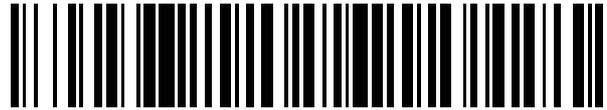


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 266**

51 Int. Cl.:

H01J 49/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2008 E 08836627 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2205342**

54 Título: **Generación y uso de patrones isotópicos en comparación fenotípica de espectros de masas de organismos**

30 Prioridad:

02.10.2007 US 976923 P

05.08.2008 US 186381

05.08.2008 US 186395

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

21.04.2014

73 Titular/es:

IROA TECHNOLOGIES LLC (100.0%)

7395 Warren Road

Ann Arbor, MI 48105, US

72 Inventor/es:

BEECHER, CHRISTOPHER WILLIAM WARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 456 266 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

Generación y uso de patrones isotópicos en comparación fenotípica de espectros de masas de organismos

5 CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere a la creación y uso de patrones isotópicos en análisis de espectros de masas para identificar similitud o desemejanza fenotípica de un organismo ensayado. Más específicamente, los patrones isotópicos se usan en un sistema que contiene un organismo biológico que es fenotípicamente ensayado para llevar a cabo una comparación fenotípica de organismos biológicos complejos. Un procedimiento contemplado utiliza patrones isotópicos predefinidos y únicos presentes en compuestos conocidos por estar en un primer fenotipo como patrones para la comparación con compuestos presentes en un segundo fenotipo ensayado.

15 TÉCNICA ANTERIOR

El uso de isótopos estables para la determinación de información biológica tiene una larga e ilustre historia [véase Hellerstein, *Metabolic Engineering* 6:85-100 (2004)]. El uso más antiguo y más frecuente es en estudios que investigan el metabolismo en el que un isótopo estable se incorpora en una molécula específica en una localización específica. Esta molécula isotópicamente marcada, o "precursor", se alimenta a un organismo *in vivo*, sistema de células *in vitro* o sistema sin células *in vitro* durante tanto un periodo de tiempo breve como prolongado, después de lo cual el destino del isótopo se determina, tanto usando RMN, espectrometría de masas (EM), degradación química, como otra técnica de detección.

A diferencia del uso de isótopos radiactivos, el uso de isótopos estables se considera generalmente seguro y libre de regulación. Aunque en general un estudio normalmente usa un único isótopo incorporado en una localización específica con el fin de lograr una precisión en el entendimiento del destino metabólico de una molécula, otra realización del uso de isótopos estables utiliza moléculas completamente marcadas (>99 % de un átomo se sustituye por un equivalente isotópico), o universalmente marcada (el isótopo está universalmente distribuido dentro de la molécula diana a menos de los niveles de saturación). Hay muchos estudios conocidos en los que más de un isótopo se incorpora en una molécula diana, y todos los fragmentos isotópicos se examinan para sus destinos diferenciales. En todos los casos, estos procedimientos son análisis elegidos como diana; es decir, buscan la incorporación de un átomo marcado específico en otras moléculas específicas.

Todavía otro uso de compuestos isotópicamente marcados estables es como patrones internos para sus homólogos no marcados. En un experimento tal, una molécula isotópicamente enriquecida se añade a una muestra o extracto a una concentración conocida antes de un análisis, y la medición final determina la concentración exacta del material no marcado por la comparación. En este tipo de estudio es común para un investigador añadir más de un patrón isotópicamente distinto si va a cuantificarse más de una molécula. De hecho, hay formas extremas en las que se prepara una mezcla extremadamente compleja cultivando un organismo complejo sobre una materia prima isotópicamente definida de forma que el organismo entero esté fuertemente compuesto, si no enteramente, de moléculas que consisten en solo un isótopo [Wu y col., *Anal Biochem* 336:164-171 (2005)]. En esta situación, el mismo patrón se introduce en todas las muestras, pero no hay información llevada por el patrón distinta de para los fines de cuantificación relativa; es decir, el patrón no tiene relación con el experimento en cuestión. Históricamente, tales patrones se construyen cuidadosamente para diferenciarse de cualquier otro analito por una diferencia de masa específica.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención contempla un procedimiento para ensayar similitud o desemejanza fenotípica (comparación fenotípica) de un segundo organismo ensayado en comparación con un primer organismo patrón o de control que es frecuentemente de la misma especie. Un procedimiento contemplado comprende las etapas de proporcionar una muestra de material compuesto que comprende una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras. La primera muestra es una muestra patrón (control) que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 Da (uma) que están presentes en una muestra representativa del primer organismo (control). Aquellos compuestos constituyentes (i) se disuelven o dispersan en un medio líquido, preferentemente un medio acuoso, y (ii) cada compuesto constituyente comprende las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo.

La segunda muestra representativa es una muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del segundo organismo de prueba cuyo fenotipo va a ensayarse. Los compuestos constituyentes (i) se disuelven o dispersan en un medio líquido, preferentemente un medio acuoso, y (ii) cada compuesto constituyente comprende las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables del primer átomo. La primera y la segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos son diferentes entre sí, y el primer y segundo isótopos son distintos de H o D.

La muestra de material compuesto preparada para análisis se analiza por espectroscopía de masas para picos de analito. La relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo se determina para cada pico de analito analizado. Se determina la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto. La relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada pico de analito analizado se compara con la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto. Un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas de pico analizadas se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas de pico analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto son fenotípicamente distintas del organismo patrón. Un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas de pico analizadas no se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas de pico analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto es fenotípicamente similar al organismo patrón.

En otra realización, una biblioteca de relaciones de pico isotópicas fenotípicas o perfiles de diversos organismos se prepara y se usa para comparación con organismos cuya identidad es desconocida o se desea conocer. La invención también se refiere a un procedimiento para crear una biblioteca de perfiles de relaciones isotópicas fenotípicas de diferentes organismos, siendo cada perfil de miembro una pluralidad de relaciones obtenidas de espectros de masas del primer isótopo con respecto al segundo isótopo que están presentes en cada pico de analito analizado con respecto a la mediana de la relación isotópica de una muestra de material compuesto de cada organismo diferente, estando dicha muestra de material compuesto comprendida de una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras, siendo dicha primera muestra una muestra patrón que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa de un primer organismo, estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo, y siendo dicha segunda muestra una muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del organismo cuyo fenotipo se ensaya, estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo, siendo dicha primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos diferentes entre sí, y siendo dicho primer y segundo isótopos distintos de H o D, en la que el procedimiento comprende:

- (a) analizar por espectroscopía de masas dicha muestra de material compuesto de cada organismo diferente para picos de analito;
- (b) determinar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada pico de analito analizado;
- (c) determinar la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto; y
- (d) guardar la pluralidad de relaciones obtenidas de espectros de masas del primer isótopo con respecto al segundo isótopo que están presentes en cada pico de analito analizado con respecto a la mediana de la relación isotópica de la muestra de material compuesto en un perfil de miembro.

Así, por ejemplo, una biblioteca de relaciones de picos fenotípicos para diversas cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* o similares puede prepararse como un catálogo con el que pueden compararse organismos desconocidos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos que forman una porción de la presente divulgación

la Fig. 1 ilustra un espectro de masas hipotético obtenido mezclando glucosa C-12 de abundancia natural (98,9 % de C12) con una cantidad equivalente de glucosa C-13 (98,9 % de C-13).

La Fig. 2 ilustra un espectro de masas hipotético obtenido mezclando glucosa C-12 natural sustancialmente pura a la izquierda (líneas diagonales) con una cantidad equivalente de glucosa C-13 sustancialmente pura a la derecha (diamantes). Esta situación se ha considerado óptima en otras enseñanzas tales como el documento WO 05059566.

La Fig. 3 ilustra un espectro de masas hipotético para glucosa que muestran los efectos de alterar la distribución isotópica en iones hija usando no C-12 de abundancia natural (95 % de C-12/ 5 % de C-13) en la izquierda (líneas diagonales) y C-13 de enriquecimiento alterado (95 % de C-13 y 5 % de C-12) en la derecha (diamantes).

La presente invención tiene varios beneficios y ventajas.

Un beneficio es que por el uso de relaciones isotópicas específicamente diseñadas puede identificarse la fuente de picos de analito observados en el espectro, independientemente de la complejidad espectral. Específicamente, una señal espectral puede a) originarse del cultivo de control, o b) cultivo experimental, o c) ser un artefacto adquirido durante la preparación de muestras, o d) originarse a partir del fármaco externamente aplicado o inductor de respuesta, o patrón. Cada una de estas clases de compuestos tiene características únicas.

Una ventaja de la invención es que la variación que se introduce experimentalmente, es decir, "ruido", es estadísticamente invalidada y/o enormemente minimizada.

Otro beneficio de la invención es que en la interfase de cromatografía de líquidos-espectro de masas hay una pérdida de señal debido a la "supresión iónica". La supresión iónica se produce siempre que haya más disponibilidad de compuesto que de carga. En esta situación, algunos compuestos se cargan a costa de otros compuestos. La variabilidad de la eficiencia de ionización es de forma que algunas moléculas no puedan ser cuantificadas con exactitud. El presente procedimiento elimina casi completamente el problema de la supresión iónica debido a que la capacidad de un compuesto para ionizar es una función de su estructura y no se altera significativamente por su distribución isotópica.

Beneficios y ventajas todavía adicionales de la invención serán evidentes para el trabajador experto de la divulgación que sigue.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Un fenotipo es cualquier característica observable de un organismo, tal como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas o fisiológicas, o comportamiento. Los fenotipos resultan de la expresión de los genes de un organismo, además de la influencia de factores medioambientales y posibles interacciones entre los dos. El genotipo de un organismo es las instrucciones heredadas que lleva en su código genético. No todos los organismos con el mismo genotipo se parecen o actúan de la misma forma, debido a que el aspecto y comportamiento se modifican por condiciones medioambientales y de desarrollo. También de la misma forma, no todos los organismos que se parecen tienen necesariamente el mismo genotipo. Esta distinción genotipo-fenotipo se propuso por Wilhelm Johannsen en 1911 para aclarar la diferencia entre una herencia del organismo y lo que produce esa herencia [Johannsen, 1911 American Naturalist 45:129-159].

La presente invención contempla un procedimiento para identificar similitud o desemejanza fenotípica (comparación fenotípica) de un segundo organismo (prueba) ensayado en comparación con un primer organismo patrón de la misma especie. Un procedimiento contemplado comprende las etapas de proporcionar una muestra de material compuesto que comprende una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras. La primera muestra es una muestra patrón que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una población representativa de la especie de organismo patrón cuyo fenotipo va a ensayarse. Aquellos compuestos constituyentes (i) se disuelven o dispersan en un primer líquido, preferentemente un medio acuoso, y (ii) cada compuesto constituyente comprende las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo.

La segunda muestra es una muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en el segundo organismo de prueba cuyo fenotipo va a ensayarse. Los compuestos constituyentes (i) se disuelven o dispersan en un segundo líquido, preferentemente un medio acuoso, y (ii) cada compuesto constituyente comprende las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables del primer átomo. La primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos son diferentes entre sí, y el primer y segundo isótopos son distintos de H o D.

Los compuestos constituyentes de cada una de la primera y segunda muestras se disuelven o dispersan en un medio líquido que es preferentemente una composición acuosa. El primer y segundo medios líquidos no necesitan ser los mismos para cada muestra, pero si son diferentes, los líquidos son preferentemente miscibles. Puede usarse agua sola o una composición tamponada como diversas combinaciones de agua y alcoholes tales como etanol, metanol, 1- o 2-propanol y los butanoles. Una mezcla del 40 por ciento en volumen de etanol en agua es un medio preferido. Otros líquidos que son útiles incluyen acetonitrilo, piridina, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida, hexametilfosforamida y los líquidos iónicos que se tratan en la patente de EE.UU. nº 6.824.599 y las citaciones en su interior.

La muestra de material compuesto se analiza por espectroscopía de masas para picos de analito. La relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo se determina para cada pico de analito analizado. Se determina la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto o primer perfil. La relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada pico de analito analizado (segundo perfil) se compara con la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto. Un segundo organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas de pico iónico analizadas se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas de pico iónico analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto son fenotípicamente distintas del organismo patrón. Un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas de pico iónico analizadas no se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas de pico iónico analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto es fenotípicamente similar al organismo patrón. La desviación estadísticamente significativa de la mediana de la muestra se considera en el presente documento que significa dos o más desviaciones estándar de la relación promedio.

Una muestra de material compuesto está comprendida en sí misma de dos muestras, conteniendo cada una compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma (Da) que están presentes en el primer o segundo organismo. Los compuestos constituyentes de mayor peso molecular pueden eliminarse antes de mezclar las dos muestras para formar el material compuesto o después de esa mezcla y antes del análisis del espectro de masas. Se prefiere presentemente que las muestras se mezclen antes de la eliminación de los componentes de mayor peso molecular de manera que se requiera llevar a cabo las menos manipulaciones posibles.

Los componentes de la muestra de material compuesto se separan normalmente por sí mismas antes de la introducción en el espectrómetro de masas. Esa separación puede llevarse a cabo usando cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis y similares. También pueden combinarse diversas técnicas de separación. Equipo ilustrativo para su uso en tales separaciones y análisis incluyen Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS; Agilent 5975 Series MSD; Thermo-Fisher LTQ; Thermo-Fisher ORBITRAP®; Waters MICROMASS® GCT Premier™; y Waters LCT Premier™. Los sistemas de separación pueden ser parte del espectrómetro de masas (como en CG) o separados. Equipo adicional incluye las máquinas conocidas como Waters ACQUITY UPLC®, Agilent Rapid Resolution; y sistemas Thermo Surveyor Plus.

Con el fin de combinar las muestras, las muestras se marcan uniformemente y universalmente con isótopos apropiados. Puede usarse un elemento en el que hay dos isótopos estables que no se distinguen significativamente por enzimas o sistemas vivos. Se usa carbono (específicamente, ^{12}C y ^{13}C) para los fines de ilustración en el presente documento debido a su aplicabilidad universal; sin embargo, ejemplos adicionales incluyen los isótopos de nitrógeno (^{14}N y ^{15}N), oxígeno (^{16}O , ^{17}O o ^{18}O), azufre (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S o ^{36}S), cloro (^{35}Cl y ^{37}Cl), magnesio (^{24}Mg , ^{25}Mg y ^{26}Mg), silicio (^{27}Si , ^{28}Si y ^{29}Si), calcio (^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , y ^{44}Ca) y bromo (^{79}Br y ^{81}Br).

El uso de isótopos que presentan efecto isotópico biológico mínimo es de importancia. Por ejemplo, el uso de los isótopos de hidrógeno (D o T, que es radiactivo y así no favorecido) no sería adecuado debido a que producen frecuentemente un efecto observable sobre el metabolismo debido al hecho de que el isótopo de deuterio tiene una masa que es dos veces la del hidrógeno, y entonces se sabe que produce una reducción en la cinética de algunos mecanismos enzimáticos pero no en otros. La discusión que sigue considera el carbono como un elemento ilustrativo para la incorporación y uso en un ensayo. Sin embargo, hay ejemplos en los que otras combinaciones elementales puede proporcionar percepciones menos amplias, pero específicas.

Los compuestos de origen biológico son únicos porque están todos interrelacionados mediante el proceso biológico. Un procedimiento contemplado extiende esta verdad creando dos poblaciones de potencial biológico casi idéntico, pero requiriendo que cada una se base en material de fuentes isotópicas diferentes. Así, cada muestra biológica tiene un complemento bioquímico completo que está constituido por diferentes distribuciones isotópicas. En el caso más simple se crean dos clases de muestras, por ejemplo, experimental y control. Una de estas clases, a efectos de esta discusión el "patrón" o "control", se deriva de medio en el que la distribución isotópica era principalmente carbono trece y el otro (la "muestra experimental" o "de ensayo") se basa en medio que era principalmente carbono doce.

Ilustrativamente, si van a compararse organismos unicelulares, el primer organismo patrón o de control se cultiva en un primer medio nutritivo que contiene cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo dentro de un nutriente, mientras que los segundos organismos de muestra ensayados experimentales se cultivan en un segundo medio nutritivo sustancialmente idéntico al primer medio nutritivo, pero que contiene diferentes cantidades predeterminadas, en comparación con dicho primer medio nutritivo, del primer y segundo isótopos estables de ese primer átomo dentro del nutriente.

Así, para un sistema que usa isótopos estables de carbono [carbono-12 (^{12}C) y carbono-13 (^{13}C)], las relaciones isotópicas en este ejemplo incluyen específicamente una dilución del cinco al diez por ciento de un isótopo de carbono en el otro; es decir, se cultiva una muestra sobre una fuente de carbono (nutriente en un medio) que puede ser el 95 % de carbono-12 (^{12}C) y el 5 % de carbono-13 (^{13}C), en lo sucesivo llamado "medio de C-12", y en una situación tal la otra muestra se cultiva en medio especular que contiene un nutriente que contiene el 95 % de carbono-13 y el 5 % de carbono-12 en un medio, en lo sucesivo llamado "medio de C-13". En cada uno de estos casos el sistema biológico capta el nutriente en el medio y crece de tal forma que se transforme a sí mismo de manera que todas sus partes sean distintivamente identificables en cuanto a su origen.

Como se usa en el presente documento, las cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopo estable están preferentemente presentes en "relaciones invertidas" entre sí tales como aquellas tratadas inmediatamente anteriormente en las que el número del numerador de la primera relación es el número del denominador de la segunda relación, y el número del denominador de la primera relación es el número del numerador de la segunda relación. Tomando las relaciones anteriores del 95 % y 5 %, una primera relación sería 95/5 de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en el medio de C-12, mientras que la segunda relación invertida sería 5/95 de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en el medio de C-13. Debe entenderse que un conjunto contemplado de relaciones preferidas no necesita ser 95/5 y 5/95 y que aquellos números solo se usan por comodidad. Cuando estas dos muestras se mezclan, entremezclan o se combinan de otro modo, la muestra de material compuesto contiene moléculas de tanto el "patrón" como el "control" (que están constituidas de una mayoría

sustancial; es decir, 90% al 95% de ¹³C) y la "muestra experimental" o "de ensayo" (que están constituidas de una mayoría sustancial; es decir, 90% al 95% de ¹²C). Usando la distribución másica para todos los compuestos identificados de una muestra de material compuesto tal pueden determinarse las contribuciones relativas para cada compuesto de cualquier muestra original. El desviar significativamente la relación del 90% al 95% enseñada por este procedimiento reduce las posibilidades de interpretación. Se consideran tres casos para relaciones isotópicas; 1) la abundancia natural de ¹²C es de aproximadamente el 98,9 %, mientras que la abundancia natural de ¹³C es de aproximadamente el 1,1 %, 2) casi puro (es decir, que se aproxima al 100 %) de cada uno, o 3) mezclas de relación isotópica controlada. En el caso 1, abundancia natural, cada compuesto será una colección o mezcla de isotómeros que varían en masa debido a la presencia de impureza de ¹³C en el ruido de fondo de ¹²C (véase la Fig. 1). Así, la distribución de estos isotómeros como se observa en el espectrómetro de masas incluirá varios picos derivados de iones (también llamados "hijas") que se mueven hasta mayor masa desde el pico (también llamado "padre") del ión de mayoría.

Desafortunadamente, en una mayoría de productos bioquímicos o metabolitos, estos picos secundarios son bastante pequeños y frecuentemente se pierden ya que son indistinguibles del ruido. Si uno fuera a crear una "abundancia anti-natural" similar para ¹³C; es decir, el 98,9 % de ¹³C y el 1,1 % de ¹²C, entonces la muestra tendría el pico de mayoría como la masa más alta y mostraría varios picos que se desplazarían desde ella a menores masas, pero de nuevo en la mayoría de los casos estos picos adicionales serían indistinguibles del ruido, si son detectables en absoluto.

En el caso de material de partida isotópico casi puro (véase la Fig. 2), el pico de mayoría se vuelve incluso más dominante y es incluso menos probable que se vean los otros picos. En ambos de los casos precedentes, en una mayoría del tiempo no puede confiarse en ver nada, excepto el pico de mayoría para cada compuesto. Así, en ambos de estos casos de una muestra de material compuesto, como se han definido anteriormente, habría dos picos de glucosa, a 180 y 181 uma, en un espectro de masas de la muestra. Basándose en el hecho de que hay un compuesto conocido y previamente identificado, estos dos podrían distinguirse, y si la respuesta "experimental" hiciera que el pico de glucosa C-13 cayera por debajo de los límites detectables, entonces éste podría determinarse. Sin embargo, si el compuesto no fuera glucosa, sino un compuesto desconocido y hubiera solo un pico, sería imposible determinar si el pico identificado se originó del lado de "control" o el "experimental".

La presente invención mejora esta situación usando específicamente material que se concibe que asegura que los picos de minoría estarán presentes en cantidad suficiente que serán generalmente vistos. En este caso, la fuente de cualquier compuesto puede identificarse debido a que, con respecto al pico de mayoría, el pico de minoría será de mayor masa (y, por tanto, derivado de células basadas en ¹²C), o el pico de minoría tendrá una masa más pequeña (y, por tanto, se derivará de células basadas en ¹³C). Así, es óptimo aumentar el porcentaje de la "impureza"; es decir, ¹²C en ¹³C o viceversa, en cantidades cuidadosamente controladas significativamente por encima de su abundancia natural (véanse las Tablas 1A y 1B, a continuación).

Tabla 1A

C-12	Masa Mol.					
	C12 + 1%	C12 + 2%	C12 + 3%	C12 + 4%	C12 + 5%	C12 + 10%
1	6.43%	12.61%	18.92%	25.37%	31.95%	67.03%
180	1.41%	1.90%	2.74%	3.93%	5.50%	20.00%
181	0.08%	0.17%	0.30%	0.47%	0.70%	3.64%
182	0.01%	0.01%	0.03%	0.04%	0.07%	0.48%
183	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.05%
184	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
185	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
186	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
187	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
188	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
189	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
190	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
191	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

La Tabla 1A muestra el perfil másico; es decir, la distribución isotópica para un compuesto basado en C-12 con un compuesto molecular de masa 180 (C₆H₁₂O₆) que se ha diluido con diversos porcentajes de C-13. Así, una molécula basada en C12 de masa 180 con 95 % de C-12 y 5 % de C-13 tendrá un M+1 (a 181 uma) que es el 31,95 % de la altura del pico parental a 180 uma. Además, tendrá un M+2 que es el 5,5 % del pico parental. Los restantes valores ilustran menores y mayores diluciones de C-12 con C-13.

Tabla 1B

	C-13						Masa Mol.
	C13 + 1%	C13 + 2%	C13 + 3%	C13 + 4%	C13 + 5%	C13 + 10%	
5	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	180
	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	181
	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.23%	182
10	0.00%	0.02%	0.06%	0.14%	0.29%	2.73%	183
	0.15%	0.62%	1.43%	2.60%	4.15%	18.44%	184
	6.06%	12.24%	18.55%	24.98%	31.55%	66.45%	185
15	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	186
	0.44%	0.52%	0.60%	0.67%	0.76%	1.18%	187
	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	188
	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	189
	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	190
20	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	191

A diferencia de la Tabla 1A, la Tabla 1B muestra el perfil másico; es decir, la distribución isotópica para un compuesto basado en C-13 con un compuesto molecular de masa 186 (C₆H₁₂O₆) que se ha diluido con diversos porcentajes de C12. Así, una molécula basada en C13 de masa 186 con 95 % de C-13 y 5 % de C-12 tendrá un M-1 (a 185 uma) que es el 31,55 % de la altura del pico parental a 186 uma. Además, tendrá un M-2 que es el 4,15 % del pico parental. Obsérvese que esta molécula tendrá picos M+1 muy pequeños, etc., debido a contribuciones isotópicas de otras especies atómicas, es decir, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, etc.

Así, los compuestos que contribuyen al material compuesto de la muestra de ¹³C pueden distinguirse debido a que tienen hijas que están en M-1 (siguiendo al padre), mientras que aquellos picos de las muestras de ¹²C tienen sus hijas en M+1 (antecediendo al padre). Usando esta regla pueden distinguirse fácilmente la fuente de un pico que es de una muestra de control o ensayada.

La adición de 10 % de impureza (¹³C en ¹²C o viceversa) produce un pico hija que es aproximadamente el 66 % del tamaño del padre. El aumento óptimo con respecto a la abundancia natural es una función del estudio en cuestión y el tamaño promedio de las moléculas que el estudio tiene como objetivo ver, pero el beneficio del aumento de las relaciones isotópicas en tanto los medios de ¹³C como de ¹²C es siempre un beneficio.

El presente procedimiento puede usarse para comparar fenotipos de organismos unicelulares o pluricelulares. Ilustrativamente, los organismos unicelulares se obtienen de un cultivo celular. Aquellas células pueden ser células vegetales tales como células de alga, levaduras u hongos tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, bacterias tales como el organismo anaerobio facultativo Gram-negativo *E. coli*, o los organismos Gram-positivos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (S). sobrinus* y *S. mutans*. El organismo también puede ser un organismo pluricelular tal como una planta superior como un árbol o planta ornamental en flor, o un animal tal como un nematodo (*Caenorhabditis elegans*), una rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*) o primate tal como un ser humano. Así, se contemplan eucariotas y procariotas.

Si van a compararse fenotipos constituyentes de la pared celular entre organismos unicelulares, las muestras pueden tomarse, por ejemplo, de sobrenadantes o sedimentos de la lisis celular. En esta situación, las células del primer organismo patrón o de control se cultivan en un primer medio nutritivo que contiene cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo dentro de un nutriente, mientras que las células del segundo organismo de muestra experimental o ensayado se cultivan en un segundo medio nutritivo sustancialmente idéntico al primer medio nutritivo pero que contiene diferentes cantidades predeterminadas, en comparación con el primer medio nutritivo, del primer y segundo isótopos estables de ese primer átomo dentro del nutriente.

Un procedimiento contemplado también puede utilizarse con organismos pluricelulares. En este caso pueden estudiarse organismos superiores tales como mamíferos e incluso seres humanos. En este caso, el patrón o muestra de control se sintetiza basándose en el conocimiento predeterminado de la mayoría de los compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa tal como sangre, suero, músculo o hueso, savia, flema, cámbium o similares, y sus cantidades como es apropiado para el organismo y pueden obtenerse usando técnicas de muestreo usuales. La muestra de compuesto constituyente sintético contiene una relación de ¹²C/¹³C predeterminada tal como 5/95 en cada uno de los compuestos constituyentes. Cuando sea posible, el organismo ensayado se cultiva sobre un medio nutritivo que contiene una relación invertida de ¹²C/¹³C tal como 95/5, o la abundancia natural de aproximadamente 99,8/1,1 de ¹²C/¹³C aún cuando los análisis espectrales puedan ser difíciles con la última relación.

Un procedimiento contemplado se basa en establecer un conjunto de relaciones dentro de una única muestra que va a analizarse. Debido a la forma predecible que toman estas relaciones, el procedimiento entero puede reducirse a un conjunto de algoritmos que pueden codificarse en software. Este software realiza estas funciones de una manera automatizada, y produce un conjunto de datos que detalla 1) compuestos de analito encontrados en la muestra, 2) las relaciones de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ para aquellos compuestos de analito, 3) la relevancia del compuesto para el perfil de respuesta, 4) artefactos no biológicos, y 5) derivados de compuestos exógenamente aplicados.

En lo más fundamental, los procedimientos descritos imponen patrones en el conjunto de datos finales que pueden usarse en la interpretación del conjunto de datos para lograr un mayor grado de precisión, y exactitud que puede lograrse por cualquier otro procedimiento. Sin embargo, una cosa es crear estos patrones y otra usarlos.

Como es muy conocido en la técnica, el análisis de los espectros de masas se realiza normalmente con la ayuda del software llamado "recolector de picos" que se diseña para identificar e informar de picos de iones de espectros de masas. Este software está disponible comercialmente, en acceso abierto, y de trabajadores privados. Un programa tal se desvela en Katajamaa y col., BMC Bioinformatics 2005, 6:179doi:10.1186/1471-2105-6-179, mientras que otro se desvela en Rögnvaldsson y col., 2004 J. Chrom. B, 807(2, August 5):209-215; doi:10.1016/j.jchromb, 2004.04.010. Productos comerciales se ilustran por aquellos disponibles bajo el nombre RAZOR TOOLS/6™ de Spectrum Square Associates, 755 Snyder Hill, Ithaca NY 14850, EE.UU.

El software que se requiere en el uso de los patrones creados debe ser conocido de la naturaleza de los patrones creados y luego buscarlos en el conjunto de datos final. En una aplicación tal se proporciona una muestra de material compuesto y se somete a una fase de separación, tal como una CG, HPLC u otra separación cromatográfica. Entonces, el efluente de la separación se analiza por espectroscopía de masas. Los patrones se entierran en el conjunto de datos del espectrómetro de masas sin procesar como una serie de barridos representando cada barrido un segmento de tiempo secuencial.

El algoritmo usado para buscar los patrones puede tomar muchas formas; sin embargo, en un caso

- 1) todos los iones observados por el espectrómetro de masas en un único punto en el tiempo (barrido, o posiblemente un pico de-convolucionado) se juntan en un subconjunto;
- 2) los iones del analito en este subconjunto se clasifican inicialmente por sus valores de m/z , y luego se vuelven a clasificar basándose en su altura o amplitud;
- 3) el patrón de iones (de arriba a abajo) se examina para determinar si la pendiente de la traza de iones se vuelve aproximadamente nivelada. Este punto define ruido al azar, y todos los otros iones se consideran "ruido". Los iones de ruido se eliminan de la consideración.
- 4) A partir de los iones con la mayor altura o amplitud, los iones individuales se examinan (consultados por el software) secuencialmente:

a) Para cada ión (que tenga m/z o masa de M)

i. ¿Tiene $M+1$ el tamaño compatible con su ser basándose en una molécula de mayoría C-12; es decir, con 3 % al 10 % de incorporación global de C-13? En esta situación, $M+1$ estará entre el 18 %, 31 % o el 66 % si la molécula tiene una masa de aproximadamente 180 y tiene el 3 %, 5 % o el 10 % de contenido de C-13, respectivamente. Si es así, el ión de analito se identifica como una molécula de mayoría C-12 y todos los iones asociados ($M+1$, $M+2$, etc.; similarmente identificados) se eliminan de una futura consideración. Entonces se examina el siguiente ión de analito disponible más alto.

ii. ¿Tiene $M-1$ el tamaño compatible con su ser basándose en una molécula de mayoría C-13; es decir, con 3 % al 10 % de incorporación global de C-12? En esta situación, $M-1$ estará entre el 18 %, 31 % o el 66 %, respectivamente, si la molécula tiene una masa de aproximadamente 180 y tiene el 3 %, 5 % o el 10 % de contenido de C-13. Si es así, este analito se identifica como una molécula de mayoría C-13 y todos los iones asociados ($M-1$, $M-2$, etc.; similarmente identificados) se eliminan de una futura consideración. Después se examina el siguiente ión disponible más alto.

iii. ¿Demuestra $M+2$ un patrón asociado a un patrón? Si es así, se identifica como un patrón y todos los iones asociados ($M+2$, etc.) se eliminan de una futura consideración. Después se examina el siguiente ión de analito disponible más alto.

iv. Si ninguno de los anteriores es cierto, el ión de analito se deriva de un artefacto y no es experimentalmente significativo. Se elimina de más consideración.

b) Este procedimiento se repite hasta que todos los iones de analito en este momento de tiempo (y todavía no explicados) se analicen.

5) Las etapas 1 a 4 se repetirán para todos los momentos de tiempo.

6) El resultado del procedimiento anterior identifica todos los iones de analito como tanto derivados de una molécula de mayoría C-12, una molécula de mayoría C-13, un patrón como los elimina de la consideración.

a) Todos los iones de analito están ahora agrupados en el tiempo para formar picos (si esto no se ha hecho todavía. En otras manifestaciones esto puede hacerse en una etapa anterior). Estas características de pico incluyen un tiempo inicial, tiempo final, tiempo máximo, masa base, altura máxima del ión base, etc.)

b) Para todas las moléculas de mayoría C-12 se busca una molécula de mayoría C-13 coincidente. Esta molécula coincidente demuestra un compás similar; es decir, tiempo inicial, tiempo final y tiempo máximo similares. Los valores a recoger incluyen:

i. La diferencia de masa entre la masa base de mayoría C-12 y la masa base de mayoría C-13 representa el número de carbonos en la molécula.

ii. La relación entre la altura máxima de la molécula de mayoría C-12 y la altura máxima de la molécula de mayoría C-13.

c) Para todos los patrones se anota su tiempo.

7) El alineamiento de todos los pares puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales para calcular o normalizar los índices de retención (ilustrativamente por el uso de los patrones internos).

8) Se calcula la desviación media y estándar para los valores de relación para todos los pares.

9) Todos los pares que desvían relaciones de valores atípicos se identifican por la evaluación de su desviación de la media. Esta etapa final de la evaluación puede variar según el diseño experimental y condiciones analíticas.

Hay muchas formas posibles de reorganizar las etapas descritas aquí o realizar cada uno de sus resultados, pero todas necesitarán realizar la mayoría de las etapas anteriores.

También se contempla una biblioteca que contiene una pluralidad de perfiles de miembros de relaciones isotópicas fenotípicas de diferentes organismos. Los perfiles de miembros individuales de la biblioteca pueden ser relaciones fenotípicas de cepas, variedades, especies o géneros de organismos tales como bacterias, levadura, hongos, algas, plantas superiores o animales tales como *E. coli*, *S. aureus*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, canobacterias, alga verde y alga roja, o similares. Los miembros de la biblioteca también pueden ser de un único género de manera que pueda determinarse si un organismo desconocido del género *Escherichia* es *E. adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* o *E. vulneris*. Debe entenderse que tales bibliotecas pueden prepararse para sustancialmente cualquier tipo de organismo.

Una biblioteca contemplada contiene una pluralidad de perfiles de miembros de relaciones isotópicas fenotípicas de diferentes organismos. Cada perfil de miembro es una pluralidad de relaciones obtenidas de espectros de masas del primer isótopo con respecto al segundo isótopo que están presentes en cada pico de analito analizado con respecto a la mediana de la relación isotópica de una muestra de material compuesto.

Esa muestra de material compuesto comprende una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras. La primera muestra es una muestra patrón (de control) que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa de un primer organismo. Cada compuesto constituyente comprende las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo. La segunda muestra es una muestra de ensayo (de prueba) que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del organismo cuyo fenotipo se ensaya. Cada compuesto constituyente comprende las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo. La primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos son diferentes entre sí, y el primer y segundo isótopos son distintos de H o D.

Un procedimiento contemplado es general en su aplicabilidad y se ilustra por los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplos ilustrativos

Ejemplo 1: Ensayo de *E. coli*

En este caso, el diseño experimental se fija para comparar cultivos bacterianos para determinar si son cepas iguales o diferentes. En este caso, debido a la naturaleza de la cuestión a responder, el control apropiado es un cultivo contemporáneo.

Cultivos que crecen activamente de dos *Escherichia coli* (bacterias *E. coli*) se someten a uno o más ciclos de lavado/clarado usando un tampón isotónico, pero no nutricional (IN) (mediante centrifugación). El primer cultivo es de una cepa conocida, mientras que el segundo cultivo es de una cepa desconocida. Los sedimentos resultantes de células se resuspenden en el mismo tampón IN y se distribuyen para crear dos conjuntos de 12 muestras que tienen un número igual o aproximadamente igual de células bacterianas.

El tampón IN se retira de estas 24 muestras. Se preparan dos medios idénticos, en uno (llamado en el presente documento "medio de C-13") la única fuente de carbono es ^{13}C -glucosa isotópicamente enriquecida (como se trata anteriormente) y en el otro (llamado en el presente documento "medio de C-12") la única fuente de carbono es ^{12}C -glucosa isotópicamente enriquecida (como se trata anteriormente).

Doce muestras del primer cultivo se lavan tres veces con el medio de C-13 y las 12 muestras restantes del cultivo que va a ensayarse se lavan similarmente con el medio de C-12. Después del lavado final, las células se dispensan en un recipiente adecuado para el crecimiento y en el que el único medio disponible es tanto el medio de C-12 como de C-13 en el que las células se lavaron por última vez.

Realizando las etapas anteriores se preparan dos conjuntos de 12 cultivos idénticos, cada uno de los cuales tiene aproximadamente el mismo número de células estadísticamente similares, pero la mitad de las cuales usan medio de C-12 para el crecimiento (denominadas en el presente documento "muestras de C-12") y las restantes usan medio de C-13 para el crecimiento (denominadas en el presente documento "muestras de C-13"). Para los fines de esta ilustración, las muestras de C-13 se consideran el control y las muestras de C-12 son el cultivo que va a ensayarse, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo importante es que las muestras se manipulen de manera que para cada muestra de C-13 haya un equivalente de muestra de C-12.

Ambos conjuntos de muestras se cultivan hasta que alcanzan el crecimiento exponencial y han experimentado varias divisiones celulares. Las células/organismos se recogen después a tiempos especificados, y las muestras se emparejan. Las muestras de coincidentes de C-13 (control) y C-12 (ensayadas) se combinan durante el procedimiento de recogida para crear una única muestra de material compuesto. En este ejemplo pueden crearse tres materiales compuestos separados en el tiempo 0, 1, 4 y 24 horas, respectivamente.

Las células de las muestras de material compuesto se lisan y el lisado se fracciona sobre una columna de exclusión por tamaño o HPLC o CG para proporcionar muestras cuyas moléculas de soluto (analitos) tienen un peso molecular máximo inferior a aproximadamente 1000 uma. Un análisis detallado del espectro de masas se realiza en las muestras de material compuesto.

Se determinan las relaciones de C12/C13 individuales para cada ión de analito ya que es el valor promedio (o la media o mediana) para la muestra de material compuesto completa. Se determinan las relaciones de C12/C13 relativas de los analitos de cada muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de las relaciones muestra.

Un compuesto de analito que tiene una relación de C12/C13 que es una desviación estadísticamente significativa (dos o más desviaciones estándar) de la mediana de la relación es indicativa de una diferencia en fenotipo. Por ejemplo, si la relación promedio para los analitos es 1 (1:1 de relación de C12/C13), pero algunos analitos tienen relaciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que son valores atípicos para la población general, por ejemplo, aquellos con relaciones de 10 y 0,1, son aquellos que indican más fuertemente un punto de alteración bioquímica.

Debido a que cada variante genética produce un patrón distintivo con respecto a un control de "patrón", pueden no solo caracterizarse las diferencias, sino también crear una "biblioteca" de tales diferencias para caracterizar el organismo de no control. La construcción de tales bibliotecas requiere solo que las condiciones para el crecimiento sean estrechamente controladas y sean reproducibles.

Ejemplo 2: Organismos pluricelulares - *C. elegans*

El diseño experimental se fija para ensayar un animal, para ilustración aquí el nematodo, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Debido a la naturaleza de la cuestión a responder, el control apropiado es una alícuota del organismo a tiempo cero, que en este caso es una hora después de la aplicación de la segunda ronda de medio fresco.

Un cultivo que crece activamente de un *C. elegans* de control y su materia prima se somete a uno o más ciclos de lavado/aclarado usando un tampón isotónico, pero no nutricional (IN) (mediante centrifugación). El sedimento resultante de nematodos se resuspende en el mismo tampón IN. Se usa un procedimiento similar para la muestra de nematodos que va a ensayarse. Así, se crean 2 muestras, cada una de las cuales tiene un número igual o aproximadamente igual de nematodos. El tampón IN se retira de estas 2 muestras.

Se preparan dos medios idénticos. En uno (llamado en el presente documento "medio de C-12"), la única fuente de carbono es ^{12}C -glucosa isotópicamente enriquecida (sobre la que crece la materia prima bacteriana del nematodo), y en el otro (llamado en el presente documento "medio de C-13") la única fuente de carbono es ^{13}C -glucosa isotópicamente enriquecida.

La muestra ensayada se lava tres veces con el medio de C-12 y la muestra restante se trata igualmente con el medio de C-13. Después del lavado final, los nematodos se dispensan a un recipiente adecuado para el crecimiento y en el que el único medio que contiene nutrientes disponible es tanto el medio de C-12 como de C-13 en el que las

células se lavaron por última vez.

Entonces se preparan dos cultivos de *C. elegans* idénticos, ambos de los cuales tienen aproximadamente el mismo número de organismos. Uno de los cultivos usa medio de C-12 para el crecimiento (denominado en el presente documento "muestras de C-12") y el otro usa medio de C-13 para el crecimiento (denominado en el presente documento "muestras de C-13"). (Para los fines de esta ilustración, la muestra de C-13 es el cultivo de control y la muestra de C-12 es la muestra que va a ensayarse. Lo importante es que las muestras se manipulen de manera que haya un equivalente de muestra de C12 para la muestra de C13. Debe permitirse que ambas muestras crezcan hasta alcanzar el crecimiento exponencial y experimenten al menos 1 ó 2 generaciones completas. Después del periodo de crecimiento apropiado, el medio de la muestra de C13 se elimina y se sustituye con medio de C-13 fresco. La muestra de C-12 se trata similarmente y también se administra medio fresco.

Después del periodo de crecimiento posterior apropiado, el medio de la muestra de C-13 se elimina y se sustituye con medio de C-13 fresco y los nematodos se separan por edad. Solo se permite que continúe el estadio más joven. La muestra de C-12 se trata similarmente y también se administra medio fresco.

Después de pasar un periodo de una hora (T=0), el cultivo de C-13 se separa en alícuotas en 24 porciones iguales y los nematodos en cada alícuota se recogen y se congelan (como los controles). Tres de los cultivos de C-12 (ensayados) se recogen similarmente en el tiempo (T=0) y los nematodos recogidos se añaden a sus controles recogidos de C-13 coincidentes. Conjuntos por triplicado adicionales de los nematodos se recogen a T=24, T=48, T=120 horas. A medida que se recogen estos nematodos se emparejan con sus muestras de T=0 coincidentes para crear las muestras de material compuesto. Las muestras de material compuesto se congelan rápidamente en nitrógeno líquido para almacenamiento. Las muestras congeladas se muelen, se descongelan y se mezclan con agua destilada u otro dispersante acuoso, y luego la muestra dispersada así preparada está en sus componentes en masa, y aquellos que tienen un peso molecular de aproximadamente 1000 uma o menos se separan adicionalmente y los analitos separados resultantes se ensayan por espectroscopía de masas como se trata anteriormente.

Un análisis detallado (metabolómico, proteómico, transcriptómico, o análisis de cualquier otra clase de compuestos basados en carbono) se realiza en las muestras de material compuesto. Se determinan las relaciones de C12/C13 individuales para cada ión de analito, ya que es el valor promedio (o mediana) para la muestra de material compuesto completa. Se determinan las relaciones de C12/C13 relativas de los analitos de cada muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de las relaciones de muestra. Un compuesto de analito que tiene una relación de C12/C13 que es una desviación estadísticamente significativa (dos o más desviaciones estándar) de la relación promedio es indicativa de una diferencia en el fenotipo entre los dos nematodos examinados.

Ejemplo 3: Comparaciones de ratas de laboratorio

Seres humanos, junto con otros organismos grandes, representan un caso extremo en el que es extremadamente poco probable que se consiga un objeto basado en C-13. Por tanto, es necesario fabricar una mezcla sintética de compuestos basados en C-13 que se aproxime a la muestra requerida. Esto se lleva a cabo estableciendo concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes en una población representativa y creando una mezcla para esta especificación.

Si la diversidad biológica del organismo es alta, es útil crear la muestra "promediada". En el caso de un mayor organismo esto puede solo aproximarse creando una muestra "promedio" mediante una mezcla sintética de compuestos apropiados a concentraciones apropiadas usando equilibrios isotópicos apropiados.

Esta preparación de una muestra promediada pueden necesitar que la composición de muestras individuales forme una muestra experimental y de control "biológicamente promediada". En este ejemplo, el diseño experimental se fija con el fin de determinar el efecto de estrés fisiológico (inducido por ayuno durante 24 horas) en un animal, para ilustración aquí la rata, *Rattus norvegicus*. Debido a la naturaleza de la cuestión a responder, el control apropiado es una muestra de material compuesto de plasma de rata y la muestra experimental es una muestra de material compuesto de plasma de rata de ratas que se han sometido al tratamiento experimental, que en este ejemplo será inanición durante 24 horas. En una manera similar, animales con enfermedades infecciosas inducidas pueden compararse con animales sin enfermedad, o animales que tienen diabetes pueden compararse con animales no diabéticos normales, y similares. Debido a la naturaleza del experimento es conveniente que la población de control sea el animal de C-13 ya que el control no necesita ser contemporáneo y puede ser un control patrón que está disponible antes de la presente ejecución del experimento.

Debido a que el sistema de prueba consiste en animales, el ensayo tiene más ruido debido a la mayor varianza inherente en el material de fuente. El uso de promediar muestras compensa parcialmente este problema ya que promedia la variabilidad biológica inherente, haciendo así las muestras más representativas de la norma. Esto produce un diseño experimental simplificado, aunque requiere preparación previa más compleja.

A la edad de 6 semanas, los animales experimentales se someten a la condición experimental, para ilustración aquí

ayuno durante 24 horas empezando en el momento en el que empieza el ciclo de luz. Por tanto, las muestras experimentales, muestras de plasma, se toman al principio del ciclo de luz al día siguiente.

Todas las muestras del grupo experimental se recogen similarmente.

5 Se crea una muestra experimental de material compuesto (en este caso, promedio) mezclando alícuotas iguales de plasma de todos los animales experimentales.

10 Las muestras de control se han recogido similarmente y combinado (en este caso, promedio) de animales que se han alimentado con una dieta equivalente a C-13.

15 Realizando las etapas 1 a 5 debe terminarse con dos muestras similares que contienen el contenido de información requerida, concretamente la definición de la condición de respuesta experimental y la definición de la condición de control. Esto crea el par de muestra que va a mezclarse para crear la muestra de material compuesto para análisis.

20 Un análisis detallado (metabolómico, proteómico, transcriptómico, o análisis de cualquier otra clase de compuestos basados en carbono) se realiza en la muestra de material compuesto. Se determinan las relaciones de C12/C13 individuales para cada ión de analito, ya que es el valor promedio (o mediana) para la muestra de material compuesto completa. Se determinan las relaciones de C12/C13 relativas de los analitos de cada muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de las relaciones de muestra. Un compuesto de analito que tiene una relación de C12/C13 que es una desviación estadísticamente significativa (dos o más desviaciones estándar) de la relación promedio es indicativa de una diferencia en el fenotipo entre dos poblaciones de ratas de laboratorio examinadas.

25 El uso del artículo “un” o “una” pretende incluir uno o más.

30 La anterior descripción y los ejemplos están previstos como ilustrativos y no deben tomarse como limitantes. Todavía otras variaciones dentro de las limitaciones de las reivindicaciones adjuntas son posibles y se presentarán fácilmente por sí mismas a aquellos expertos en la materia.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para ensayar similitud o desemejanza fenotípica de un organismo ensayado en comparación con la de un organismo patrón de la misma especie que comprenden las etapas de:

- 5
- (a) proporcionar una muestra de material compuesto que comprende una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras, siendo dicha primera muestra una muestra patrón que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma (Da) que están presentes en una muestra representativa de la especie de organismo cuyo fenotipo va a ensayarse, estando dichos compuestos constituyentes (i) disueltos o dispersos en un primer medio líquido y (ii) estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo,
- 10
- siendo dicha segunda muestra una muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del organismo cuyo fenotipo va a ensayarse, estando dichos compuestos constituyentes (i) disueltos o dispersos en un segundo medio líquido y (ii) estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo, siendo dicha primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos diferentes entre sí, y siendo dicho primer y segundo isótopos distintos de H o D;
- 15
- (b) analizar por espectroscopía de masas dicha muestra de material compuesto para analitos;
- (c) determinar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada analito analizado;
- (d) determinar la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto; y
- 20
- (e) comparar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada analito analizado con la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto, siendo un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas analizadas se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto fenotípicamente distinto del organismo patrón, y siendo un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas analizadas no se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas iónicas analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto fenotípicamente similar al organismo patrón.
- 25
- 30

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos compuestos constituyentes de la muestra de ensayo contienen dicho primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo en sus cantidades naturalmente abundantes.

35

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo se analiza para menos de todos los analitos observados.

40

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer y segundo medios líquidos son los mismos.

45

5. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer y segundo medios líquidos son acuosos.

6. Un procedimiento para identificar similitud o desemejanza fenotípica de un organismo ensayado con respecto al de un organismo patrón de la misma especie que comprende las etapas de:

- 45
- (a) proporcionar un primer muestra patrón que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa de la especie de organismo cuyo fenotipo va a ensayarse, estando dichos compuestos constituyentes (i) disueltos o dispersos en un medio acuoso y (ii) estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo;
- 50
- (b) proporcionar una segunda muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en el organismo cuyo fenotipo va a ensayarse, estando dichos compuestos constituyentes (i) disueltos o dispersos en un medio acuoso y (ii) estando comprendido cada compuesto constituyente del primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo presente en su relación naturalmente abundante, siendo dicha primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos diferentes entre sí, y siendo dicho primer y segundo isótopos distintos de H o D;
- 55
- (c) mezclar cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras para formar una muestra de material compuesto;
- 60
- (d) analizar por espectroscopía de masas dicha muestra de material compuesto para analitos;
- (e) determinar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada analito analizado;
- (f) determinar la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto; y
- 65
- (g) comparar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada analito analizado con la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto, siendo un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas de pico analizadas se desvían estadísticamente significativamente de las

relaciones isotópicas de pico analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto fenotípicamente distinto del organismo patrón, y siendo un organismo ensayado cuyas relaciones isotópicas analizadas no se desvían estadísticamente significativamente de las relaciones isotópicas analizadas de la mediana de la muestra de material compuesto fenotípicamente similar al organismo patrón.

- 5
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha muestra de ensayo se obtuvo de un cultivo celular o una planta o un animal.
- 10
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha muestra de ensayo se obtiene de un cultivo celular que comprende células vegetales, preferentemente células vegetales superiores o células de alga.
9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha muestra de ensayo se obtiene de un cultivo celular que comprende células bacterianas.
- 15
10. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la muestra de ensayo se obtiene de un cultivo celular que comprende células animales.
- 20
11. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dichas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo presentes en los compuestos constituyentes de la primera muestra patrón están presentes en una relación invertida de cantidad con respecto a la relación de abundancia natural de dicho primer y segundo isótopos estables de un primer átomo de los compuestos constituyentes de la segunda muestra de ensayo.
- 25
12. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha primera muestra patrón es una muestra sintética que se prepara basándose en el conocimiento predeterminado de la mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del primer organismo y las cantidades de aquellos constituyentes.
- 30
13. Un procedimiento para crear una biblioteca de perfiles de miembros de relaciones isotópicas fenotípicas de diferentes organismos, siendo cada perfil de miembro una pluralidad de relaciones obtenidas de espectros de masas del primer isótopo con respecto al segundo isótopo que están presentes en cada pico de analito analizado con respecto a la mediana de la relación isotópica de una muestra de material compuesto de cada organismo diferente, estando dicha muestra de material compuesto comprendida de una mezcla de cantidades sustancialmente iguales de la primera y segunda muestras,
- 35
- siendo dicha primera muestra una muestra patrón que comprende concentraciones promedio de una mayoría de compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa de un primer organismo, estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas primeras cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de un primer átomo, y
- 40
- siendo dicha segunda muestra una muestra de ensayo que comprende compuestos constituyentes que tienen una masa molecular inferior a 1000 uma que están presentes en una muestra representativa del organismo cuyo fenotipo se ensaya, estando comprendido cada compuesto constituyente de las mismas segundas cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos estables de dicho primer átomo,
- 45
- siendo dicha primera y segunda cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopos diferentes entre sí, y siendo dicho primer y segundo isótopos distintos de H o D, en el que el procedimiento comprende:
- 50
- (a) analizar por espectroscopía de masas dicha muestra de material compuesto de cada organismo diferente para picos de analito;
- (b) determinar la relación del primer isótopo con respecto al segundo isótopo para cada pico de analito analizado;
- (c) determinar la relación isotópica de la mediana de la muestra de material compuesto; y
- (d) guardar la pluralidad de relaciones obtenidas de espectros de masas del primer isótopo con respecto al segundo isótopo que están presentes en cada pico de analito analizado con respecto a la mediana de la relación isotópica de la muestra de material compuesto en un perfil de miembro.
- 55
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que perfiles de miembros individuales de la biblioteca son relaciones fenotípicas de cepas, variedades, especies de un organismo.
- 60
15. El procedimiento según la reivindicación 6 o el procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho primer y segundo isótopos están seleccionados del grupo que consiste en ^{12}C y ^{13}C ; ^{16}O , ^{17}O y ^{18}O ; ^{14}N y ^{15}N ; ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S ; ^{35}Cl y ^{37}Cl ; ^{24}Mg , ^{25}Mg y ^{26}Mg ; ^{27}Si , ^{28}Si y ^{29}Si ; ^{41}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , y ^{44}Ca ; y ^{79}Br y ^{81}Br .

Fig 1.

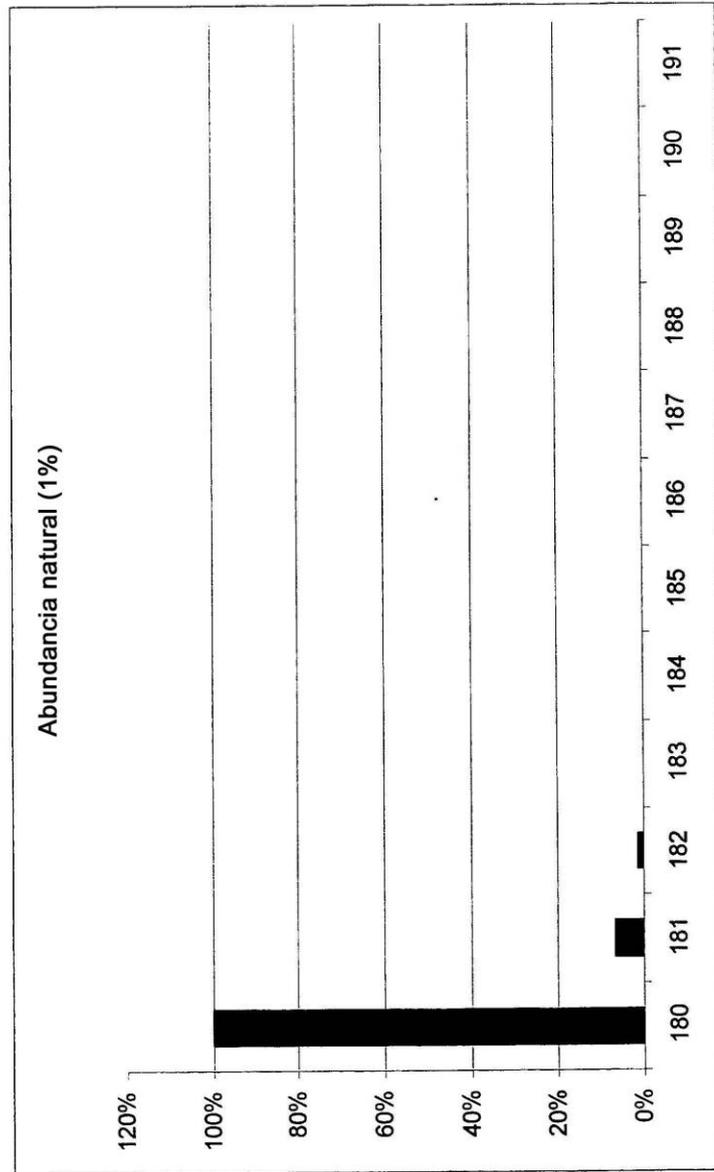


Fig. 2

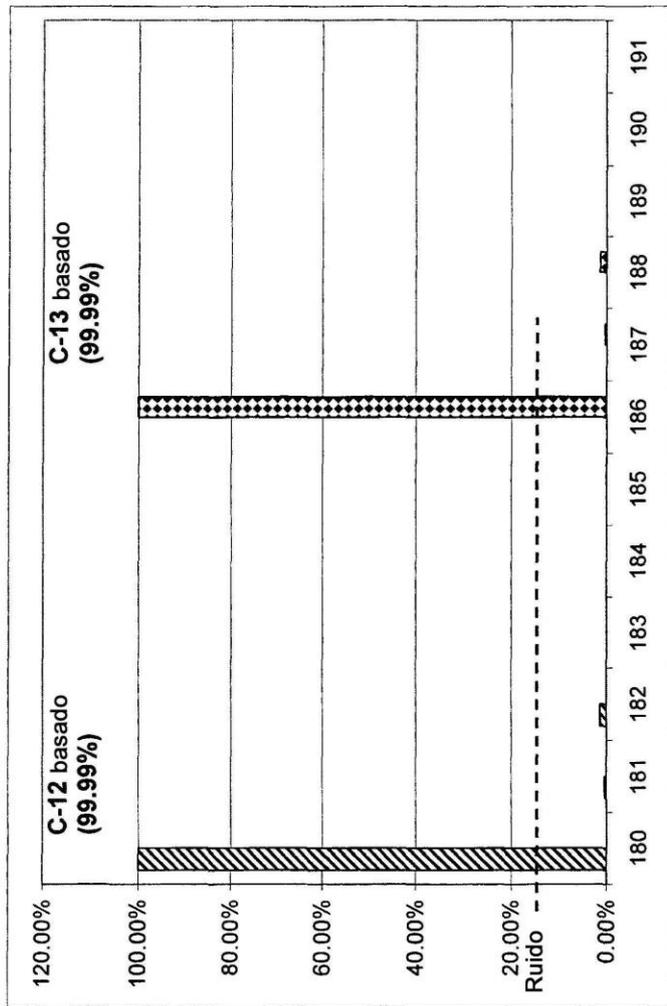


Fig. 3

