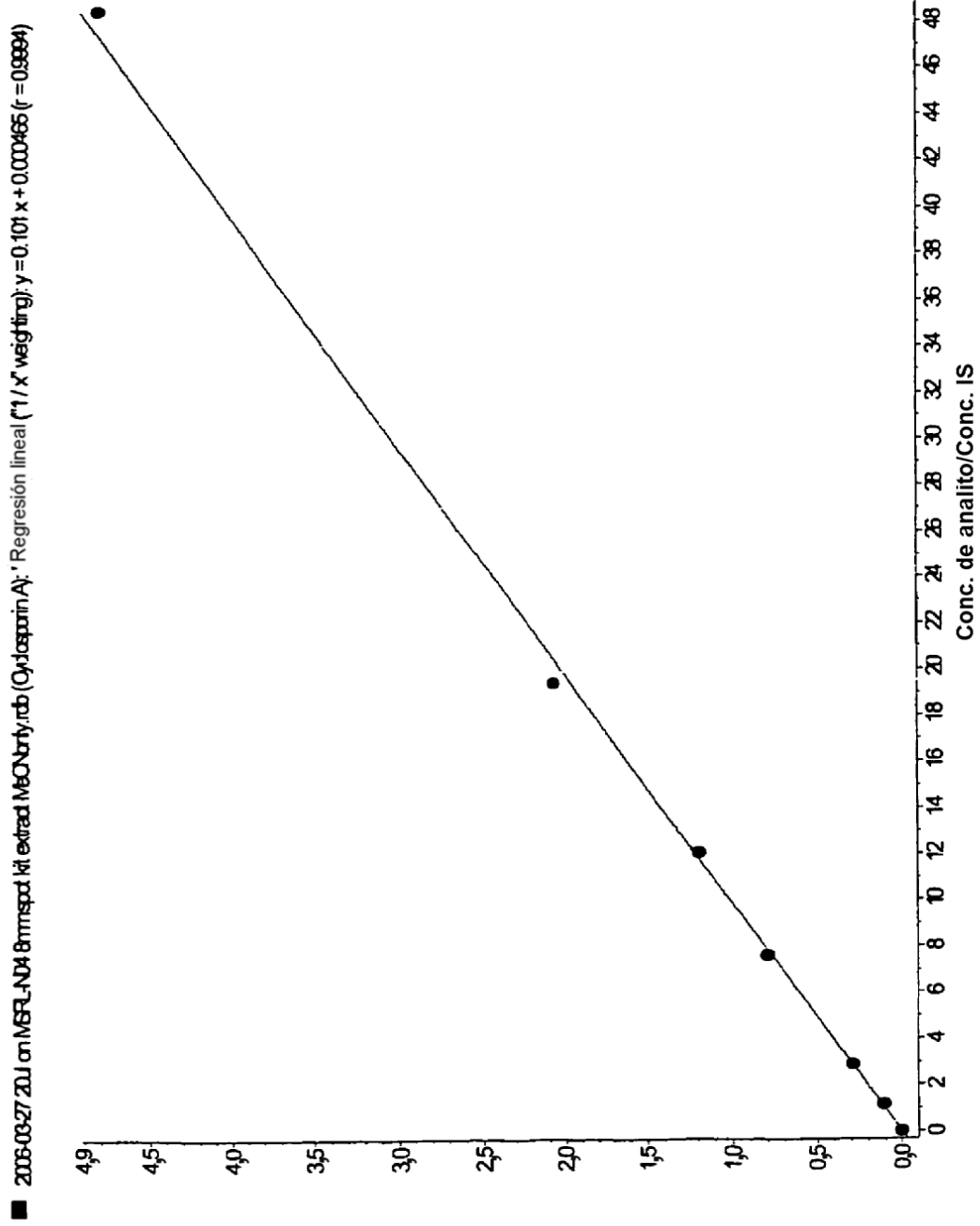


Figura 13. Curva de calibrado de Ciclosporina A (Cic A) (r = 0,9994)

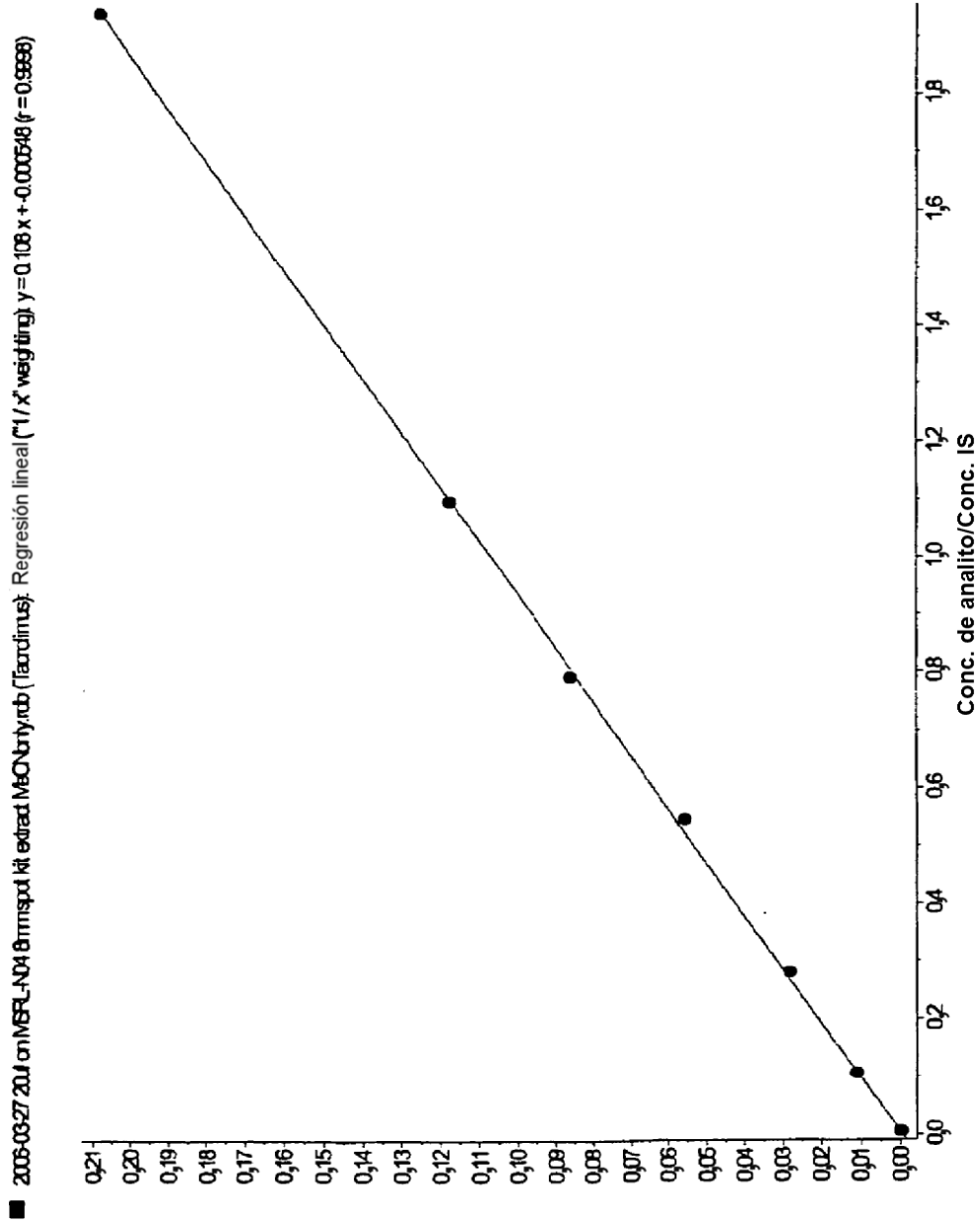


Figura 14. Curva de calibrado de Tracolimus ($r = 0,9998$)