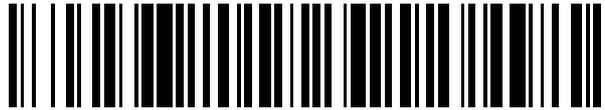


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 306**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/34** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2004 E 04782672 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 1664325**

54 Título: **Métodos de espectrometría de masas para la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y niveles de metabolitos**

30 Prioridad:

**29.08.2003 US 652732**

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

**22.01.2015**

73 Titular/es:

**PERKINELMER HEALTH SCIENCES, INC.**

**(100.0%)**

**549 Albany Street**

**Boston MA 02118, US**

72 Inventor/es:

**CERDA, BLAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 527 306 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

Métodos de espectrometría de masas para la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y niveles de metabolitos

**Antecedentes de la invención**

5 La presente invención se refiere de manera general a la medicina de diagnóstico y más específicamente a métodos para diagnosticar trastornos metabólicos.

El metabolismo es el proceso de construcción de las estructuras moleculares del organismo a partir de nutrientes (anabolismo) y su descomposición para producir energía (catabolismo). Los procesos metabólicos dan como resultado crecimiento, producen energía, eliminan residuos y controlan la distribución de nutrientes en el organismo.  
10 La homeostasis, o un estado estacionario, en el organismo es un resultado del metabolismo normal.

Las enzimas desempeñan un papel importante en el metabolismo porque catalizan la conversión de una molécula en otra durante procesos metabólicos. Cuando una enzima metabólica es defectuosa o está presente en una cantidad anómala en un individuo, puede producirse como resultado un trastorno metabólico. Los trastornos metabólicos se deben con frecuencia a la herencia genética que conduce a ausencia o sobreproducción de una  
15 enzima o producción de una enzima defectuosa.

Como ejemplo, las deficiencias producidas por un gen inactivo pueden impedir que el organismo produzca una enzima (o enzimas) necesaria para descomponer determinados aminoácidos o tipos de grasas. Una deficiencia enzimática de este tipo impide normalmente el metabolismo normal de un nutriente, provocando que el nutriente o su metabolito se acumule en el organismo hasta niveles tóxicos. Una deficiencia enzimática también puede provocar deficiencias de nutrientes cuando una enzima no puede producir un producto final normal de un proceso metabólico.  
20 Las deficiencias de nutrientes resultantes de trastornos metabólicos pueden conducir a una alteración del crecimiento y el desarrollo, y otros problemas graves de salud.

Se conocen diversos métodos de análisis y examen para detectar enfermedades.

Se describen aplicaciones de examen clínico para enfermedades hereditarias usando espectrometría de masas en tándem por Rashed M. S. en "Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases", Journal of Chromatography B, vol. 758, 2001, páginas 27-48. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.  
25

En el documento US 6.258.605 se dan a conocer métodos para examinar a recién nacidos usando espectrometría de masas en tándem por electropulverización para la detección de metabolitos. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.  
30

En el documento US 5.719.035 se dan a conocer métodos para someter a ensayo la actividad de enzimas y detectar una lectura fluorescente. En ese documento no se describen la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.

Se dan a conocer diversos análisis de metabolitos de biotina por IM W. B., *et al.* en "Bacterial Degradation of Biotin", J. Biol. Chem., vol. 248, n.º 22, 1973, páginas 7798-7805. La divulgación se limita a mostrar "espectros de masas de ésteres metílicos del catabolito 2-B-1 y d-bisnorbiotina" en la figura 6.  
35

En el documento US 6.455.321 se dan a conocer métodos de examen de recién nacidos usando espectrometría de masas en tándem por electropulverización para la detección de metabolitos. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.

En el documento US 5.629.210 se da a conocer una prueba de examen rápido para detectar el síndrome de Smith-Lemli-Opitz. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.  
40

En el documento US 6.670.194 se da a conocer un análisis cuantitativo rápido de proteínas o función de proteínas en mezclas complejas. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.  
45

Se dan a conocer ensayos de SIM específicamente diseñados para HMG-CoA reductasa en microsomas de hígado de rata purificados por M. Galli-Kienle *et al.* en "Evaluation of enzyme activities by gas chromatography-mass spectrometry: HMGCoA reductase and cholesterol 7 $\alpha$ -hydrolase" Journal of Chromatography, vol. 289, 1984, páginas 267-276. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.  
50

Se dan a conocer ensayos de actividad aldehído deshidrogenasa de levadura purificada por L. M. Benson *et al.* en "Simultaneous structure-activity determination of disulfiram photolysis products by on-line continuous-flow liquid secondary ion mass spectrometry and enzyme inhibition assay", Journal of chromatography, vol. 693, 1995, páginas

162-166. El documento no da a conocer la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y nivel de analitos.

5 Muchos trastornos metabólicos hereditarios son mortales en las primeras semanas o meses de vida postnatal, por ejemplo, defectos graves en la conversión de piruvato en acetil-coenzima A (CoA), algunos defectos en el ciclo de la urea, y defectos graves en el procesamiento de la fructosa. Los lactantes y niños con un trastorno metabólico tratable se identifican con frecuencia mediante examen de recién nacidos en países desarrollados. Por ejemplo, las pruebas para detectar fenilcetonuria es una práctica rutinaria en países desarrollados. La fenilcetonuria es un ejemplo de un trastorno metabólico hereditario relativamente común que se produce en aproximadamente uno de cada 16.000 nacimientos vivos en los Estados Unidos. Los individuos que tienen fenilcetonuria no producen la enzima necesaria para descomponer la fenilalanina (un aminoácido). Afortunadamente, cuando se reconoce, este trastorno metabólico puede tratarse satisfactoriamente mediante restricción de la dieta.

15 Desafortunadamente, no se examina normalmente a los recién nacidos para detectar otros trastornos metabólicos tales como homocisteinuria, enfermedad de orina con olor a jarabe de arce, trastornos de ácidos orgánicos y trastornos de oxidación de ácidos grasos. Como resultado, con frecuencia estos trastornos se detectan en lactantes y niños tras haberse producido el daño y resultan evidentes efectos tales como retraso en el desarrollo y retraso mental. Sin embargo, con frecuencia tales efectos pueden reducirse o evitarse con una detección temprana y restricción de la dieta sostenida. Tal detección temprana implica examinar una muestra de sangre para detectar una actividad de enzimas o un marcador metabólico (un metabolito).

20 No se ha dispuesto de pruebas para recién nacidos extendidas para detectar múltiples trastornos metabólicos hereditarios debido, en parte, al coste asociado con cada prueba. Un enfoque para reducir los costes es examinar actividades de múltiples enzimas y metabolitos y en una única prueba. Sin embargo, el desarrollo de pruebas de múltiples enzimas/metabolitos se ha visto dificultado por las diferentes condiciones necesarias para las pruebas de enzimas en comparación con las pruebas de metabolitos. En la actualidad, no pueden llevarse a cabo pruebas de enzimas y metabolitos simultáneamente a partir de una única muestra de paciente.

25 Por tanto, existe la necesidad de métodos para diagnosticar eficazmente un trastorno metabólico en un individuo. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico en un individuo.

30 El método implica (a) poner en contacto una muestra para determinar la presencia de (i) una o más enzimas metabólicamente indicativas que tienen una actividad alterada como resultado de un trastorno metabólico y (ii) uno o más analitos metabólicos, que tienen una cantidad alterada como resultado de un trastorno metabólico, con uno o más sustratos para dicha una o más enzimas para producir una mezcla de reacción, en condiciones en las que al menos una de dichas enzimas puede actuar sobre un sustrato correspondiente para generar al menos un producto; (b) poner en contacto dicha mezcla de reacción con un reactivo que inhibe la capacidad de dicha una o más enzimas para actuar sobre un sustrato correspondiente, en el que dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto son solubles en dicho reactivo; para producir una muestra de prueba y (c) determinar la cantidad o presencia de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto contenidos en dicha muestra de prueba usando espectrometría de masas, en el que una cantidad o presencia determinada de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto se correlaciona con la presencia o ausencia de dicho trastorno metabólico. Una muestra usada en un método de la invención puede ser, por ejemplo, una muestra de líquidos corporales, tal como sangre, y puede obtenerse de un neonato, recién nacido, niño o adulto. En una realización, el método puede incluir, en la etapa (a) poner en contacto la muestra con uno o más sustratos de referencia. En otra realización, el método puede incluir, en la etapa (b), poner en contacto la muestra con uno o más productos de referencia. En una realización adicional, el método puede incluir, en la etapa (d), antes de la determinación, añadir uno o más productos de referencia correspondientes al al menos un producto. En aún otra realización, el método puede incluir, en la etapa (d), antes de la determinación, añadir uno o más analitos de referencia correspondientes al uno o más analitos metabólicos contenidos en la muestra.

La invención proporciona otro método para detectar un trastorno metabólico en un individuo en el que el uno o más sustratos están presentes en forma seca en un recipiente.

### 50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la detección simultánea de actividad biotinidasa y analitos metabólicos (aminoácidos y carnitinas) usando un método de la invención.

### Descripción detallada de la invención

55 Esta invención se refiere al descubrimiento de pruebas de diagnóstico de trastornos metabólicos que permiten la detección de al menos dos marcadores relevantes simultáneamente y a partir de una única muestra. En particular, el inventor ha descubierto que puede usarse una muestra para detectar simultáneamente un analito metabólico, así

como actividad de una enzima metabólica, usando espectrometría de masas.

La presente invención implica detectar al menos dos marcadores o indicios de uno o más trastornos metabólicos a partir de una única muestra. Al menos un indicio corresponde a la actividad de una enzima metabólicamente indicativa en la muestra, y al menos un indicio corresponde a la presencia o cantidad de un analito metabólico contenido endógenamente en la muestra. Métodos clínicos anteriores para el examen genético usando espectrometría de masas sólo detectaban analitos metabólicos en una única muestra. En particular, Chace (documentos US 6.258.605 y US 6.455.321) describe la preparación de una muestra de paciente (mancha de sangre seca) mediante extracción en metanol antes del análisis. En tales condiciones, las enzimas son inactivas de tal manera que la medición de la actividad de enzimas es inviable, además, no se contempla.

Por el contrario, métodos bien conocidos para determinar la actividad enzimática no incluyen la detección de analitos metabólicos, sino que en su lugar miden una etiqueta en el producto enzimático, tal como una etiqueta fluorescente. Los modos de detección para productos marcados con etiqueta no pueden detectar simultáneamente analitos metabólicos presentes en una muestra de paciente. Otra desventaja de los métodos fluorimétricos con respecto a los ensayos enzimáticos es que los sustratos artificiales marcados con etiqueta con un grupo fluorescente grupo son lo bastante diferentes de sus equivalentes naturales como para que la actividad de enzimas hacia tales sustratos se vea inherentemente reducida y por tanto se reduce la sensibilidad de los ensayos. Los métodos de la invención pueden implicar ventajosamente la detección de actividad de enzimas metabólicamente indicativas hacia sustrato natural.

Tal como se describe en el ejemplo I, se determinaron simultáneamente la actividad de la enzima metabólicamente indicativa biotinidasa, así como la concentración de alfa-aminoácidos y carnitinas, a partir de una única muestra. Tal como se muestra en la figura I, a pesar de su carácter múltiplex, la sensibilidad del método para detectar biotinidasa (figura 1) es comparable al método de ensayo enzimático fluorimétrico bien conocido. De manera similar, tal como se muestra en las tablas 3 y 4, un método de la invención tiene sensibilidad comparable a métodos de espectrometría de masas bien conocidos que miden analitos sin considerar las actividades de enzimas. Basándose en este descubrimiento de detección simultánea de analitos metabólicos y actividad de enzimas a partir de una única muestra, la invención proporciona métodos para detectar trastornos metabólicos.

La detección de un trastorno metabólico puede usarse en el diagnóstico o la predicción de la propensión a un trastorno metabólico porque los indicadores bioquímicos examinados usando los métodos de la invención son indicativos de un trastorno metabólico, tanto si han resultado evidentes síntomas fisiológicos o de comportamiento del trastorno como si no.

Los métodos de la invención también son útiles para monitorizar el metabolismo de un individuo, tal como uno que se somete a tratamiento para un trastorno metabólico. Como ejemplo no limitativo, los métodos pueden usarse para determinar la eficacia terapéutica de un tratamiento particular. Basándose en esta determinación, al individuo se le pueden ofrecer opciones terapéuticas adicionales o alternativas. Los métodos de la invención también pueden ser útiles para evaluar el cumplimiento del paciente con una modalidad de tratamiento particular, tal como restricción de la dieta. Por tanto, la invención es aplicable al examen, diagnóstico, pronóstico, monitorización de terapia y cumplimiento, y cualquier otra aplicación en la que la determinación de la presencia o cantidad de uno o más analitos metabólicos y al menos una actividad de enzima metabólicamente indicativa sea útil.

Los métodos de la invención implican detectar simultáneamente uno o más analitos y una o más enzimas metabólicamente indicativas. Proporcionando un formato multiplexado, la invención reduce ventajosamente los errores de funcionamiento técnicos porque el número de manipulaciones es menor que en pruebas realizadas por separado. Además, el coste de ensayo asociado con la detección simultánea de múltiples analitos y actividades de enzimas es menor que el asociado con pruebas individuales porque se usan menos materiales (recipientes de ensayo, materiales de transferencia de líquidos y similares) y se requiere menos tiempo de operario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "trastorno metabólico" significa cualquier estado anómalo en el organismo que provoca pérdida de control metabólico del estado estacionario del organismo. El metabolismo es el proceso fisiológico y bioquímico mediante el cual se convierten alimentos en el organismo en formas que proporcionan energía para las actividades corporales. El metabolismo incluye la creación de moléculas específicas que el organismo usa para su miríada de actividades. Tales moléculas incluyen hormonas, neurotransmisores, proteínas tales como enzimas, y constituyentes de membrana. El metabolismo también incluye procesos de degradación que permiten que las células excreten productos residuales. Los procesos metabólicos a modo de ejemplo incluyen procesos para la absorción y modificación de vitaminas y minerales; para degradar moléculas para proporcionar energía o para excretarse; procesos para producir acetil-coenzima A, aminoácidos no esenciales, colesterol, ácidos grasos de cadena larga, prostaglandinas, proteínas y lípidos complejos; y para neutralizar toxinas. Por tanto, un trastorno metabólico es un estado que interfiere con la creación o destrucción normales de moléculas biológicas que regulan la salud. Un trastorno metabólico que surge en un momento temprano en la vida y que resulta de herencia genética se denomina generalmente un "metabolopatía congénita", mientras que un trastorno metabólico que surge como resultado de enfermedad o estilo de vida se denomina generalmente "trastorno metabólico adquirido", aunque generalmente existe predisposición genética.

Niveles elevados de aminoácidos, carnitina libre y acilcarnitina son ejemplos de metabolitos que pueden ser indicativos de uno o más de varios trastornos metabólicos. La carnitina libre y las acilcarnitinas son marcadores de trastornos que se clasifican como trastornos de la oxidación de ácidos grasos (FAO) y trastornos de aciduria orgánica (OAD). De manera similar, se usan aminoácidos como marcadores para varios trastornos metabólicos conocidos colectivamente como aminoacidopatías.

En los trastornos de la oxidación de ácidos grasos (FAO), las enzimas necesarias para la descomposición de ácidos grasos no están disponibles o tienen actividad reducida. La descomposición, u oxidación, de ácidos grasos es necesaria para la producción de energía cuando los niveles de glucosa, la fuente principal de energía del organismo, son bajos. Sin este suministro de energía algunos individuos pueden tener incidencias recurrentes de bajos niveles de azúcar en sangre. En casos de ayuno, con frecuencia provocados por enfermedades tales como infecciones de oído o gripe, puede haber crisis metabólicas. Los individuos afectados pueden mostrar vómitos, diarrea, letargo, convulsiones y coma. El no diagnosticar trastornos de FAO puede dar como resultado una acumulación excesiva de grasas en el hígado, el corazón y los riñones. Esta acumulación puede provocar una variedad de síntomas, que van desde insuficiencia hepática, encefalopatía y complicaciones cardíacas y oculares hasta problemas generales con el desarrollo muscular. Muchos de estos síntomas clínicos pueden conducir a la muerte. Muchas muertes debidas a trastornos de FAO se han diagnosticado erróneamente como SIDS o síndrome de Reye.

En trastornos de aciduria orgánica (OA), las rutas metabólicas de ácidos orgánicos se ven alteradas en trastornos de OA y por tanto la acumulación de los ácidos en la sangre y la orina altera el equilibrio ácido-base del organismo. Las modificaciones o adaptaciones resultantes en las rutas metabólicas intermedias pueden provocar numerosos síntomas clínicos, incluyendo acidosis metabólica, cetosis, hiperamonemia, falta de crecimiento, septicemia o coma.

En trastornos del metabolismo de aminoácidos (aminoacidopatías), las enzimas necesarias para el metabolismo de determinados aminoácidos no están disponibles o tienen una actividad reducida. Como resultado, la concentración de los aminoácidos afectados y metabolitos alternos aumenta en el organismo del lactante. Estos excesos pueden tener efectos perjudiciales sobre la salud del lactante, incluyendo la muerte. Algunas aminoacidopatías comúnmente estudiadas son:

La fenilcetonuria (PKU) es un trastorno del metabolismo de aminoácidos aromáticos en el que la fenilalanina no puede convertirse en tirosina. Si no se trata, la PKU conduce a diversos grados de retraso mental. La hiperfenilalaninemia conduce a retraso mental y rigidez muscular. La homocistinuria conduce a enfermedad oclusiva vascular, osteoporosis, acumulación de homocistina y metionina, y retrasos en el desarrollo variables. La enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (MSUD) está provocada por un trastorno del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada que da como resultado niveles elevados de leucina, isoleucina y valina en la sangre. Si no se trata, se desarrollarán letargo que progresa a coma, retraso en el desarrollo y convulsiones. La tirosinemia tipo I (tirosinemia hereditaria) conduce a insuficiencia hepática aguda o cirrosis crónica y carcinoma hepatocelular. La citrulinemia conduce a convulsiones, anorexia, vómitos y letargo, seguido rápidamente por un coma potencialmente mortal.

Tal como se usa en el presente documento, el término “metabólicamente indicativa” cuando se usa en referencia a una enzima significa que la cantidad o actividad de la enzima se ve alterada como resultado de un trastorno metabólico en un individuo. Por tanto, la cantidad o actividad de una enzima metabólicamente indicativa puede estar aumentada o disminuida en un individuo que tiene un trastorno metabólico en comparación con un individuo libre del trastorno metabólico. Aunque la actividad de una enzima metabólicamente indicativa puede estar alterada en un individuo que tiene un trastorno metabólico, se entiende que el individuo puede estar libre de, o puede tener signos o síntomas visibles de, el trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, el término “analito metabólico” significa una sustancia que tiene una cantidad, actividad o característica física alterada en el organismo de un individuo que experimenta un trastorno metabólico en comparación con un individuo que no experimenta un trastorno metabólico. Los analitos metabólicos a modo de ejemplo incluyen un aminoácido, ácido graso y ácido orgánico, y otras moléculas biológicas pequeñas, así como una macromolécula tal como un ácido nucleico, polipéptido o hidrato de carbono, y similares.

La invención proporciona métodos para detectar un trastorno metabólico en un individuo.

Un método implica (a) poner en contacto una muestra para determinar la presencia de (i) una o más enzimas metabólicamente indicativas que tienen una actividad alterada como resultado de un trastorno metabólico y (ii) uno o más analitos metabólicos, que tienen una cantidad alterada como resultado de un trastorno metabólico, con uno o más sustratos para dicha una o más enzimas para producir una mezcla de reacción, en condiciones en las que al menos una de dichas enzimas puede actuar sobre un sustrato correspondiente para generar al menos un producto; (b) poner en contacto dicha mezcla de reacción con un reactivo que inhibe la capacidad de dicha una o más enzimas para actuar sobre un sustrato correspondiente, en el que dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto son solubles en dicho reactivo; para producir una muestra de prueba y (c) determinar la cantidad o presencia de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto contenidos en dicha muestra de prueba usando espectrometría de masas, en el que una cantidad o presencia determinada de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto se correlaciona con la presencia o ausencia de dicho trastorno

metabólico.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico, en el que el uno o más sustratos están presentes en forma seca en un recipiente.

5 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico, en el que se pone en contacto la mezcla de reacción con uno o más productos de referencia y uno o más analitos de referencia y se determina la cantidad de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto contenidos en dichas muestras de prueba con respecto a dicho uno o más productos de referencia y dicho uno o más analitos de referencia, usando espectrometría de masas.

10 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico, en el que se pone en contacto dicho recipiente con una disolución para generar dichas condiciones en las que al menos una de dichas enzimas puede actuar sobre un sustrato correspondiente para generar al menos un producto.

15 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico, en el que se separa la muestra en dos partes de muestra y se somete cada parte de muestra a las etapas (a) y (b); se combinan las dos mezclas de reacción para producir una muestra de prueba; y se someten las mezclas de reacción combinadas a la etapa (c).

20 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para detectar un trastorno metabólico, en el que se separa la muestra en dos partes de muestra, en el que la etapa (a) comprende poner en contacto cada parte de muestra con un recipiente individual, conteniendo cada recipiente dicho uno o más sustratos para dicha una o más enzimas en forma seca; se somete cada parte de muestra a la etapa (b); se combinan las dos mezclas de reacción para producir una muestra de prueba; y se someten las mezclas de reacción combinadas a la etapa (c).

25 En cualquiera de los métodos anteriores para detectar un trastorno metabólico, puede añadirse uno o más productos de referencia y/o analitos de referencia a una muestra de prueba antes de la espectrometría de masas. De manera similar, puede añadirse uno o más sustratos de referencia a una disolución o mezcla de reacción antes de dejar que avance la reacción enzimática. Tales adiciones pueden ser útiles cuando los métodos se llevan a cabo en un formato cuantitativo, tal como se describe en más detalle a continuación en el presente documento.

30 Los métodos de la invención pueden llevarse a cabo en una variedad de formatos. Como ejemplo de un procedimiento típico, se coloca una muestra de un individuo normal o uno que se sospecha que tiene un trastorno metabólico en un recipiente. El tipo de la muestra (por ejemplo, sangre completa, suero, tejido) se elige basándose en el trastorno metabólico particular, y se realiza cualquier tratamiento previo de la muestra para liberar enzimas basándose en el tipo de muestra. Se conoce una enzima que se correlaciona con el trastorno metabólico del sujeto de prueba, al igual que el sustrato de la enzima. También se conoce al menos un analito metabólico que se sabe que se correlaciona con el trastorno metabólico, o un trastorno metabólico relacionado o diferente.

35 A la muestra se le añade una disolución acuosa que contiene un sustrato para la enzima indicativa de la enfermedad metabólica. Se deja que avance la reacción enzimática durante un periodo de tiempo suficiente para que la enzima produzca una cantidad detectable o deseada de producto. Entonces se para la reacción añadiendo un reactivo de parada que incluye un analito de referencia que va a detectarse. El reactivo desnatura la enzima, pero mantiene el producto y la forma de referencia del analito metabólico en disolución (analito de referencia). Se somete la muestra a espectrometría de masas en tándem para detectar el producto, el analito metabólico y el analito de referencia. Se determina la cantidad de analito metabólico basándose en el analito de referencia, y se detecta la presencia del producto.

40 Como otro ejemplo, se añade una muestra de un individuo normal o uno que se sospecha que tiene un trastorno metabólico a un recipiente que contiene el sustrato de la enzima metabólicamente indicativa. Si la muestra está contenida en una disolución adecuada, se deja que avance la reacción enzimática. Si la muestra está en forma seca, tal como sobre membrana o papel, se aplica una disolución adecuada a la muestra cuando está en el recipiente.

45 Tras un periodo de tiempo suficiente para solubilizar la enzima o dejar que la enzima se libere del material sobre el que se seca (si está presente), se deja que avance la reacción enzimática. Como anteriormente, se deja que la reacción enzimática avance durante un periodo de tiempo suficiente para que la enzima produzca una cantidad detectable o deseada de producto. Entonces se para la reacción añadiendo un reactivo de parada que incluye un analito de referencia y un producto de referencia. Se determinan las cantidades de analito metabólico y producto enzimático basándose en el analito de referencia y el producto.

50 Como ejemplo adicional de un procedimiento para realizar un método de la invención, tras la adición del reactivo de parada, puede procesarse la muestra de prueba para separar material soluble de insoluble. La separación puede realizarse, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración y similares. Entonces puede someterse la muestra de prueba aclarada resultante a espectrometría de masas. Otra etapa opcional es añadir un detergente u otro agente solubilizante a la muestra de prueba, por ejemplo en el caso de que la mezcla de reacción y el reactivo sean inmiscibles.

Aunque no se requiere, puede derivatizarse la muestra de prueba antes de la espectrometría de masas para

potenciar la detección de la cantidad de analito metabólico, producto enzimático y/o sustancia de referencia. Un método de derivatización bien conocido a modo de ejemplo es la reacción de la muestra con ácido y butanol.

Puede usarse un método de la invención para determinar simultáneamente la presencia o cantidad de uno o más analitos metabólicos y al menos un producto enzimático. Como tales, los métodos son aplicables para determinar simultáneamente la presencia o cantidad de dos o más analitos metabólicos y al menos un producto enzimático, tres o más analitos metabólicos y al menos un producto enzimático, cuatro o más analitos metabólicos y al menos un producto enzimático, incluyendo al menos cinco analitos metabólicos, al menos cinco analitos metabólicos, al menos diez analitos metabólicos y al menos veinte analitos metabólicos, junto con al menos un producto enzimático. De manera similar, los métodos son aplicable para determinar simultáneamente la presencia de cantidad de uno o más analitos metabólicos y dos o más productos enzimáticos, uno o más analitos metabólicos y tres o más productos enzimáticos, uno o más analitos metabólicos y cuatro o más productos enzimáticos, uno o más analitos metabólicos y cinco o más productos enzimáticos, así como uno o más analitos metabólicos y más de cinco productos enzimáticos.

Los métodos de la invención implican detectar un trastorno metabólico sometiendo a prueba una "muestra". Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" significa cualquier líquido, célula, tejido biológico o fracción de los mismos que incluye una o más enzimas que tienen una enzima endógena indicativa de un estado metabólico, y uno o más analitos metabólicos endógenos. Una muestra puede ser, por ejemplo, un espécimen obtenido a partir de un individuo o puede derivarse de tal espécimen. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección de tejido obtenida mediante biopsia, o células que se colocan en, o se adaptan para, cultivo tisular. Por tanto, las muestras a modo de ejemplo incluyen fibroblastos en cultivo, células de líquido amniótico en cultivo y muestra de vellosidades coriónicas. Una muestra también puede ser un espécimen de líquido biológico tal como orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, mucosidad y similares. Una muestra puede fraccionarse adicionalmente, si se desea, para obtener una fracción que contiene tipos de células particulares. Por ejemplo, puede fraccionarse una muestra de sangre para obtener suero o fracciones que contienen tipos particulares de células sanguíneas tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra puede ser una combinación de muestras de un individuo tal como una combinación de una muestra tisular y de líquido, y similares.

Para su uso en los métodos de la invención, una muestra contiene una o más enzimas metabólicamente indicativas y uno o más analitos metabólicos endógenos. Para permitir que se produzca actividad de enzimas en disolución mientras se ponen en práctica los métodos de la invención, la muestra puede procesarse de manera adecuada para liberar enzima(s) metabólicamente indicativa(s) y/o analitos metabólicos endógenos en disolución. Los métodos bien conocidos para liberar o solubilizar enzimas en muestras que contienen células incluyen tratamiento con detergente, tratamiento mediante congelación/descongelación, secado y rehidratación, y similares.

El origen de una muestra usada en un método de la invención dependerá de la(s) enzima(s) metabólicamente indicativa(s) y el/los analito(s) metabólico(s) que van a detectarse. Los expertos en la técnica conocen bien líquidos y tejidos corporales en los que están contenidas enzimas metabólicamente indicativas y analitos metabólicos. Como ejemplos no limitativos, puede usarse una muestra de sangre completa cuando la enzima metabólicamente indicativa es biotinidasa; puede usarse una biopsia hepática cuando la enzima metabólicamente indicativa es carbamilfosfato sintetasa; puede usarse orina cuando la enzima metabólicamente indicativa es deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada y puede usarse una biopsia de piel cuando la enzima metabólicamente indicativa es alfa-L-fucosidasa.

Los expertos en la técnica conocen bien métodos para obtener muestras que conservan la actividad o integridad de las moléculas en la muestra. Tales métodos incluyen el uso de tampones y/o inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa, que conservan o minimizan los cambios en las moléculas en la muestra. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes tales como ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(P-aminoetil éter)N,N,N1,N1-tetraacético (EGTA), inhibidores de proteasa tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipain y similares, e inhibidores de fosfatasa tales como fosfato, fluoruro de sodio, vanadato y similares. Los expertos en la técnica conocen bien condiciones y tampones apropiados para aislar moléculas y pueden variarse dependiendo, por ejemplo, del tipo de molécula en la muestra que va a caracterizarse (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3ª ed. Burtis and Ashwood, eds. W. B. Saunders, Filadelfia, (1999)). También puede procesarse una muestra para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes.

Los expertos en la técnica conocen bien diversos métodos para fraccionar una muestra de líquido o extracto celular, incluyendo fraccionamiento subcelular o técnicas cromatográficas tales como cromatografía de intercambio iónico, de fase inversa e hidrófoba, de exclusión molecular, de afinidad, de inducción de carga hidrófoba, y similares (Ausubel *et al.* citado anteriormente, 1999; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, tercera edición; Springer-Verlag, Nueva York (1993); Burton y Harding, J. Chromatogr. A 814:71-81 (1998)). Como ejemplo, puede fraccionarse una muestra de suero de un individuo que contiene leucocitos para aislar leucocitos, si se desea, o subfraccionarse, por ejemplo, para obtener macrófagos, células T, células B, granulocitos, monocitos, neutrófilos,

eosinófilos, basófilos, mastocitos y similares.

Para su uso en un método de la invención, una muestra puede estar en una variedad de estados físicos. Por ejemplo, una muestra puede ser líquida o sólida, puede estar disuelta o suspendida en un líquido, puede estar en una emulsión o un gel, y puede absorberse sobre un material. Como ejemplo no limitativo, una muestra puede ser una muestra de sangre líquida, muestra de suero líquida, muestra de glóbulos blancos líquida, sangre seca, suero o muestra de glóbulos blancos, o una muestra de este tipo absorbida sobre un sustrato de papel o polímero. El ejemplo 1 describe el uso de una muestra de sangre seca en un método de la invención.

Una muestra usada en un método de la invención puede separarse antes de su uso. La separación puede ser deseable si actividades enzimáticas metabólicamente indicativas particulares presentes en la muestra requieren condiciones de ensayo distintas, o si analitos metabólicos particulares endógenamente presentes en la muestra son solubles en entornos de disolución diferentes. La separación también puede ser deseable para reducir la presencia de sustancias que interfieren con la detección de una enzima metabólicamente indicativa o un analito metabólico en una muestra, y para conservar esa parte interferente de la muestra con el fin de detectar una o más enzimas metabólicamente indicativas o analitos metabólicos distintos en la parte.

Individuos de cualquier edad pueden verse afectados por un trastorno metabólico. Por tanto, una muestra usada en un método de la invención puede obtenerse de un individuo de cualquier edad, incluyendo un neonato, recién nacido, bebé, niño y adulto. Los trastornos metabólicos a modo de ejemplo que pueden caracterizarse por la aparición en adultos incluyen enfermedad de Schindler (deficiencia de la enzima lisosomal alfa-N-acetilgalactosaminidasa), trastornos del ciclo de la urea y esfingolipidosis. Los métodos de la invención son aplicables a individuos humanos y no humanos. Como tales, los métodos pueden usarse con una muestra obtenida, por ejemplo, de cualquier sujeto veterinario o de investigación para el que se conocen una enzima metabólicamente indicativa y un analito metabólico endógeno. Los animales no humanos a modo de ejemplo incluyen un caballo, perro, gato, conejo, rata, ratón, pez, tortuga y lagarto. Los métodos de la invención también son aplicables a organismos inferiores, tales como levaduras, arqueobacterias y bacterias, y plantas, siempre que pueda obtenerse una muestra que contiene una enzima metabólicamente indicativa endógena y un analito metabólico endógeno.

Los métodos de la invención implican detectar el producto enzimático de al menos una "enzima metabólicamente indicativa". Cualquier enzima metabólicamente indicativa puede someterse a ensayo usando los métodos de la invención, siempre que se conozca un sustrato para la enzima, sustrato que es soluble en un "reactivo" seleccionado, y sustrato que puede modificarse para obtener una forma que puede detectarse de manera inequívoca mediante espectrometría de masas, si se desea, para su uso como patrón interno. Las enzimas metabólicamente indicativas están representadas en cada clase de enzimas, incluyendo oxidoreductasas, hidrolasas, liasas, transferasas, ligasas e isomerasas. Como ejemplo no limitativo, a continuación en la tabla 1 se muestran enzimas metabólicamente indicativas bien conocidas y sus trastornos metabólicos asociados. Un ejemplo específico de una enzima metabólicamente indicativa es biotinidasa.

Tabla 1:

Trastorno metabólico	Enzima metabólicamente indicativa	Analito metabólico a modo de ejemplo
Aciduria 3-metilglutacónica	Hidratasa 3-metilglutacónica	Ácido 3-metilglutacónico
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz		7-deshidrocolesterol
Aciduria 4-hidroxilbutírica	Semialdehído succínico deshidrogenasa	
Deficiencia de adenilosuccinato liasa	Adenilosuccinato liasa	Succinil-AICA ribósido y succiniladenosina
Deficiencia de beta-cetotiolasa	3-oxoácido-CoA transferasa y beta-cetotiolasa	
Deficiencia de biotinidasa	Biotinidasa	Biotina
Deficiencia de carbamilfosfato sintetasa	Carbamilfosfato sintetasa	
Galactosemia Duarte	Gal-1-P-uridiltransferasa	Gal-1-P
Síndrome de Ehlers-Danlos, tipo VI	Lisil hidroxilasa	Piridinolina (Pyr), y desoxipiridinolina, (Dpyr) y su razón
Fucosidosis	alfa-L-fucosidasa	
Deficiencia de guanidinoacetato metiltransferasa	Guanidinoacetato metiltransferasa	Guanidinoacetato
Enfermedad de Krabbe	beta-galactocerebrosidasa	
Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	Acil-CoA deshidrogenasas: de cadena corta, media y larga	
Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce	Deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada	Aminoácidos de cadena ramificada (valina, isoleucina y

		leucina)
Deficiencia de metiltetrahidrofolato reductasa	Metiltetrahidrofolato reductasa	
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa	Biopterina, pteridina, fenilalanina
Enfermedad de Tay-Sachs	beta-N-acetilglucosaminidasa, hexosaminidasa (beta-hexosaminidasa-A)	Gangliósidos
Trastorno del ciclo de la urea	Arginasa, argininosuccinato liasa, carbamil-fosfato sintetasa	Ácido orótico
Síndrome de Zellweger	Dihidroxiacetonafofato aciltransferasa, ácido fitánico oxidasa	Ácido pipercolico, ácidos grasos de cadena muy larga
Galactosemia clásica	Galactosa-1-fosfato uridil transferasa (GALT)	
Galactosemia	Galactocinasa	
Galactosemia	Uridina difosfato galactosa-4-epimerasa	
Deficiencia de G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	
Sialidosis tipo II	Neuraminidasa	
Enfermedad de Hurler	$\alpha$ -Iduronidasa	
Enfermedad de Hunter	Iduronato sulfatasa	
Enfermedad de Sanfilipo tipo A (MPS IIIA)	Heparán sulfamidasa	
Enfermedad de Sanfilipo tipo B (MPS IIIB)	$\alpha$ -N-acetil-glucosaminidasa	
Enfermedad de Sanfilipo tipo C (MPS IIIC)	Glucosamina N-acetil-transferasa	
Enfermedad de Morquio tipo A (MPS IVA)	N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa	
Enfermedad de Morquio tipo B (MPS IVB)	$\beta$ -Galactosidasa	
Enfermedad de Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	
Enfermedad de Sly (MPS VII)	$\beta$ -Glucuronidasa	
$\alpha$ -Manosidosis	$\alpha$ -Manosidasa	
$\beta$ -Manosidosis	$\beta$ -Manosidasa	
$\alpha$ -Fucosidosis	$\alpha$ -Fucosidasa	
Sialidosis	$\alpha$ -N-acetilneuraminidasa	
Galactosialidosis	$\alpha$ -N-acetilneuraminidasa, $\beta$ -galactosidasa	
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa	
Enfermedad de Schidler	$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa	
Enfermedad de Pompe	$\alpha$ -Glucosidasa	
Tay-Sachs	$\alpha$ -Hexosaminidasa	
Enfermedad de Sandhoff	$\alpha$ -Hexosaminidasa	
Gangliosidosis GM-1	$\beta$ -Galactosidasa	
Enfermedad de Gaucher	$\beta$ -Glucosidasa, quitotriosidasa	
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa	
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A	
Enfermedad de Fabry	$\alpha$ -Galactosidasa A	
Enfermedad de Farber	Ceramidasa	
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	

Los expertos en la técnica conocen bien sustratos para enzimas metabólicamente indicativas. Tal como se usa en el presente documento, el término "sustrato" significa una molécula o un complejo sobre el que actúa una enzima metabólicamente indicativa. En particular, un sustrato tiene una afinidad fisiológica por, y sobre él debe poder actuar, una enzima correspondiente. Un sustrato útil en los métodos de la invención puede ser nativo o estar modificado. Los sustratos modificados útiles en la invención tienen una masa diferente de la del sustrato nativo y conservan la capacidad para que actúe sobre ellos la enzima correspondiente. Los expertos en la técnica conocen una variedad de reacciones de modificación química útiles para aumentar la masa de un sustrato. Las modificaciones a modo de ejemplo adecuadas para sustratos incluyen marcaje isotópico y cualquier modificación química que altera la masa o

5

la razón de masa con respecto a carga del sustrato. Una vez que se modifica un sustrato, puede confirmarse la actividad usando métodos rutinarios, tales como la comparación de la actividad de enzimas usando sustrato nativo frente a sustrato modificado, o mediante la cuantificación del producto mediante uso de patrones internos usando uno o más productos de referencia de concentración conocida. Como ejemplo no limitativo, cuando la enzima metabólicamente indicativa es biotinidasa, un sustrato puede ser biocitina nativa o biocitina modificada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “producto” cuando se usa en referencia a la actividad enzimática significa una entidad molecular que se produce como resultado de que una enzima actúe sobre un sustrato. Por tanto, la presencia o cantidad de un producto en una muestra se correlaciona con la presencia o cantidad de actividad enzimática en la muestra. Como tal, una cantidad de producto determinada usando un método de la invención puede expresarse como un nivel de actividad enzimática usando cálculos rutinarios, si se desea, cuando se evalúan diferencias entre la actividad enzimática en la muestra de prueba y el nivel de referencia.

Los métodos de la invención implican el uso de un reactivo que inhibe la capacidad de una o más enzimas metabólicamente indicativas para actuar sobre un sustrato correspondiente, Tal como se usa en el presente documento, el término “inhibir” significa reducir o bloquear la actividad de enzimas de tal manera que la formación de producto es no detectable o insignificante.

Tal como se usa en el presente documento, un “reactivo” para su uso en los métodos de la invención es o contiene un agente químico que inhibe de manera específica o no específica la capacidad de una enzima metabólicamente indicativa para actuar sobre un sustrato correspondiente, y no interfiere sustancialmente con el análisis por espectrometría de masas. Reactivos no específicos a modo de ejemplo que inhiben reacciones enzimáticas son caótopos, que son agentes químicos que desnaturalizan proteínas, y disoluciones que contienen caótopos. Ejemplos no limitativos de caótopos son alcoholes, tales como metanol, etanol y alcohol isobutílico; sales de guanidina y urea. Los reactivos específicos a modo de ejemplo que inhiben las reacciones enzimáticas incluyen inhibidores de enzimas eficaces para una enzima seleccionada. Un gran número de inhibidores de enzimas están ampliamente disponibles y los conocen bien los expertos en la técnica. Un reactivo para su uso en los métodos de la invención puede seleccionarse basándose, por ejemplo, en la idoneidad para inhibir la actividad de enzima(s) metabólicamente indicativa(s), y la capacidad para mantener la solubilidad de analito(s) metabólico(s) y producto(s) enzimático(s). Un reactivo seleccionado puede seleccionarse para tener un número mínimo de componentes con el fin de minimizar el fondo para la espectrometría de masas. Un reactivo seleccionado puede ser miscible o inmiscible con una disolución o mezcla de reacción particular, siendo el mezclado rápido un método para garantizar que se inhibe la reacción enzimática. Los ejemplos de reactivos útiles en la invención incluyen disolventes orgánicos y disoluciones de los mismos, ácidos orgánicos y disoluciones de los mismos, alcoholes y disoluciones de los mismos, reactivos que son apolares con respecto a la disolución o mezcla de reacción, y reactivos que tienen un pH distinto del de la disolución o mezcla de reacción, creando el pH un entorno inadecuado para la actividad enzimática, y similares. Los reactivos específicos no limitativos incluyen metanol y disoluciones del mismo; ácido trifluoroacético y disoluciones del mismo; y acetonitrilo y disoluciones del mismo. Los expertos en la técnica de espectrometría de masas podrán identificar reactivos que no interfieren con las determinaciones por espectrometría de masas.

La capacidad de un reactivo seleccionado para inhibir una reacción enzimática puede determinarse mediante métodos rutinarios. Por ejemplo, puede someterse a prueba la eficacia de un “reactivo” candidato añadiendo el reactivo o un inhibidor conocido de la enzima a una reacción enzimática en progreso. Entonces puede compararse la cantidad de actividad enzimática en cada condición para confirmar si un reactivo seleccionado es adecuado para su uso en los métodos de la invención.

Los métodos de la invención implican detectar al menos un “analito metabólico”. Puede detectarse una variedad de analitos metabólicos usando los métodos de la invención, siempre que el analito sea soluble en un reactivo seleccionado, tenga una masa conocida y pueda modificarse, si se desea, para su uso como patrón interno. Los expertos en la técnica conocen bien analitos metabólicos asociados con trastornos metabólicos particulares. Como ejemplos no limitativos, en la tabla 1 anterior se mostraron analitos metabólicos bien conocidos y sus trastornos metabólicos asociados. En la tabla 2 se muestran analitos de metabólicos de carnitina y aminoácidos, y pueden corresponder a trastornos metabólicos comunes mostrados en la tabla 3. En la tabla 4 también se muestran trastornos de aminoácidos y analitos metabólicos de aminoácidos correspondientes. En la tabla 5 se muestran trastornos de ácidos grasos y analitos metabólicos de ácidos grasos correspondientes; mostrándose trastornos de ácidos grasos adicionales en la tabla 3.

Tabla 2

NOMBRE DEL ANALITO	ABREVIATURA
Aminoácidos	
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Citrulina	Cit
Glicina	Gly
Leucina	Leu
Metionina	Met

Ornitina	Orn
5-Oxoprolina	5-Oxo-Pro
Fenilalanina	Phe
Tirosina	Tyr
Valina	Val
Prolina	Pro
<b>Carnitinas</b>	
Carnitina libre	C0
Acetilcarnitina	C2
Propionilcarnitina	C3
Malonilcarnitina	C3DC
Butirilcarnitina	C4
3-Hidroxi-butirilcarnitina	C4OH
Isovalerilcarnitina	C5
Tigililcarnitina	C5:1
Glutarilcarnitina	C5DC
3-Hidroxi-isovalerilcarnitina	C5OH
Hexanoilcarnitina	C6
Adipilcarnitina	C6DC
Octanoilcarnitina	C8
Octenoilcarnitina	C8:1
Decanoilcarnitina	C10
Decenoilcarnitina	C10:1
Decadienoilcarnitina	C10:2
Dodecanoilcarnitina	C12
Dodecenoilcarnitina	C12:1
Tetradecanoilcarnitina (miristoilcarnitina)	C14
Tetradecenoilcarnitina	C14:1
Tetradecadienoilcarnitina	C14:2
3-Hidroxi-tetradecanoilcarnitina	C14OH
Hexadecanoilcarnitina (palmitoilcarnitina)	C16
Hexadecenoilcarnitina	C16:1
3-Hidroxi-hexadecanoilcarnitina	C16OH
3-Hidroxi-hexadecenoilcarnitina	C16:1OH
Octadecanoilcarnitina (estearoilcarnitina)	C18
Octadecenoilcarnitina (oleilcarnitina)	C18:1
Octadecadienoilcarnitina (linoleilcarnitina)	C18:2
3-Hidroxi-octadecanoilcarnitina	C18OH
3-Hidroxi-octadecenoilcarnitina	C18:1OH

Tabla 3

<b>Trastornos de aminoácidos</b>	
ARGD	Argininemia
ASA, ASL, ALD	Aciduria argininosuccínica (deficiencia de argininosuccinato liasa, deficiencia de argininosuccinasa)
ASD, ASS	Citrulinemia (deficiencia de ácido argininosuccínico sintetasa, deficiencia de argininosuccinato sintetasa)
HCU, HCYS	Homocistinuria (deficiencia de cistación sintasa)
Hmet	Hipermetioninemia
HHH	Síndrome de hiperornitinemia, hiperamonemia, hiperhomocitrulinuria (deficiencia de ornitina translocasa)
PRO	Hiperprolinemia
MSUD, BCKA	Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (cetoaciduria de cadena ramificada)
NKG, NKHI	Hiperglicinemia no cetósica
PKU	Fenilcetonuria
PYP/PIP	Acidemia piroglutámica/pipecólica
	Tirosinemia tipo I
	Tirosinemia tipo II
	5-Oxoprolinuria
	(Aciduria piroglutámica)

Trastornos de ácidos grasos y ácidos orgánicos	
2-MBCD	Deficiencia de 2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa
HMG	Deficiencia de 2,4-dienoil-CoA reductasa
3MCC, 3-MMC	Deficiencia de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA liasa (acidemia hidroximetilglutárica)
CPTI	Deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa (3-metilcrotonilglicinemia)
CPT II	Deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa tipo I
CTD	Deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa tipo II
CATR, CACT	Defecto de transportador de carnitina
EMA	Defecto de carnitina/acilcarnitina translocasa
GA I	Acidemia etilmalónica
IBCD	Acidemia glutárica tipo I
IVA	(Deficiencia de glutaril-CoA deshidrogenasa)
LCAD	Deficiencia de isobutiril-CoA deshidrogenasa
LCHAD	Acidemia isovalérica
MA	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
MCAD	Deficiencia de deshidrogenasa de hidroxiacil-CoA de cadena larga
MMA	Aciduria malónica
BKT	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media
MADD, GA II	Acidemia metilmalónica
MCD	Deficiencia de acetoacetil-CoA tiolasa mitocondrial (Deficiencia de beta-cetotiolasa)
PA, PPA	Deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasas (Acidemia glutárica tipo II)
SCAD	Deficiencia múltiple de Co-A carboxilasas (Deficiencia de holocarboxilasa sintetasa)
SCHAD	Acidemia propiónica
TFP	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta
VLCAD	Deficiencia de deshidrogenasa de hidroxiacil-CoA de cadena corta
	Deficiencia de proteínas trifuncionales
	Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga

Tabla 4

Aminoacidopatías	
Fenilcetonuria	Tirosinemia tipo I
Phe 2, 4, 6	1, 4 Met, Tyr
Phe, Phe/Tyr 7	2, 6 Tyr
Phe, Tyr 1, 5	7 Tyr, Tyr/Phe
Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce	Tirosinemia II
Leu+Ile 1	2 Tyr
Leu+Ile, Val 2, 4, 6	7
Leu, Val 5	Argininemia
Leu, Leu/Phe 7	Arg
Homocistinuria	2 Arg, Arg/Orn
Met 1, 2, 4, 6	Hiperprolinemia PRO
Met, Met/Phe, Met/Leu 5	4 Pro/Phe
Met, Met/Phe 7	HHH
Hipermetioninemia	2 Orn, HomoCit
Met 2	7 Orn, Orn/Cit
Met, Met/Phe 7	5-oxoprolinuria
Citrulinemia	2 5-Oxopro
Cit 1, 2, 6	4 pyroGly/Phe
Cit/Phe, Cit/Tyr 4	Aciduria argininosuccínica
Cit, Orn/Cit, Cit/Arg 5	1, 6 Cit
Cit, Cit/Arg 7	4 Cit/Tyr
Hiperglicinemia no cetósica	5 Asa
Gly 2, 4, 5	7 Cit, Cit/Arg

Tabla 5

Trastornos de la oxidación de ácidos grasos	
SCAD	LCAD
C4, C6	<sup>4</sup> C14:2 C14:1, C14:1/C16
C4	
<sup>2, 5, 7</sup>	
C4, C5, C4/C2, C5/C2	VLCAD
C4, C4/C2, C4/C3	<sup>1</sup> C14, C14:1, C16, C18
	<sup>2</sup> C14:1, C14, C16
MCAD	<sup>3</sup> C14:1, C14, C16:1, C16, C18:1, C18, C14:1/C12:1
C8, C10:1	<sup>4</sup> C14:2, C14:1, C14:1/C16
C8, C10, C10:1, C6	<sup>5</sup> C14:1 o C14
C6, C8, C10, C10:1, C8/C10	<sup>6</sup> C14, C14:1, C14:2, C16:1, C14:1/C16
C6, C8, C10:1	<sup>7</sup> C14:1
C6, C8, C10:1, C10, C8/C2, C8/C10, C8/C12	
C6, C8, C10:1, C8/C10	LCHAD
	<sup>1</sup> C14, C14:1, C16, C18, C14OH, C14:1OH, C16OH, C18OH
Acidemia glutárica tipo II	<sup>2</sup> C16OH, C18:1OH, C18OH
C5DC	<sup>3</sup> C16OH, C18:1OH, C18OH, C16OH/C16
C4, C5, C8:1, C8, C12, C14, C16, C5DC	<sup>5</sup> C14OH, C16:1OH, C16OH, C18:1OH, C18:OH, C14:1, C14
C4, C5DC, C5, C6, C8, C10	<sup>6</sup> C16OH, C18:1, C18:1OH, C18:2, C18:2OH
C6, C8, C10, C5/C2	<sup>7</sup> C16OH
C4, C5, C6, C8, C10	
C8, C10, C5DC	Deficiencia de proteínas trifuncionales
	<sup>2</sup> C16OH, C18:1OH, C18OH
Defecto de transportador de carnitina	<sup>6</sup> C16OH, C18:1OH, C18OH, C16OH/C16
C0, C2	<sup>5</sup> C14OH, C16:1OH, C16OH, C18:1OH, C18:OH, C14:1, C14
CPT I	
C16, C18:1, C18	Deficiencia de carnitina/acilcarnitina translocasa
C0, C16, C18, C0/(C16+C18)	<sup>2</sup> C16, C18:1, C18
	<sup>5</sup> C0, C16, C18, C0/(C16+C18)
Acidemia etilmalónica	<sup>7</sup> C16
C4, C5, C4/C2, C5/C2	
	CPT II
	<sup>1</sup> C14, C14:1, C16, C16:1
Deficiencia de 2,4-dienoil-CoA reductasa	<sup>3</sup> C16, C18, C18:1, C16/C14:1
C10:2	<sup>6</sup> C16, C18:1, C18:2
	<sup>7</sup> C16

En los métodos de la invención, puede determinarse la presencia o cantidad de uno o más analitos metabólicos. Una cantidad de un analito metabólico se refiere a una cantidad absoluta de una molécula en una muestra o a una cantidad relativa de la molécula, incluyendo cantidades determinadas en condiciones de estado estacionario o de estado no estacionario. La cantidad de un analito metabólico puede determinarse con respecto a una molécula de referencia en una muestra.

Los métodos de la invención implican determinar la presencia o cantidad de al menos un analito metabólico y/o producto, en los que la presencia o cantidad de cada analito metabólico y/o producto se correlaciona con la presencia o ausencia de un trastorno metabólico. Para cuantificar la cantidad de un analito metabólico o producto en una muestra de prueba, puede usarse un patrón interno, tal como se describe a continuación. Los métodos de la invención pueden usarse cuantitativamente, si se desea, para permitir la comparación de resultados de muestras de prueba con cantidades convencionales conocidas o predeterminadas de cantidades de analitos y/o productos particulares. Los métodos de la invención pueden usarse cualitativamente cuando la presencia del analito metabólico o la enzima en la muestra es indicativa de un trastorno metabólico, por ejemplo, cuando el analito metabólico detectado es el resultado de procesos metabólicos anómalos, o cuando la actividad de enzimas no se detecta en una muestra normal. Los métodos también pueden usarse cualitativamente cuando se compara una muestra de prueba con una muestra de referencia, que puede ser o bien una referencia normal o bien una referencia de trastorno metabólico. En este formato, la cantidad relativa de analito o producto puede ser indicativa de un trastorno metabólico.

Un patrón interno, o analito de referencia, para un analito metabólico útil en un método de la invención puede ser cualquier modificación o análogo del analito que puede detectarse mediante espectrometría de masas. Un analito de referencia puede detectarse por separado del analito metabólico basándose en una característica física única, tal como una masa o razón de carga con respecto a masa única. Además, puede usarse un patrón de referencia genérico adecuado. Por ejemplo, tal patrón interno eluirá conjuntamente con el analito o producto si se usa un método de separación tal como cromatografía antes del análisis por espectrometría de masas. Un patrón interno

comúnmente usado para espectrometría de masas es un derivado químico o una forma isotópicamente marcada estable del analito o producto. Los ejemplos no limitativos de patrones internos para analitos metabólicos que son aminoácidos incluyen aminoácidos isotópicamente marcados tales como  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ -glicina,  $^2\text{H}$ -alanina,  $^2\text{H}$ -valina,  $^2\text{H}$ -leucina,  $^2\text{H}$ -metionina,  $^2\text{H}$ -fenilalanina,  $^2\text{H}$ -H4-tirosina,  $^2\text{H}$ -aspartato,  $^2\text{H}$ -glutamato,  $^2\text{H}$ -ornitina,  $^2\text{HCl}$ ,  $^2\text{H}$ -citrulina y  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -arginina·HCl. Los ejemplos no limitativos de patrones internos para analitos metabólicos que son carnitinas incluyen carnitinas isotópicamente marcadas tales como  $^2\text{H}$ -carnitina,  $^2\text{H}$ -acetilcarnitina,  $^2\text{H}$ -propionilcarnitina,  $^2\text{H}$ -butirilcarnitina,  $^2\text{H}$ -isovalerilcarnitina,  $^2\text{H}$ -octanoilcarnitina,  $^2\text{H}$ -miristoilcarnitina y  $^2\text{H}$ -palmitoilcarnitina. Un patrón interno para un producto enzimático, o producto de referencia, puede ser cualquier modificación o análogo del producto que puede identificarse mediante espectrometría de masas. Un producto de referencia puede detectarse por separado del producto basándose en una característica física única, tal como una masa o razón de carga con respecto a masa única. Un ejemplo no limitativo de un patrón interno para un producto enzimático es una forma isotópicamente marcada del producto, tal como una forma deuterada del producto.

Generalmente, en la técnica se conocerá un valor de punto de corte para cada analito metabólico o actividad de enzimas para analitos y enzimas sometidos a prueba comúnmente. Un valor de punto de corte es normalmente una concentración de analito o actividad de enzimas, o razón de los mismos, por encima o por debajo de la cual se considera indicativo de un trastorno metabólico o motivo para volver a realizar la prueba. Por tanto, según la presente invención se identifica un nivel de referencia de un analito metabólico o actividad enzimática (tal como se indica por la presencia o cantidad de producto enzimático) en un tipo de muestra particular como valor de punto de corte, por encima del cual hay una correlación significativa entre la presencia del analito o la actividad enzimática y la presencia o ausencia de un trastorno metabólico. En el documento US 6.455.321 se describen valores de punto de corte a modo de ejemplo para ésteres butílicos de carnitina/acilcarnitina y aminoácidos. También se describen procedimientos para determinar la significación de una cantidad elevada de un analito metabólico en una muestra de sangre de un recién nacido. Este método puede aplicarse a una variedad de tipos de muestras (por ejemplo, suero y biopsia de tejido) de un sujeto de cualquier edad.

Los expertos en la técnica reconocerán que algunos valores de punto de corte no son absolutos en cuanto a que las correlaciones clínicas todavía son significativas a lo largo de un intervalo de valores a cualquier lado del punto de corte; sin embargo, es posible seleccionar un valor de punto de corte óptimo (por ejemplo, variando las puntuaciones de H, y similares) de analito, actividad de enzimas para unos tipos de muestra particulares. Generalmente se comparan los valores de punto de corte determinados para su uso en un método de la invención con intervalos publicados, pero pueden individualizarse para la metodología usada y la población de pacientes. Se entiende que pueden determinarse mejoras en los valores de punto de corte óptimos dependiendo de la sofisticación de los métodos estadísticos usados y del número y la fuente de muestras usadas para determinar valores de nivel de referencia para los diferentes tipos de analito, actividad de enzimas y muestra. Por tanto, los valores de punto de corte establecidos pueden ajustarse hacia arriba o hacia abajo, basándose en reevaluaciones periódicas o cambios en la metodología o distribución de la población. Además, pueden usarse valores de punto de corte específicos para el instrumento, si se desea, por ejemplo tal como cuando la comparabilidad del rendimiento entre instrumentos es <10%.

El nivel de referencia puede determinarse mediante una pluralidad de métodos, siempre que el nivel de referencia resultante proporcione con precisión una cantidad de analito metabólico o actividad de enzimas por encima de la cual existe un primer grupo de individuos que tienen una probabilidad de trastorno metabólico diferente de la de un segundo grupo de individuos que tienen una cantidad de analito metabólico o actividad de enzimas por debajo del nivel de referencia. El nivel de referencia puede determinarse mediante comparación de la cantidad de analito metabólico o actividad de enzimas en poblaciones de pacientes que tienen el mismo trastorno metabólico. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante análisis de histogramas, en el que se presenta gráficamente una cohorte completa de pacientes, en la que el primer eje representa la cantidad de analito metabólico o actividad de enzimas y un segundo eje representa el número de individuos en la cohorte cuya muestra contiene analito metabólico o actividad de enzimas a una cantidad dada. Pueden determinarse dos o más grupos de individuos separados mediante la identificación de poblaciones subconjunto de la cohorte que tienen niveles iguales o similares de analito metabólico o actividad de enzimas. Entonces puede realizarse la determinación del nivel de referencia basándose en una cantidad que distingue lo mejor posible estos grupos separados. El nivel de referencia puede ser un único número, igualmente aplicable a todos los individuos, o el nivel de referencia puede variar, según subpoblaciones específicas de individuos. Por ejemplo, individuos de mayor edad pueden tener un nivel de referencia diferente del de individuos más jóvenes para el mismo trastorno metabólico.

Los métodos de la invención usan espectrometría de masas para determinar la cantidad o presencia de uno más analitos metabólicos y al menos un producto de enzima metabólicamente indicativa. Puede usarse una variedad de configuraciones de espectrómetros de masas en un método de la invención. Hay varios tipos de espectrómetros de masas disponibles o pueden producirse con diversas configuraciones. En general, un espectrómetro de masas tiene los siguientes componentes principales: una entrada de muestra, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, y un sistema de control de instrumento, y un sistema de datos. Diferencias en la entrada de muestra, fuente de iones y analizador de masas definen generalmente el tipo de instrumento y sus capacidades. Por ejemplo, una entrada puede ser una fuente de cromatografía de líquidos de columna capilar o puede ser una sonda directa o soporte tal como se usa en la desorción mediante láser asistida por matriz. Fuentes de iones comunes son, por ejemplo, electropulverización, incluyendo nanopulverización y micropulverización o

desorción mediante láser asistida por matriz. Los analizadores de masas comunes incluyen un filtro de masas de cuadrupolo, analizador de masas de trampa de iones y analizador de masas de tiempo de vuelo.

El procedimiento de formación de iones es un punto de partida para el análisis de espectro de masas. Hay varios métodos de ionización disponibles y la elección del método de ionización depende de la muestra que va a analizarse. Por ejemplo, para el análisis de aminoácidos puede ser deseable un procedimiento de ionización relativamente suave tal como ionización por electropulverización (ESI). Para ESI, se hace pasar una disolución que contiene la muestra a través de una aguja fina a un alto potencial que crea un campo eléctrico fuerte que da como resultado una pulverización fina de gotitas altamente cargadas que se dirige al interior del espectrómetro de masas. Otros procedimientos de ionización incluyen, por ejemplo, bombardeo de átomos rápidos (FAB) que usa un haz de alta energía de átomos neutros para golpear una muestra sólida provocando desorción e ionización. La ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI) es un método en el que se usa un pulso de láser para golpear una muestra que se ha cristalizado en una matriz de compuesto de absorción de UV. Otros procedimientos de ionización conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, descarga luminiscente y de plasma, ionización por desorción de plasma, ionización por resonancia e ionización secundaria.

La ionización por electropulverización (ESI) tiene varias propiedades que son útiles para la invención descrita en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse ESI para moléculas biológicas tales como aminoácidos y carnitinas que son difíciles de ionizar o evaporar. Además, la eficacia de ESI puede ser muy alta, lo que proporciona la base para mediciones altamente sensibles. Además, ESI produce moléculas cargadas a partir de disolución, lo cual es conveniente para analizar analitos metabólicos, productos y moléculas de referencia que están en disolución. En cambio, procedimientos de ionización tales como MALDI requieren la cristalización de la muestra antes de la ionización.

Dado que ESI puede producir moléculas cargadas directamente a partir de disolución, es compatible con muestras de sistemas de cromatografía de líquidos. Por ejemplo, un espectrómetro de masas puede tener una entrada para un sistema de cromatografía de líquidos, tal como una HPLC, de modo que las fracciones fluyen desde la columna de cromatografía al interior del espectrómetro de masas. Esta disposición en línea de un sistema de cromatografía de líquidos y espectrómetro de masas se denomina algunas veces CL-EM. Puede usarse un sistema de CL-EM, por ejemplo, para separar analitos metabólicos, productos y moléculas de referencia de mezclas complejas antes del análisis por espectrometría de masas. Además, puede usarse la cromatografía para retirar sales u otros componentes de tampón de la muestra antes del análisis por espectrometría de masas. Por ejemplo, puede usarse la desalación de una muestra usando una columna de HPLC de fase inversa, en línea o fuera de línea, para aumentar la eficacia del procedimiento de ionización y por tanto mejorar la sensibilidad de detección mediante espectrometría de masas.

Hay una variedad de analizadores de masas disponibles que pueden emparejarse con diferentes fuentes de iones. Diferentes analizadores de masas tienen diferentes ventajas tal como conoce un experto en la técnica y tal como se describe en el presente documento. El espectrómetro de masas y los métodos elegidos para la detección dependen del ensayo particular, por ejemplo, puede usarse un analizador de masas más sensible cuando se genera una pequeña cantidad de iones para la detección. A continuación se describen varios tipos de analizadores de masas y métodos de espectrometría de masas.

La espectrometría de masas de cuadrupolo usa un analizador o filtro de masas de cuadrupolo. Este tipo de analizador de masas está compuesto por cuatro barras dispuestas como dos conjuntos de dos barras conectadas eléctricamente. Se aplica una combinación de tensiones de CC y RF a cada par de barras lo que produce campos que provocan un movimiento oscilante de los iones a medida que se mueven desde el principio del filtro de masas hasta el final. El resultado de estos campos es la producción de un filtro de masas de paso alto en un par de barras y un filtro de paso bajo en el otro par de barras. El solapamiento entre el filtro de paso alto y de paso bajo deja una  $m/z$  definida que puede pasar por ambos filtros y atravesar la longitud del cuadrupolo. Esta  $m/z$  se selecciona y permanece estable en el filtro de masas de cuadrupolo mientras que todas las demás  $m/z$  tienen trayectorias inestables y no permanecen en el filtro de masas. Se obtiene un espectro de masas como resultado de aumentar en rampa los campos aplicados de tal manera que se selecciona una  $m/z$  creciente para pasar a través del filtro de masas y alcanzar el detector. Además, también pueden configurarse cuadrupolos para contener y transmitir iones de todas las  $m/z$  aplicando un campo sólo de RF. Esto permite que los cuadrupolos funcionen como una lente o sistema de enfoque en regiones del espectrómetro de masas en las que se necesita transmisión de iones sin filtrado de masas. Esto se será útil en la espectrometría de masas en tándem tal como se describe adicionalmente a continuación.

Un analizador de masas de cuadrupolo, así como los demás analizadores de masas descritos en el presente documento, puede programarse para analizar un intervalo de  $m/z$  o masa definido. Esta propiedad de los espectrómetros de masas es útil para la invención descrita en el presente documento. Dado que el intervalo de masa de los analitos metabólicos, productos enzimáticos y moléculas de referencia se conocerá antes de un ensayo, puede programarse un espectrómetro de masas para transmitir iones del intervalo de masa correcto previsto al tiempo que se excluyen iones con un intervalo de masa superior o inferior. La capacidad para seleccionar un intervalo de masa puede reducir el ruido de fondo en el ensayo y por tanto aumentar la relación señal-ruido así como aumentar la especificidad del ensayo. Por tanto, el espectrómetro de masas puede lograr una etapa de separación

inherente así como la detección e identificación de analitos metabólicos, productos enzimáticos y moléculas de referencia.

5 La espectrometría de masas con trampa de iones usa un analizador de masas de trampa de iones. En estos analizadores de masas, se aplican campos de modo que inicialmente se atrapan iones de todas las  $m/z$  y oscilan en el analizador de masas. Los iones entran en la trampa de iones desde la fuente de iones a través de un dispositivo de enfoque tal como un sistema de lentes en octapolo. El atrapamiento de iones tiene lugar en la región de atrapamiento antes de la excitación y expulsión a través de un electrodo hacia el detector. El análisis de masas se logra aplicando secuencialmente tensiones que aumentan la amplitud de las oscilaciones de una manera que expulsa iones de  $m/z$  creciente fuera de la trampa y al interior del detector. Al contrario que la espectrometría de 10 masas de cuadrupolo, todos los iones se retienen en los campos del analizador de masas excepto aquéllos con la  $m/z$  seleccionada. Una ventaja de las trampas de iones es que tienen una sensibilidad muy alta, siempre que se tenga cuidado de limitar el número de iones que se atrapan a la vez. El control del número de iones puede lograrse variando el tiempo a lo largo del cual se inyectan iones en la trampa. La resolución de masas de trampas de iones es similar a la de filtros de masas de cuadrupolos, aunque las trampas de iones tienen limitaciones de  $m/z$  bajas.

15 La espectrometría de masas de tiempo de vuelo usa un analizador de masas de tiempo de vuelo. Para este método de análisis de  $m/z$ , en primer lugar se proporciona a un ion una cantidad fija de energía cinética mediante aceleración en un campo eléctrico (generado por alta tensión). Tras la aceleración, el ion entra en una región libre de campo o de "deriva" en la que se desplaza a una velocidad que es inversamente proporcional a su  $m/z$ . Por tanto, los iones con baja  $m/z$  se desplazan más rápidamente que los iones con alta  $m/z$ . Se mide el tiempo requerido para que los iones recorran la longitud de la región libre de campo y se usa para calcular la  $m/z$  del ion. 20

Una consideración en este tipo de análisis de masas es que el conjunto de iones que está estudiándose se introduzca en el analizador al mismo tiempo. Por ejemplo, este tipo de análisis de masas es muy adecuado para técnicas de ionización tales como MALDI que produce iones en pulsos cortos bien definidos. Otra consideración es controlar la dispersión de velocidad producida por iones que tienen variaciones en sus cantidades de energía 25 cinética. El uso de tubos de vuelo más largos, reflectores de iones o tensiones de aceleración superiores puede ayudar a minimizar los efectos de la dispersión de velocidad. Los analizadores de masas de tiempo de vuelo tienen un nivel alto de sensibilidad y un intervalo de  $m/z$  más amplio que los analizadores de masas de cuadrupolo o de trampa de iones. Además, pueden adquirirse datos rápidamente con este tipo de analizador de masas porque no se necesita ningún barrido del analizador de masas.

30 La espectrometría de masas en tándem puede usar combinaciones de los analizadores de masas descritos anteriormente. Los espectrómetros de masas en tándem pueden usar un primer analizador de masas para separar iones según su  $m/z$  con el fin de aislar un ion de interés para su análisis adicional. Entonces se descompone el ion de interés aislado en iones fragmento (denominado disociación activada por colisión o disociación inducida por colisión) y los iones fragmento se analizan mediante el segundo analizador de masas. Estos tipos de sistemas de 35 espectrómetros de masas en tándem se denominan sistemas de tándem en el espacio porque los dos analizadores de masas están separados en el espacio, habitualmente por una celda de colisión. Los sistemas de espectrómetros de masas en tándem también incluyen sistemas de tándem en el tiempo en los que se usa un analizador de masas, sin embargo el analizador de masas se usa secuencialmente para aislar un ion, inducir fragmentación y después realizar el análisis de masas.

40 Los espectrómetros de masas en la categoría de tándem en el espacio tienen más de un analizador de masas. Por ejemplo, un sistema de espectrómetros de masas de cuadrupolo en tándem puede tener un primer filtro de masas de cuadrupolo, seguido por una celda de colisión, seguido por un segundo filtro de masas de cuadrupolo y después el detector. Otra disposición es usar un filtro de masas de cuadrupolo para el primer analizador de masas y un analizador de masas de tiempo de vuelo para el segundo analizador de masas con una celda de colisión separando 45 los dos analizadores de masas. En la técnica se conocen otros sistemas en tándem incluyendo espectrometría de masas de reflectrón-tiempo de vuelo, sectores en tándem y sector-cuadrupolo.

Los espectrómetros de masas en la categoría de tándem en el tiempo tienen un analizador de masas que realiza diferentes funciones en diferentes momentos. Por ejemplo, puede usarse un espectrómetro de masas de trampa de iones para atrapar iones de todas las  $m/z$ . Se aplica una serie de funciones de barrido de RF que expulsa iones de 50 todas las  $m/z$  de la trampa excepto la  $m/z$  de los iones de interés. Tras haberse aislado la  $m/z$  de interés, se aplica un pulso de RF para producir colisiones con moléculas de gas en la trampa para inducir la fragmentación de los iones. Entonces se miden los valores de  $m/z$  de los iones fragmentados mediante el analizador de masas. Los instrumentos de resonancia de ciclotrón de iones, también conocidos como espectrómetros de masas por transformada de Fourier, son un ejemplo de sistemas de tándem en el tiempo.

55 Pueden realizarse varios tipos de experimentos de espectrometría de masas en tándem controlando los iones que se seleccionan en cada fase del experimento. Los diferentes tipos de experimentos usan diferentes modos de funcionamiento, algunas veces denominados "barridos", de los analizadores de masas. En un primer ejemplo, denominado barrido de espectro de masas, el primer analizador de masas y la celda de colisión transmiten todos los iones para el análisis de masas al segundo analizador de masas. En un segundo ejemplo, denominado barrido de 60 iones producto, se seleccionan por la masa los iones de interés en el primer analizador de masas y después se

fragmentan en la celda de colisión. Entonces se analiza la masa de los iones formados realizando un barrido del segundo analizador de masas. En un tercer ejemplo, denominado barrido de iones precursores, se realiza un barrido del primer analizador de masas para transmitir secuencialmente los iones de masa analizada al interior de la celda de colisión para su fragmentación. El segundo analizador de masas selecciona por la masa el ion producto de interés para su transmisión al detector. Por tanto, la señal del detector es el resultado de todos los iones precursores que pueden fragmentarse en un ion producto común. Otros formatos experimentales incluyen barridos de pérdida neutra en los que en los barridos de masa se tiene en cuenta una diferencia de masa constante. El uso de estos procedimientos de barrido de espectrometría de masas en tándem diferentes puede ser ventajoso cuando se miden grandes conjuntos de analitos en un único experimento como con experimentos de tipo múltiplex.

En vista de lo anterior, los expertos en la técnica reconocen que diferentes métodos de espectrometría de masas, por ejemplo, espectrometría de masas de cuadrupolo, espectrometría de masas de trampa de iones, espectrometría de masas de tiempo de vuelo y espectrometría de masas en tándem, pueden usar diversas combinaciones de fuentes de iones y analizadores de masas, lo que permite flexibilidad en el diseño de protocolos de detección personalizados. Además, pueden programarse espectrómetros de masas para transmitir todos los iones desde la fuente de iones al interior del espectrómetro de masas o bien secuencialmente o bien al mismo tiempo. Además, puede programarse un espectrómetro de masas para seleccionar iones de una masa particular para su transmisión al interior del espectrómetro de masas al tiempo que se bloquean otros iones. La capacidad para controlar con precisión el movimiento de iones en un espectrómetro de masas permite mayores opciones en protocolos de detección que pueden ser ventajosas cuando está analizándose un gran número de analitos, por ejemplo, a partir de un experimento de tipo múltiplex.

Diferentes espectrómetros de masas tienen diferentes niveles de resolución, es decir, la capacidad para resolver picos entre iones de masa estrechamente relacionada. La resolución se define como  $R = m/\Delta m$ , donde  $m$  es la masa del ion y  $\Delta m$  es la diferencia de masa entre dos picos en un espectro de masas. Por ejemplo, un espectrómetro de masas con una resolución de 1000 puede resolver un ion con una  $m/z$  de 100,0 de un ion con una  $m/z$  de 100,1. Por tanto, los expertos en la técnica seleccionarán un espectrómetro de masas que tenga una resolución apropiada para el/los analito(s) que va(n) a detectarse.

Los espectrómetros de masas pueden resolver iones con pequeñas diferencias de masa y medir la masa de iones con un alto grado de precisión. Por tanto, pueden usarse analitos de masas similares juntos en el mismo experimento ya que el espectrómetro de masas puede diferenciar la masa de moléculas incluso estrechamente relacionadas. El alto grado de resolución y la precisión de masa logrados usando métodos de espectrometría de masas permite el uso de grandes conjuntos de analitos porque pueden distinguirse unos de otros.

En la técnica se conocen bien métodos de espectrometría de masas adicionales (véase Burlingame *et al.* Anal. Chem. 70: 647R-716R (1998); Kinter y Sherman, Nueva York (2000)). Las descripciones a modo de ejemplo de métodos de espectrometría de masas para detectar analitos metabólicos incluyen Chace DH, Hillman SL, Van Hove JLK, Naylor EW. Clin Chem 1997; 43: 210613; Rashed MS, Bucknall MP, Little D, *et al.* Clin Chem 1997; 43: 112941; Matern D, Strauss AW, Hillman SL, Mayatepek E, Millington DS, Trefz FK. Pediatr Res 1999; 46: 459, y Millington DS, Kodo N, Terada N, Roe D, Chace DH. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 1991; 111: 21128.

Si se desea, puede automatizarse una o más etapas de un método de la invención. Los expertos en la técnica sabrán cómo usar inyectores automáticos, dispositivos de manipulación de líquidos, robots, ordenadores y otros instrumentos de laboratorio rutinarios para la automatización.

Todos los artículos de revistas, referencias y citas de patentes proporcionados anteriormente, entre paréntesis o de otro modo, tanto si se mencionaron anteriormente como si no, se incorporan al presente documento como referencia.

Se entiende que modificaciones que no afecten sustancialmente a la función de las diversas realizaciones de esta invención también están incluidas dentro de la definición de la invención proporcionada en el presente documento. Por consiguiente, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten la presente invención.

#### EJEMPLO 1

Este ejemplo describe la determinación simultánea de la cantidad de un analito metabólico y un producto de enzima metabólicamente indicativa de una muestra de un paciente.

La enzima biotinidasa es una enzima metabólicamente indicativa conocida para el trastorno metabólico denominado deficiencia de biotinidasa. En el estado sin tratar, la deficiencia profunda de biotinidasa en recién nacidos se caracteriza normalmente por síntomas neurológicos y relacionados con la piel, tales como convulsiones, hipotonía y exantema, con frecuencia acompañados por hiperventilación, estridor laríngeo y apnea. Niños más mayores también pueden tener alopecia, ataxia, retraso en el desarrollo, pérdida auditiva neurosensorial, atrofia óptica e infecciones recurrentes. Los individuos con deficiencia parcial de biotinidasa pueden tener hipotonía, exantema cutáneo y caída del cabello, particularmente durante momentos de estrés. Una vez detectada, con frecuencia la deficiencia de biotinidasa puede tratarse mediante la administración de biotina.

Anteriormente se ha establecido que individuos con deficiencia profunda de biotinidasa tienen <10% de la actividad biotinidasa en suero normal media. Los individuos con deficiencia parcial de biotinidasa tienen el 10-30% de la actividad biotinidasa en suero normal media. Por tanto, se entiende que una disminución de la actividad biotinidasa en comparación con el nivel de referencia normal es indicativa de deficiencia de biotinidasa.

5 También se sometieron a ensayo acilcarnitinas y  $\alpha$ -aminoácidos. Diferentes patrones del perfil de acilcarnitinas en plasma pueden indicar el diagnóstico de trastornos de oxidación de ácidos grasos (MCAD, VLCAD, SCAD, MAD, LCHAD y CPTII), así como algunas acidemias orgánicas (acidemia propiónica, acidemia metilmalónica, acidemia isovalérica, acidemia glutárica tipo I, deficiencia de 3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, deficiencia de B-cetotiolasa, etc.). El análisis de aminoácidos en plasma detectará trastornos de aminoácidos específicos tales como  
10 fenilcetonuria (PKU), enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (MSUD), defectos del ciclo de la urea, hiperglicemia no cetósica y homocistinuria. Este análisis también está indicado en pacientes con falta de crecimiento general como examen inicial. Para la evaluación de un trastorno metabólico, se comparan los aminoácidos en plasma con valores normales correspondientes para la edad.

15 Se midieron simultáneamente la actividad de la enzima biotinidasa y la cantidad de los analitos de  $\alpha$ -aminoácidos y acilcarnitinas de la siguiente manera:

Se introdujo mediante perforación cada una de las muestras de sangre seca sobre papel en un pocillo de una placa de micropocillos. Se reconstituyó cada muestra con 50 microlitros de disolución tampón que contenía biocitina isotópicamente marcada (el sustrato para biotinidasa), y se incubó la mezcla durante 17 horas a 42°C. Entonces se añadieron 140 microlitros de metanol que contenía patrones internos isotópicamente marcados para  $\alpha$ -aminoácidos y acilcarnitinas y para el producto de la reacción de biotinidasa, y se agitó la placa durante 30 minutos a 27°C.  
20 Entonces se cubrió la placa con una lámina de aluminio y se colocó en un inyector automático. Se analizó cada muestra procesada mediante espectrometría de masas en tándem, y se cuantificaron las concentraciones de producto de biotinidasa,  $\alpha$ -aminoácidos endógenos y acilcarnitinas endógenas basándose en los patrones internos.

25 Las tablas 6 y 7 muestran los datos obtenidos usando el método anterior, en comparación con los datos obtenidos usando métodos de examen por espectrometría de masas bien conocidos para analitos metabólicos sin medir simultáneamente la actividad de enzimas. Una pendiente de uno indica resultados idénticos entre los métodos comparados.

Tabla 6: Comparación de  $\alpha$ -aminoácidos (AA):

AA	PENDIENTE	R2
ALA	1,04	0,9916
ARG	1,11	0,9975
CIT	1,13	0,9912
GLY	1,36	0,9836
LEU	1,14	0,9987
MET	1,00	0,9989
ORN	1,02	0,9951
PHE	0,99	0,9949
TYR	1,10	0,9917
VAL	1,04	0,9836
MEDIA	1,09	0,9927

Tabla 7: Comparación de acilcarnitinas:

AC	PENDIENTE	R2
C0	1,05	0,9994
C2	1,12	0,9902
C3	1,11	0,9915
C4	1,10	0,9946
C5DC	0,89	0,9641
C6	0,99	0,9973
C8	1,00	0,9987
C10	1,05	0,9987
C12	1,01	0,9968
C14	1,06	0,9952
C16	1,21	0,9837
C18	1,16	0,9844
MEDIA	1,06	0,9912

30 Estos resultados muestran que el método anterior produce datos que se correlacionan con métodos de examen por espectrometría de masas bien conocidos en los que se extraen  $\alpha$ -aminoácidos y acilcarnitinas y se miden sin medir

simultáneamente la actividad de enzimas. Estos resultados también muestran que el método anterior produce datos que se correlacionan con métodos de examen de actividad de enzimas conocidos que miden la fluorescencia de un producto marcado con etiqueta sin medir simultáneamente concentraciones de  $\alpha$ -aminoácidos y acilcarnitinas.

## REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un trastorno metabólico, que es un trastorno de la oxidación de ácidos grasos, trastorno de aciduria orgánica, aminoacidopatía o un trastorno indicado en la tabla 1 en un individuo, que comprende la detección simultánea de actividad de enzimas metabólicas y niveles de metabolitos, caracterizado por:
- 5
- (a) poner en contacto una muestra para determinar la presencia de
- (i) una o más enzimas metabólicamente indicativas que tienen una actividad alterada como resultado de un trastorno metabólico y
- 10
- (ii) uno o más analitos metabólicos, que tienen una cantidad alterada como resultado de un trastorno metabólico,
- con uno o más sustratos para dicha una o más enzimas para producir una mezcla de reacción, en condiciones en las que al menos una de dichas enzimas puede actuar sobre un sustrato correspondiente para generar al menos un producto;
- (b) poner en contacto dicha mezcla de reacción con un reactivo que inhibe la capacidad de dicha una o más enzimas para actuar sobre un sustrato correspondiente, en el que dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto son solubles en dicho reactivo; para producir una muestra de prueba y
- 15
- (c) determinar la cantidad o presencia de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto contenidos en dicha muestra de prueba usando espectrometría de masas,
- en el que una cantidad o presencia determinada de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto se correlaciona con la presencia o ausencia de dicho trastorno metabólico.
- 20
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de líquidos corporales.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de líquidos corporales es sangre.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra está seca.
5. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo es un ser humano que se sospecha que tiene un trastorno metabólico.
- 25
6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo es un neonato.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo es un recién nacido.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo es un niño.
9. Método según la reivindicación 1, en el que dicho individuo es un adulto.
- 30
10. Método según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno metabólico es una metabolopatía congénita.
11. Método según la reivindicación 1, en el que dicho trastorno metabólico es un trastorno metabólico adquirido.
12. Método según la reivindicación 1, en el que dicha enzima metabólicamente indicativa se selecciona del grupo que consiste en oxidorreductasa, hidrolasa, liasa, transferasa, ligasa e isomerasa.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la enzima es una hidrolasa.
- 35
14. Método según la reivindicación 13, en el que la enzima es una biotinidasa.
15. Método según la reivindicación 14, en el que dicho sustrato es biocitina.
16. Método según la reivindicación 1, en el que dicho analito metabólico es uno o más aminoácidos.
17. Método según la reivindicación 1, en el que dicho analito metabólico es una acilcarnitina o pluralidad de acilcarnitinas.
- 40
18. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende además poner en contacto dicha muestra con uno o más sustratos de referencia.
19. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende además poner en contacto dicha muestra con uno o más productos de referencia.
20. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende además, antes de la determinación,

añadir uno o más productos de referencia correspondientes al al menos un producto.

21. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa (d) comprende además, antes de la determinación, añadir uno o más analitos de referencia correspondientes al uno o más analitos metabólicos contenidos en dicha muestra.
- 5 22. Método según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla de reacción es acuosa.
23. Método según la reivindicación 22, en el que dicho reactivo no es acuoso.
24. Método según la reivindicación 23, en el que dicho reactivo comprende un disolvente orgánico.
25. Método según la reivindicación 23, en el que dicho reactivo comprende un alcohol.
26. Método según la reivindicación 25, en el que dicho reactivo es metanol.
- 10 27. Método según la reivindicación 1, en el que dicha espectrometría de masas es espectrometría de masas en tándem.
28. Método según la reivindicación 1, en el que el uno o más sustratos están presentes en forma seca en un recipiente.
- 15 29. Método según la reivindicación 1, en el que se pone en contacto la mezcla de reacción con uno o más productos de referencia y uno o más analitos de referencia y se determina la cantidad de dicho uno o más analitos metabólicos y dicho al menos un producto contenidos en dichas muestras de prueba con respecto a dicho uno o más productos de referencia y dicho uno o más analitos de referencia, usando espectrometría de masas.
- 20 30. Método según la reivindicación 1, en el que se separa la muestra en dos partes de muestra y se somete cada parte de muestra a (a) y (b);  
se combinan las dos mezclas de reacción para producir una muestra de prueba; y  
se someten las mezclas de reacción combinadas a (c).
- 25 31. Método según la reivindicación 1, en el que se separa la muestra en dos partes de muestra, en el que (a) comprende poner en contacto cada parte de muestra con un recipiente individual, conteniendo cada recipiente dicho uno o más sustratos para dicha una o más enzimas en forma seca;  
se somete cada parte de muestra a (b);  
se combinan las dos mezclas de reacción para producir una muestra de prueba; y  
se someten las mezclas de reacción combinadas a (c).
- 30 32. Método según la reivindicación 28, en el que se pone en contacto dicho recipiente con una disolución para generar dichas condiciones en las que al menos una de dichas enzimas puede actuar sobre un sustrato correspondiente para generar al menos un producto.

