

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 307**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008** **E 08856248 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2229452**

54 Título: **Procedimiento de ayuda al diagnóstico de un trastorno**

30 Prioridad:

**05.12.2007 GB 0723775**

**18.06.2008 GB 0811152**

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

**05.10.2015**

73 Titular/es:

**KING'S COLLEGE LONDON (50.0%)**

**Strand**

**London WC2R 2LS, GB y**

**GUY'S AND ST THOMAS' NHS FOUNDATION**

**TRUST (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURNER, CHARLES y**

**DALTON, RAYMOND NEIL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 547 307 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de ayuda al diagnóstico de un trastorno

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a detección selectiva multiplexada de enfermedad. En particular, la invención se refiere a detección selectiva multiplexada de enfermedades hereditarias usando espectrometría de masas.

**Antecedentes de la invención**

10 La espectrometría de masas (EM) es una potente técnica analítica cualitativa y cuantitativa que se ha introducido en muchos laboratorios clínicos y de investigación durante los últimos 5 años. El coste de los analizadores de EM ha disminuido a un límite que es asequible para una mayoría de los laboratorios. En el laboratorio clínico se usan espectrómetros de masas para medir una amplia gama de analitos clínicamente relevantes. Cuando se aplica a muestras biológicas, la potencia de la EM reside en su selectividad hacia la identificación y cuantificación de compuestos. La EM en tándem (EMEM) es una técnica de EM que ofrece excelentes capacidades analíticas.

15 La detección selectiva como cribado de neonatos para la enfermedad metabólica hereditaria, el hipotiroidismo congénito, las hemoglobinopatías, la fibrosis quística y una serie de otras afecciones definidas por requisitos locales es ahora obligatoria en muchos países.

La introducción de EMEM para la detección selectiva de metabolitos ha revolucionado tanto el proceso de análisis como el número de afecciones que, potencialmente, pueden someterse a detección selectiva. Típicamente, este sistema implica butilación. Sin embargo, la detección selectiva utilizando análisis directo de los metabolitos es posible.

20 Los inventores han demostrado previamente la viabilidad de la detección y confirmación de hemoglobinopatías clínicamente significativas por EMEM en un formato analítico adecuado para la detección selectiva de recién nacidos prenatal.

25 La detección selectiva de metabolitos permite la detección de una amplia gama de metabolitos que son diagnósticos para determinadas enfermedades hereditarias. En algunos centros de EE.UU. y Europa se han incluido hasta 30 afecciones. Sin embargo, para muchas afecciones, los metabolitos medidos fácilmente ofrecen poca sensibilidad y especificidad, por ejemplo, la metionina para la homocistinuria, lo que es un problema.

30 En el Reino Unido, la detección selectiva se ha restringido a la medición de fenilalanina para el diagnóstico de la fenilcetonuria (FCU) y de octanoilcarnitina para el diagnóstico de la deficiencia de la acilCoA deshidrogenasa de cadena media (DADCM). Este es un enfoque rentable. Sin embargo, existe el deseo de aumentar el perfil de detección selectiva, lo que podría excluir afecciones que deben someterse a detección selectiva, por limitaciones técnicas, al tiempo que incluyen afecciones con marcadores que tienen una sensibilidad y especificidad bajas. Este enfoque de la técnica anterior provoca numerosos problemas logísticos y clínicos.

35 La deficiencia de biotinidasa es un ejemplo de una afección ue, en la actualidad, no se somete a detección selectiva para el uso de un metabolito. La deficiencia de biotinidasa se produce en aproximadamente 1 de cada 110.000 nacidos vivos, en función de las variaciones étnicas en la población sometida a detección selectiva. La deficiencia de biotinidasa no diagnosticada puede causar la muerte, ataques resistentes anticonvulsivos, sordera bilateral, degeneración óptica, problemas de la marcha, y una serie de otras afecciones clínicas inespecíficas. Si se diagnostica en el período neonatal y se instaura el tratamiento con dosis farmacológicas de biotina de por vida, el fenotipo clínico se suprime totalmente y el crecimiento y el desarrollo son normales. Si se diagnostica tarde en la vida, algunas manifestaciones clínicas pueden controlarse (por ejemplo, crisis), pero otras (por ejemplo, la sordera) permanecen. En consecuencia, a pesar de su relativamente baja incidencia en la población, es un candidato a detección selectiva rentable. En muchos centros fuera del Reino Unido, la detección selectiva se realice para el uso de un ensayo separado, la medición de la actividad enzimática directamente, utilizando un ensayo colorimétrico basado en la medición de ácido para-aminobenzoico liberado a partir de ácido biotinil-para-aminobenzoico (PABA biotina). El ensayo requiere una muestra aparte específica (mancha de sangre), es muy laborioso, requiere mucho tiempo y es relativamente insensible. No se han descrito metabolitos en sangre útiles para el diagnóstico de la deficiencia de biotinidasa. Por lo tanto, la detección selectiva de biotinidasa de acuerdo con la técnica anterior implica numerosos inconvenientes y problemas.

50 La tirosinemia de tipo 1 es un ejemplo de una afección con un marcador propuesto que tiene una baja sensibilidad y especificidad. La tirosinemia de tipo 1 (deficiencia de fumaracetacetasa) se produce en aproximadamente 1 de cada 300.000 nacidos vivos, en función de las variaciones étnicas en la población sometida a detección selectiva. La tirosinemia de tipo 1 no diagnosticada puede dar como resultado insuficiencia hepática fulminante, coagulopatía, y muerte o raquitismo, crisis de tipo porfiria, complicaciones neurológicas y tumores hepáticos. El trasplante hepático es a menudo el único tratamiento. Si se diagnostica en el período neonatal y se instaura el tratamiento NTBC de por vida, el fenotipo clínico se suprime totalmente y el crecimiento y el desarrollo son normales. En consecuencia, a pesar de su rareza, se considera un candidato de detección selectiva rentable. En muchos casos, la tirosina en la sangre se incrementa, pero esto no es diagnóstico y los incrementos inespecíficos de la tirosina en sangre son

frecuentes en el período neonatal, por lo que es problemático cuanto se intenta usar el nivel de tirosina en sangre como indicador único de la enfermedad. La succinilacetona se considera que es el metabolito de diagnóstico, pero su medición no se integra fácilmente en los sistemas de detección selectiva de metabolitos de la técnica anterior, lo que es un problema. La succinilacetona se reconoció primero porque su inhibición de la enzima porfobilinógeno sintasa (PBG sintasa) une dos moléculas de ácido 5-aminolevulínico mediante deshidratación), cuya inhibición contribuye a las crisis de tipo porfiria. En muchos centros se usa la actividad de la porfobilinógeno sintasa para la detección selectiva de la tirosinemia de tipo 1 o proporcionar una prueba de reserva para las indicaciones iniciales de un aumento de la tirosina. El ensayo se basa en proporcionar ácido 5-aminolevulínico como sustrato y medir el porfobilinógeno producido. El ensayo requiere una mancha de sangre aparte, es muy laborioso, requiere mucho tiempo y es relativamente insensible. La falta de comprensión del proceso enzimático también plantea problemas en la técnica anterior relacionados con la tirosinemia.

El documento WO2006/025863 divulga un procedimiento para detectar simultáneamente la actividad enzimática metabólica y los niveles de metabolitos utilizando espectrometría de masas.

Nakanishi y col., (J. Mass Spec., 30, 1663 - 1 670, 1995) divulga el diagnóstico de hemoglobinopatías de modo que se preparan productos de digestión con tripsina y se analizan mediante espectrometría de masas.

Las actividades enzimáticas se miden generalmente en condiciones estandarizadas y optimizadas. Esta normalización / optimización requiere tampones y condiciones de pH específicos. En consecuencia, los ensayos y las condiciones individuales son casi siempre diferentes, a menudo sorprendentemente diferentes. Por lo tanto, cada ensayo es casi único. Las condiciones de ensayo para una primera enzima de interés rara vez son adecuadas para una segunda enzima o más enzimas de interés, y de hecho, incluso pueden inhibir o inactivarla. Estos son problemas graves cuando se desea llevar a cabo múltiples análisis enzimáticos.

Además, se sabe que los tampones pueden suprimir significativamente la ionización por electropulverización de compuestos importantes. Este es un problema en la técnica. Los intentos de la técnica anterior para resolver este problema emplean típicamente cromatografía para eliminar el tampón de la señal compuesta. Esto es una etapa que requiere tiempo y laboriosa que necesita equipo y conocimientos especializados para llevarla a cabo.

La presente invención busca superar los problemas asociados con la técnica anterior.

### **Sumario de la invención**

Los enfoques actuales de la detección selectiva de enfermedades hereditarias no son adaptables a la multiplexación. En la técnica anterior, las enfermedades individuales se someten a detección selectiva usando conjuntos individuales de condiciones optimizadas para las pruebas específicas que se hagan. Además, muchas de estas pruebas requieren manchas de sangre independientes. Esto no solo es laborioso y costoso, sino que también es una seria limitación en términos de la cantidad de sangre requerida. Este es un problema particularmente agudo en el área de detección selectiva neonatal, en la que normalmente se extraen únicamente pequeños volúmenes de sangre.

Los presentes inventores han desarrollado procedimientos que permiten la detección selectiva simultánea de múltiples afecciones. En otras palabras, los presentes inventores han desarrollado técnicas que permiten la multiplexación de los procedimientos de detección selectiva de manera que se puedan analizar múltiples afecciones usando sólo una única muestra, tal como una mancha de sangre.

Con el fin de lograr este avance, los presentes inventores han ido en contra de la forma de pensar en la técnica con respecto a la optimización y la dilución / detección de las diversas entidades químicas de diagnóstico que se van a analizar. Específicamente, los presentes inventores han desarrollado enfoques que abandonan los sistemas tamponadores convencionales y tienen como resultado condiciones catalíticas deliberadamente subóptimas y / o concentraciones subóptimas de las diversas entidades químicas que se están analizando. Sin embargo, en parte como resultado de este enfoque, y en parte debido a la combinación con potentes técnicas de detección de espectrometría de masas, se muestra sorprendentemente que una alta especificidad y un perfil de cribado amplio se pueden combinar ventajosamente. Además de estas ventajas, es un beneficio adicional de la invención que la cantidad de muestra requerida también se reduce dramáticamente. Por ejemplo, típicamente un panel de pruebas mayor de lo que se lleva a cabo actualmente en una matriz estándar de seis manchas de sangre de neonato se puede multiplexar ventajosamente para extraer un superconjunto de los resultados de las pruebas convencionales a partir de una muestra de sangre que representa menos de 1/6 de la cantidad recogida para las pruebas convencionales de la técnica anterior.

La invención se basa en estos hallazgos sorprendentes.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para ayudar al diagnóstico de un trastorno en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar una muestra de dicho sujeto, en la que la muestra comprende sangre; analizar al menos dos características de dicha muestra mediante análisis EM, en la que dichas características son indicadoras de un trastorno; dichas características seleccionadas de: (i) la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra; (ii) un metabolito comprendido por dicha muestra; y

- (iii) una actividad enzimática comprendida por dicha muestra, en el que las al menos dos características comprenden (i) la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra y al menos otra característica seleccionada de (ii) y (iii), en la que cada una de dichas al menos dos características se determina a partir de un análisis multiplexado en la misma muestra única, y en la que el ensayo de la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra comprende (a) la adición de una endopeptidasa de dicha muestra, en la que si se ensaya una actividad enzimática comprendida dentro de la muestra, se añade la peptidasa a la muestra después de que la actividad enzimática comprendida dentro de la muestra ha tenido la oportunidad de actuar sobre un sustrato añadido, (b) analizar la polipéptidos en dicha muestra después del tratamiento con la peptidasa, (c) inferir a partir de (b) información sobre la composición de aminoácidos de dicho polipéptido.
- 5 “Multiplex”/“multiplexar” tiene su significado habitual en la técnica, es decir llevar a cabo varias funciones al mismo tiempo de manera independiente, pero relacionada. En otras palabras, la multiplexación en el contexto de la presente invención significa el análisis de múltiples indicadores de enfermedades independientes en una sola lectura. En este contexto, la forma ‘relacionada’ se refiere adecuadamente a la recogida de múltiples datos, por ejemplo datos de múltiples posibles trastornos diferentes que, por supuesto, por lo general, son independientes unos de otros, en una etapa de exploración o de análisis habitual.
- 10 Más adecuadamente la etapa habitual se refiere a la extracción de los datos de una muestra habitual o única. Adecuadamente, la etapa habitual se refiere a la extracción de los datos para múltiples posibles enfermedades posibles de una sola sesión de un colector de datos, tal como una sola sesión de un análisis EM. La etapa habitual se refiere a la realización de múltiples análisis en un solo una muestra única, es decir sin división o subpreparación de diferentes partes de una muestra global más grande, sino más bien mediante la práctica de la invención en una sola muestra física real, realizándose cada análisis en, por ejemplo, la misma mancha o muestra o de sangre rehidratada.
- 20 Por lo tanto, dicho análisis multiplexado comprende el análisis multiplexado de la misma muestra. Esto se explica con más detalle a continuación
- 25 Adecuadamente, la muestra comprende una mancha de sangre seca, por ejemplo una mancha de sangre seca de aproximadamente 3,2 mm de diámetro. Adecuadamente, la mancha de sangre seca es una mancha de sangre aplicada a un papel de filtro convencional y se deja secar al aire como es práctica habitual y bien conocida en la recolección de muestras de manchas de sangre de recién nacidos
- 30 Adecuadamente, la muestra se tampona únicamente con los componentes naturales de los mismos. Adecuadamente, la adición de tampón a la muestra se omite específicamente. Es una ventaja de la invención que se eviten las etapas de tamponamiento exógenas. Ventajosamente, según la presente invención, la rehidratación con disolvente es suficiente sin la participación de sistemas de tamponamiento exógenos
- Adecuadamente, dicho polipéptido de interés es uno o más de hemoglobina, albúmina, transferrina, alfa-1-antitripsina, ceruloplasmina, alfa-fetoproteína o mioglobina.
- 35 Adecuadamente, la etapa de analizar un metabolito comprendido por dicha muestra comprende determinar presencia o ausencia de, o analizar la concentración de, fenilalanina, tirosina, leucina, valina, citrulina, ornitina, ácido argininosuccínico, creatina, creatinina, ácido guanidinoacético, 3-metoxitirosina, carnitina libre, una serie de especies de acilcarnitina, incluyendo octanoilcarnitina, una serie de conjugados de glicina, incluyendo hexanoilglicina, especies de ácidos, incluyendo ácido orótico, esteroides, incluyendo 17-hidroxiprogesterona, 7-dehidrocolesterol, o colesterol.
- 40 Adecuadamente, la etapa de ensayar una actividad catalítica comprendida por dicha muestra comprende
- (a) la adición de un sustrato susceptible a la acción de dicha actividad catalítica a dicha muestra;
- (b) analizar la muestra para determinar la presencia o ausencia de dicho sustrato y / o la presencia o ausencia de un producto de la acción de dicha actividad catalítica que actúa sobre dicho sustrato.
- 45 Adecuadamente, más de un sustrato sensible a la acción de dicha actividad catalítica puede añadirse y analizarse. Esto tiene la ventaja de aumentar la especificidad del análisis.
- Adecuadamente dicho sustrato o sustratos es soluble en agua. Esto tiene las ventajas de simplificar el ensayo y evitar el uso de disolvente(s) orgánico(s).
- 50 Adecuadamente, cada dicho sustrato se añade sólo en agua. Esto tiene las ventajas de omitir el uso agentes de tamponamiento y / o disolventes orgánicos.
- Adecuadamente dicha
- EM es espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría (EMEM).
- Adecuadamente, se analiza cada una de las tres características (i), (ii) y (iii).

**Descripción detallada de la invención**

En la técnica anterior, las actividades enzimáticas se miden generalmente en condiciones estandarizadas y / u optimizadas. Estas requieren tampones y condiciones de pH específicos. Incluso si se intentara multiplexar dichos análisis, sería imposible usar diferentes sistemas de tamponamiento de pH, ya que en la práctica cada ensayo es casi único. Además, se reconoce que los tampones pueden suprimir significativamente la ionización por electropulverización de compuestos importantes. En consecuencia, la cromatografía se utiliza a menudo para eliminar el tampón de la señal compuesta. La idea de los inventores ha permitido superar estos problemas de la técnica anterior de acuerdo con la presente invención. Los inventores se dieron cuenta de que al tratar con la detección selectiva de enfermedades metabólicas hereditarias no siempre es necesario determinar las actividades enzimáticas reales, sino más bien la determinación de si la actividad enzimática está presente o ausente proporcionaría, de hecho, información suficiente. Esto contrasta con las ideas de la técnica anterior que se han basado en las actividades enzimáticas optimizadas destinadas a una tasa de conversión de sustrato maximizada. En algunos casos puede ser necesario discriminar semicuantitativamente entre las actividades altas y bajas. Esto se logra fácilmente de nuevo de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, utilizando patrones marcados con isótopos estables o proporciones sustrato: producto u otra calibración como se explica en el presente documento. La enseñanza clave es que para aplicaciones de detección selectiva, tales como la detección selectiva en recién nacidos, las condiciones enzimáticas no tienen por qué ser óptimas. Incluso en condiciones subóptimas, los inventores pueden obtener información de diagnóstico fiable y lecturas como se demuestra en el presente documento.

Es un beneficio de la presente invención que una sola mancha de sangre de 3,2 mm se puede utilizar ventajosamente para medir las actividades de biotinidasa y porfobilinógeno sintasa, incorporando el diagnóstico de hemoglobinopatía clínica (basado en péptidos trópticos) y el diagnóstico de metabolitos para FCU y MCADD simultáneamente mediante EMEM en un ciclo de 1-2 minutos. Por tanto, una realización preferida, la invención se refiere a una combinación diagnóstica de este tipo.

**Modos de análisis**

La invención se refiere a análisis multiplexado, por ejemplo en una sola mancha de sangre, de metabolitos y / o actividades enzimáticas clínicamente diagnósticos en combinación con una composición de aminoácidos de un polipéptido mediante espectrometría de masas, lo más adecuadamente espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría de masas (EMEM).

**Aplicaciones**

El sistema encuentra aplicación en la evaluación de sujetos para detectar posibles enfermedades o trastornos, particularmente trastornos hereditarios. La invención encuentra una aplicación particular en la detección selectiva de neonatos para enfermedad hereditaria. Es una ventaja de la invención que la detección selectiva se lleva a cabo con lecturas fiables en un momento en el que los síntomas clínicos pueden no haberse presentado.

**Ensayos**

Es una característica de la invención que se llevan a cabo múltiples tipos de ensayos en una sola muestra de partida. Estos ensayos se llevan a cabo como parte de un único análisis. Esto significa que los ensayos se llevan a cabo en paralelo, de forma secuencial, o simultáneamente. Es una característica de los aspectos preferidos de la invención que los ensayos se llevan a cabo en una sola operación. Esto puede significar que se llevan a cabo etapas preliminares de preparación de la muestra secuencialmente, por ejemplo, la rehidratación de una mancha de sangre seguida de la adición de sustrato, seguida de la adición de peptidasa. Sin embargo, el principio subyacente de realizar múltiples ensayos al mismo tiempo es que un único análisis puede llevarse a cabo para recoger la información de exploración(es) de la misma muestra individual. El mero hecho de que la muestra se rehidrata en una sola etapa y después se añaden a la muestra varios elementos esenciales de los ensayos particulares que se están realizando en etapas secuenciales separadas no es suficiente para los ensayos que se van a considerar que son separados o diferentes. Es un punto clave que los diversos ensayos se llevan a cabo a partir de la misma muestra, por lo tanto reduciendo ventajosamente el número de muestras (y / o el volumen de material requerido de la muestra), y simplificando la realización de múltiples ensayos diferentes para los cuales los datos se recogen de forma ventajosa en una sola operación de acuerdo con la presente invención.

Por lo tanto, adecuadamente, cuando la invención se lleva a cabo en una 'muestra única "o en la" misma muestra', esto significa que la muestra que se analiza en última instancia para al menos dos características no está dividida o separada para los etapas preparatorias preliminares (por ejemplo, adición de sustrato, adición de peptidasa) que conduce al análisis de dichas dos o más características, sino más bien las etapas preparatorias (si las hay) se llevan a cabo en la misma muestra única (por ejemplo, el mismo material único o alícuota), en el que la misma muestra única se usa después para producir las lecturas requeridas. Por supuesto, esto no excluye la división inicial del material en dos partes para proporcionar una muestra de referencia o muestra de calibración, pero es un elemento clave de la invención que las etapas o procedimientos analíticos se llevan a cabo en la misma muestra como se ha explicado anteriormente.

Adecuadamente, se considerará que los ensayos se realizan al mismo tiempo, si se llevan a cabo todos en una sola muestra. En este sentido, puede ser deseable realizar una segunda o más inyección de EM con el fin de analizar una clase diferente de compuestos, por ejemplo, ionización negativa para ácidos orgánicos, tales como ácido orótico, azúcares y / o fosfatos de azúcar, incluyendo galactosa -1-fosfato, y / o esteroides, tales como 17-hidroxiprogesterona. Sin embargo, cabe señalar que, incluso en múltiples formas de realización de inyección de EM tales como realizaciones de dos inyecciones, el análisis todavía se lleva a cabo con la misma muestra final única. Adecuadamente, se usan una o dos inyecciones, más adecuadamente se usa una única inyección. Más adecuadamente, se considerará llevar a cabo los ensayos al mismo tiempo si las lecturas se recogen de un único análisis. En una realización preferida, las lecturas se recogen de un solo análisis, en el que el análisis es adecuadamente una sola sesión de recopilación de datos por espectrometría de masas.

De acuerdo con la presente invención, hay numerosas clases diferentes de análisis que se combinan ventajosamente en una sola operación. Estos incluyen detección selectiva de metabolitos, selectiva de la actividad enzimática y. detección selectiva de la presencia o ausencia de polipéptidos o variantes concretos de las mismas (por ejemplo, EMEM tríptica).

### 15 **Metabolitos**

La detección selectiva de metabolitos se refiere a la determinación de la presencia o ausencia de un compuesto químico particular en una muestra. La razón de esto se conoce como detección selectiva de metabolitos es que ese compuesto está típicamente presente o ausente de la muestra como una característica de esa muestra. En otras palabras, el compuesto que se está analizando se produce (o no se produce) como una característica del metabolismo normal del sujeto individual que se está analizando. Por lo tanto, el análisis de la presencia o ausencia de un metabolito particular típicamente no implica la adición de un compuesto sustrato particular, o de ninguna actividad enzimática afín a la muestra. Por supuesto, dependiendo del formato particular del ensayo del metabolito que se está analizando, puede ser que la presencia de un metabolito sea indicativa de una determinada afección, o puede ser que la ausencia de un metabolito sea indicativa de una determinada afección. La detección selectiva de metabolitos para detectar la presencia o ausencia de un compuesto particular tiene la ventaja de que ofrece típicamente una lectura muy clara cuando el compuesto se detecta o no se detecta. Sin embargo, en otras realizaciones puede ser deseable la detección selectiva del nivel de un metabolito particular. Claramente, dichas realizaciones pueden requerir calibración más detallada de la instrumentación o pueden requerir el uso de patrones internos en la muestra, (o incluso muestras de referencia externas o muestras enriquecidas con concentraciones conocidas de la sustancia añadida), a fin de evaluar con precisión el nivel o la concentración del metabolito particular que se está analizando. Claramente, tales realizaciones tienen la ventaja de proporcionar información adicional además de la presencia o ausencia del metabolito, a saber, proporcionar información sobre el nivel de, o la concentración de, dicho metabolito en la muestra.

Los metabolitos que pueden analizarse en la presente invención incluyen (en el formato observación – indicación):

- 35 Concentración elevada de fenilalanina - fenilcetonuria
- Concentración elevada de tirosina – tirosinemia de tipo 1, 2, 3
- Concentración elevada de leucina y valina - enfermedad de la orina de jarabe de arce
- Concentración elevada de citrulina - deficiencia de ácido argininosuccínico sintasa
- Concentración elevada de ornitina – atrofia girada, hiperornitinemia
- 40 Concentración elevada de ácido argininosuccínico - deficiencia de argininosuccinasa
- Concentración baja de creatina y creatinina - AGAT, GAMT, o deficiencias del transportador de la creatina
- Concentración elevada de ácido guanidinosuccínico - deficiencia de GAMT
- Concentración baja de ácido guanidinosuccínico - deficiencia de AGAT
- 45 Concentración elevada del aminoácido aromático 3-metoxitirosina – deficiencia de descarboxilasa y deficiencia de la síntesis de piridoxal fosfato
- Concentración elevada de carnitina libre – deficiencia de carnitina-palmitoil transferasa 1
- Concentración elevada de carnitina libre – deficiencia de carnitina-palmitoil transferasa 2
- Concentración elevada de octanoilcarnitina – deficiencia de la acilCoA deshidrogenasa de cadena media (DACCM)
- 50 Concentración elevada de una serie de especies de acilcarnitina para una serie de trastornos de la oxidación de las grasas y de ácidos orgánicos

Concentración elevada de hexanoilglicina – deficiencia de la acilCoA deshidrogenasa de cadena media (DACCM)

Concentración elevada de ácido orótico - deficiencia de ornitina transcarbamilasa

Concentración elevada de 17-hidroxiprogesterona - hiperplasia suprarrenal congénita

5 Concentración elevada de androstenediona - hiperplasia suprarrenal congénita

Concentración elevada de cortisol - la hiperplasia suprarrenal congénita

Concentración elevada de 7-dehidrocolesterol - síndrome de Smith-Lemli-Opitz

Concentración elevada de colesterol - hipercolesterolemia familiar.

Otras asociaciones conocidas por la persona experta en la técnica pueden aplicarse igualmente en la invención.

10 Los términos "alta" y "baja" deben interpretarse en el contexto de su uso en el presente documento. Por ejemplo, "concentración elevada de fenilalanina" significa elevada por comparación con un sujeto normal, es decir, por comparación con un sujeto que no sufre fenilcetonuria. Del mismo modo, las concentraciones "bajas" de sustancias significan igualmente bajas en comparación con el nivel(s) en individuos que son normales con respecto a la afección que se está estudiando o sometiendo a detección selectiva. Los mismos principios se aplican a las actividades enzimáticas y a otras entidades descritas en este documento en términos relativos, es decir, que se entiende que las cantidades están en relación con la(s) muestra(s) de referencia no afectadas. Para al menos estas razones, los términos relativos "elevada" y "baja" son a la vez claros y adecuados para que el lector experto entienda la invención y su funcionamiento.

Más adecuadamente, los metabolitos son como se exponen en la sección de ejemplos.

20 Cabe destacar que el ácido orótico se divulga como un metabolito de interés para la detección de la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC). El ácido orótico entero no se ha utilizado anteriormente, ni se ha sugerido, para este propósito. El ácido orótico en orina, en algunas situaciones previas, se ha investigado como un metabolito diagnóstico. Sin embargo, la presente invención enseña el Nuevo uso de niveles de ácido orótico en sangre como un indicador de diagnóstico de la deficiencia de OTC.

## 25 **Actividad catalítica**

La detección selectiva de una actividad enzimática se refiere a la situación en la que una muestra se somete a detección selectiva para detectar una actividad catalítica particular. Adecuadamente, esto se lleva a cabo mediante el suministro a la muestra de un sustrato sobre el que la actividad catalítica puede actuar. Con el fin de evaluar la actividad que puede o no puede estar presente, la lectura es típicamente la presencia o ausencia del producto esperado en el que el sustrato se convertiría en presencia de la actividad catalítica, tal como la actividad enzimática que se está analizando. La actividad catalítica es típicamente una actividad enzimática. Dichas actividades pueden incluir (en formato enzima - sustrato; indicación):

Biotinidasa - sustrato biotil PABA o biocitina o variaciones de isótopos estables; ausencia (actividad baja) indica deficiencia de biotinidasa

35 Deficiencia de porfobilinógeno sintasa – sustrato ácido delta-aminolevulínico; ausencia (baja actividad) indica la presencia de succinilacetona (deficiencia fumarilacetoacetasa) o deficiencia de porfobilinógeno sintasa

Galactosidasa A - sustrato 4-metilumbeliferil-alfa-D-galacto-piranósido; la ausencia (actividad) indica la enfermedad de Fabry

40 GlutarilCoA deshidrogenasa – sustrato glutarilCoA; la ausencia (baja actividad) indica aciduria glutárica de tipo 1

Tiopurina metiltransferasa - sustrato 6-mercaptopurina o variaciones de isótopos estables; la ausencia (baja actividad) indica sensibilidad a azatioprina

creatina quinasa – sustrato creatina fosfato; la presencia (alta actividad) indica distrofia muscular de Duchenne / Becker

45 Más adecuadamente dichas actividades se seleccionan de entre las establecidas en la sección de ejemplos.

## **Análisis polipeptídico**

Un tipo adicional de análisis que se lleva a cabo convenientemente en una muestra de acuerdo con la presente divulgación es el análisis polipeptídico. Esto puede ser para la simple presencia o ausencia de un polipéptido particular. Alternativamente, esto puede ser para caracterizar o para detectar la presencia o ausencia de una variante particular de un polipéptido definido. Esto puede llevarse a cabo mediante cualquier modo adecuado

conocido por los expertos en la técnica.

En la presente invención, el análisis polipeptídico se refiere al análisis de la composición estructural (es decir, la composición de aminoácidos) del polipéptido. Esto típicamente no es la conformación o la estructura tridimensional del polipéptido, aunque si se desea, el operador experto puede elegir esta característica para analizar si se desea. La composición estructural se refiere a la composición de aminoácidos del polipéptido. Claramente, puede no ser práctico determinar la composición de aminoácidos completa del polipéptido. Adecuadamente se exploran las partes caracterizadoras clave de la composición de aminoácidos. Más adecuadamente, esto se lleva a cabo mediante digestión con peptidasa (fragmentación) del polipéptido y el análisis de masas de los péptidos resultantes (fragmentos). Esto proporciona información tal como las masas de fragmentos particulares que pueden en sí mismos revelar información acerca de la composición del polipéptido, o más generalmente, las masas de los fragmentos revelan información sobre el número y la separación de las secuencias de reconocimiento de la peptidasa dentro del polipéptido madre, de modo que se proporciona información tanto directa (sitio de reconocimiento) como indirecta (separación) acerca de la composición de aminoácidos (es decir, la secuencia de aminoácidos) del polipéptido.

La peptidasa (endopeptidasa) es, preferiblemente, cualquier entidad catalítica tal como una enzima o fragmento de la misma que puede romper un enlace peptídico. Actualmente se definen seis grupos de proteasa: serina, treonina, cisteína, ácido aspártico, metano y ácido glutámico. Preferiblemente, dicha endopeptidasa es una sola endopeptidasa.

La peptidasa puede ser cualquier endopeptidasa adecuada conocida en la técnica, tales como tripsina, endopeptidasa V8, quimotripsina, Asp-N y Lys-C. Adecuadamente, dicha endopeptidasa tiene una secuencia de reconocimiento de XXK o XXR. Adecuadamente, el análisis se lleva a cabo mediante digestión triptica y análisis de los productos de escisión resultantes. Esta técnica, llevada a cabo en aislamiento, es bien conocida en la materia. Por ejemplo, en relación con la evaluación de las hemoglobinopatías clínicamente significativas, tales técnicas se han descrito a fondo en Daniel et al (2005 Br.J.Haematol. Vol. 130 pp 635-43). Además de analizar la hemoglobina como el polipéptido de interés para el diagnóstico de hemoglobinopatías, la mioglobina (para el diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne / Becker), albúmina (para el diagnóstico de deficiencias de unión de la hormona tiroidea), transferrina (para el diagnóstico de los trastornos de la glicosilación), alfa-1-antitripsina (para el diagnóstico de la deficiencia de alfa-1-antitripsina), alfa-fetoproteína (para el diagnóstico de la insuficiencia hepática fulminante), ceruloplasmina (para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson), o cualquier otro polipéptido de interés pueden analizarse mediante este procedimiento.

### **Lectura**

En principio, la lectura podría recogerse por cualquier medio conocido en la técnica que sea adecuado para detectar la presencia de entidades químicas individuales dentro de la muestra que se está analizando, por ejemplo mediante la determinación de masas de las mismas. Adecuadamente, el análisis podría llevarse a cabo mediante un aparato que tiene dos selectores de masas diferentes, con un etapa de colisión en medio. Más adecuadamente, la lectura se recoge mediante espectrometría de masas (EM). Se podría usar cualquier analizador de EM que es capaz de analizar iones. Por ejemplo, se podría usar MALDLTOF / trampa lineal o cualquier otro tipo de analizador de EM. Lo más adecuadamente, el análisis se realice mediante espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría de masas (EMEM).

### **Deficiencia de biotinidasa**

Una gran preocupación y el efecto clínico de la deficiencia de biotinidasa es la sordera bilateral. El Departamento de Salud del Reino Unido pone una gran cantidad de recursos en la detección selectiva de defectos de audición. Por lo tanto, aunque la deficiencia de biotinidasa es un defecto hereditario poco habitual, el hecho de que un fenotipo clave del trastorno es la sordera bilateral, que tiene que hacer frente a un alto coste durante toda la vida, significa que el argumento económico para su detección selectiva en recién nacidos es muy fuerte. En la técnica anterior, la detección selectiva de deficiencia de biotinidasa se lleva a cabo utilizando un ensayo colorimétrico. por ejemplo, Nueva Zelanda, EE.UU. y otros territorios emplean un cribado colorimétrico. Esta técnica de la técnica anterior es un ensayo pobre en el sentido de que el color producido es débil, ya que el ensayo colorimétrico de la técnica anterior es insensible. Esto tiene como resultado una falta de seguridad, incluso cuando la prueba se realiza de acuerdo con las directrices actuales. Además, es técnicamente muy difícil realizar esta prueba en manchas de sangre. Debido a las limitaciones del enfoque de la técnica anterior, el objetivo principal en esta área ha sido la optimización de los ensayos. Por el contrario, de acuerdo con la presente invención, los inventores divulgan que, de hecho, se puede producir un ensayo satisfactorio sin optimización.. El enfoque de los inventores implica la monitorización de biocitina y su producto, en lugar de centrarse en cualquier ensayo enzimático colorimétrico. De nuevo, es una característica clave del ensayo simplificado de los inventores que no se utiliza ningún tamponamiento. En primer lugar, esto tiene la ventaja de evitar la inhibición de otros posibles ensayos enzimáticos que se multiplexan en la misma muestra. En segundo lugar, los problemas de supresión de iones se reducen o evitan de forma ventajosa mediante el suministro de sustrato en agua en lugar de tampón. El tamponamiento puede reducir la sensibilidad, mediante la evitación de su uso, los inventores aumentan de forma ventajosa la sensibilidad. Por otra parte, si se usa tampón como en las técnicas de la técnica anterior, puede ser necesaria una cromatografía laboriosa y que requiera tiempo con el fin de eliminarlo. El enfoque de los inventores elimina ventajosamente este etapa.

**Sustratos**

La biocitina es el sustrato natural para la enzima biotinidasa. La biocitina consiste en biotina ligada a lisina. Los presentes inventores observaron que la biocitina comercialmente disponible tiende a contener cantidades significativas de biotina. Así, de acuerdo con la presente invención, el sustrato biocitina se limpia ventajosamente biocitina de la biotina. En otras palabras, el sustrato biocitina se purifica para eliminar la biotina contaminante. Esta es una etapa de purificación sencilla que se puede lograr por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Adecuadamente, la biotina se elimina mediante cromatografía. La ventaja de utilizar biocitina purificada es que uno de los productos de escisión (biotina) se elimina de esta manera. La contaminación de la biotina puede conducir a un falso positivo, ya que la biotina es un producto de la escisión de biotinidasa. Por lo tanto, si se detecta contaminación de la biotina en el ensayo, se podría dar la impresión errónea de que la actividad de biotinidasa se ha detectado. Al seguir el enfoque enseñado en el presente documento, es decir, mediante la eliminación de la biotina contaminante residual de la biocitina disponible comercialmente suministrada, se produce un sustrato "limpio" con la ventaja de una mayor especificidad, eliminando los falsos positivos del análisis. Por lo tanto, en un aspecto la invención se refiere a 'biocitina limpia', es decir, a biocitina que está sustancialmente libre de biotina. Adecuadamente, la invención se refiere a biocitina que está esencialmente libre de biotina. Lo más adecuadamente, la invención se refiere a biocitina que está completamente libre de biotina.

Biotinil-PABA es un buen sustrato para la enzima biotinidasa. Los presentes inventores observaron que la biotinil-PABA comercialmente disponible tiende a presentar retos en la solubilización. Los tratamientos agresivos para potenciar la solubilización (incluso a 3 mM), tales como sonicación, calentamiento, agitación con vórtex o similar, pueden fomentar la hidrólisis espontánea, lo que conduce a PABA libre y biotina libre en solución. Estas entidades, particularmente la biotina libre, pueden confundir a los ensayos. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, el sustrato biotinil-PABA se limpia ventajosamente biocitina de la biotina. En otras palabras, el sustrato biotinil-PABA se purifica para eliminar la biotina contaminante (y/o PABA libre). Esta es una etapa de purificación sencilla que se puede lograr por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Adecuadamente, la biotina(y/o PABA) se elimina mediante cromatografía. Adecuadamente, esta purificación se realiza después de la solubilización de biotinil-PABA.

La ventaja de utilizar biotinil-PABA purificado es que al menos uno de los productos de escisión (por ejemplo, biotina) se elimina de esta manera. La contaminación de producto, tal como biotina, puede conducir a un falso positivo. Por lo tanto, si se detecta contaminación de la biotina en el ensayo, se podría dar la impresión errónea de que la actividad se ha detectado. Al seguir el enfoque enseñado en el presente documento, es decir, mediante la eliminación de la biotina/PABA contaminante residual de la biotinil/PABA disponible comercialmente suministrada, se produce un sustrato "limpio" con la ventaja de una mayor especificidad, eliminando los falsos positivos del análisis. Por lo tanto, en un aspecto la invención se refiere a "biotinil-PABA limpio", es decir, a biotinil-PABA que está sustancialmente libre de biotina y/o PABA. Adecuadamente, la invención se refiere a biotinil-PABA que está esencialmente libre de biotina. Lo más adecuadamente, la invención se refiere a biotinil-PABA que está completamente libre de biotina. Adecuadamente, el biotinil-PABA 'limpiado' PURIFICADO se proporciona en solución, que tiene la ventaja de eliminar posible hidrólisis adicional al intentar resolubilizar el material limpiado.

Un enfoque alternativo para el problema de la contaminación de biotina es utilizar biocitina con lisina marcada. El marcador puede ser, por ejemplo, un marcador isotópico estable. Por lo tanto, en la muestra resultante, el análisis se lleva a cabo buscando sólo la lisina marcada que se libera por la acción de la biotinidasa. De esta manera, esencialmente ignorando el producto de biotina de la catálisis, cualquier biotina contaminante presente en el sustrato biocitina se ignora eficazmente o se excluye del análisis.

La biocitina es soluble en agua. Biot PABA es solo escasamente soluble en agua.

Es un punto clave con el que los inventores no están normalmente preocupados con la cuantificación, pero se centran en si hay algo allí o no, es decir cualitativa, y esto permite que la reducción de los niveles de sustrato añadido que reduce al mínimo los costes, así como la limpieza de la lectura y permitir proporciones (por ejemplo, proporciones sustrato: producto) a usar para una mayor precisión. Las proporciones sustrato:producto por supuesto, también se pueden usar para la cuantificación de, por ejemplo, la actividad enzimática si se desea.

Biocitina, biotinil/PABA y ácido delta-amino-levulínico (el término "ácido delta-amino-levulínico" se usa de manera intercambiable con el término "ácido 5 -aminolevulínico" en este documento; adecuadamente, se entiende que las referencias a "ácido delta-aminolevulínico" se refieren a "ácido 5-aminolevulínico") todos se han puesto a prueba ampliamente a diferentes concentraciones y combinaciones en los sistemas multiplexados de la invención para el ensayo de biotinidasa y / o PBG sintasa. Cada uno de estos sustratos es eficaz en el intervalo de 20  $\mu$ M a 1 mM, y puede ser eficaz a concentraciones aún más altas. Las concentraciones de menos de 20  $\mu$ M es probable que sean menos útiles y pueden dar lugar a problemas de sensibilidad enzimática tanto cinética como analítica. La concentración óptima para cada sustrato en el presente documento es 50  $\mu$ M.

El momento de la incubación para la acción de las enzimas se ha analizado ampliamente. Las incubaciones son eficaces desde solo unos pocos minutos a 2,5 horas. Adecuadamente, las incubaciones son durante 30-120 minutos. El tiempo de incubación óptimo se considera de aproximadamente 1 hora. Adecuadamente, el tiempo de incubación es, o es de aproximadamente, 60 minutos. El tiempo de incubación se considera que es tiempo desde la adición del sustrato a la interrupción de la muestra (por ejemplo, adición de tampón de detención o tampón /

disolvente de recorrido) o lectura de la muestra. Más adecuadamente, el tiempo de incubación se toma que es el tiempo desde la adición del sustrato a la adición de la proteasa ya que típicamente la proteasa degradará las enzimas. En algunas realizaciones, puede ser posible añadir sustratos y proteasas al mismo tiempo, aunque cabe esperar una menor digestión del sustrato para requerir ajustes compensatorios adicionales, por ejemplo una mayor concentración de sustrato.

Por supuesto, la persona experta en la técnica puede optimizar las concentraciones de sustrato y / o los tiempos de incubación en función de sus necesidades. Por ejemplo, las concentraciones de sustrato más altas pueden permitir tiempos de incubación más cortos y viceversa.

La guía sobre las temperaturas de incubación se da en el presente documento, en particular en la sección de ejemplos. Se puede usar la temperatura ambiente (por ejemplo, de 18-25 grados Celsius) como punto de partida y la optimización puede llevarse a cabo por el experto en la materia según sea necesario.

### **Normalización**

Es una ventaja de la presente invención que no se requiere la normalización de las condiciones para el análisis catalítico. Además, no es necesario suministrar un exceso de sustrato. Eliminando la necesidad de un exceso de sustrato, es una ventaja de la presente invención que una concentración de sustrato se puede escoger libremente para dar buenos resultados sobre la escala de tiempo de la prueba. Además, omitiendo la necesidad de proporcionar un exceso de sustrato, se permite el análisis semicuantitativo. Por ejemplo, mediante el suministro de una concentración conocida de sustrato y mediante el análisis de la cantidad de sustrato y producto después de una etapa de incubación, se puede obtener una proporción sustrato: producto dando una buena estimación de la cantidad de actividad en una muestra particular. Esto elimina ventajosamente la necesidad de un sustrato o producto estable marcado isotópicamente para la cuantificación en esta realización.

### **Tirosinemia de tipo 1**

En la técnica anterior, la tirosinemia de tipo 1 se ha detectado a través de un aumento de los niveles de tirosina en la sangre. Sin embargo, este es un efecto secundario o incluso terciario. El defecto enzimático en la tirosinemia tipo 1 no está, de hecho, directamente adyacente a la tirosina. De hecho, muchos recién nacidos tienen niveles aumentados de tirosina en la sangre, especialmente entre los bebés prematuros. Esto complica el análisis de la técnica anterior. Por ejemplo, si el operador establece un corte alto para el nivel de tirosina, muchos resultados positivos pueden pasarse por alto. Por el contrario, si el operador establece puntos de corte demasiado bajos para el nivel de tirosina, pueden aparecer también demasiados negativos, despreciando de este modo los recursos en las pruebas de seguimiento o repetición de pruebas. Un enfoque alternativo ha consistido en medir los niveles de succinilacetona. Sin embargo, esto requiere ácido y otros tratamientos químicos y es una medida técnicamente exigente. El defecto enzimático real en la tirosinemia de tipo 1 es la deficiencia de fumarilacetoacetasa, que conduce a una acumulación de succinilacetona. La succinilacetona inhibe la actividad de la porfobilinógeno sintasa (PBS). El ensayo PBS se ha utilizado como sustituto para la concentración de succinilacetona. El análisis de la enzima subyacente porfobilinógeno sintasa puede estar lleno de dificultades en la técnica anterior. En primer lugar, el sustrato puede inhibir la enzima si se utiliza a las concentraciones necesarias para el ensayo. Alternativamente, si el ensayo está configurado para tratar de medir el propio porfobilinógeno, puede ser problemático, ya que el porfobilinógeno se metaboliza normalmente muy rápidamente. Estos dos factores conducen a la dificultad adicional de que los ensayos largos de acuerdo con la técnica anterior parecen consistentemente dar resultados reducidos. Los presentes inventores proponen el enfoque de proporcionar ácido 5-aminolevulínico como sustrato y medir el porfobilinógeno producido. Además, en un tratamiento paralelo, el ensayo se puede replicar en presencia de succinilacetona. La succinilacetona inhibe la porfobilinógeno sintasa. Por lo tanto, mediante la comparación de los resultados con y sin succinilacetona, es posible demostrar claramente la capacidad para detectar la tirosinemia tipo 1 analizando directamente la actividad porfobilinógeno sintasa.

Por lo tanto, en la técnica anterior, la PBS se ha medido en un ensayo "optimizado" usando ácido 5-aminolevulínico como sustrato y midiendo el porfobilinógeno producido colorimétricamente. En la técnica anterior, se ha demostrado que la actividad enzimática está reducida en proporción a la cantidad de succinilacetona añadida. Más importante aún, a las concentraciones de succinilacetona observadas en los pacientes con tirosinemia de tipo 1 sin tratar, se anuló (prácticamente) la actividad PBS. Sin embargo, el ensayo colorimétrico es insensible y, en la técnica anterior, se han usado tiempos de incubación largos (16-24 h) como un medio lógico para aumentar la cantidad de porfobilinógeno producido. Los presentes inventores han reconocido que la actividad de PBS puede reducirse significativamente cuando se incuba en presencia de concentraciones altas de su sustrato ácido 5-aminolevulínico. Esto reduce la cantidad esperada de porfobilinógeno sintetizada. Además, la tasa de producción de porfobilinógeno puede comenzar a ser superada por la tasa de eliminación de porfobilinógeno mediante la enzima porfobilinógeno desaminasa. Por lo tanto, un tiempo de incubación corto representa una ventaja significativa de acuerdo con la presente invención. Además, la detección mediante EMEM de porfobilinógeno es significativamente más sensible que en el ensayo colorimétrico.

Como cuestión operativa simple, el análisis de EM implica típicamente un blanco, en el que el blanco se puede usar convenientemente en como la muestra de referencia o control. Por otra parte, cuando se haga referencia en este documento a "prácticamente sin señal", hay que tener en cuenta que una simple referencia a la muestra en blanco o

control aclarará si la señal está o no presente.

Es una ventaja de la invención que la especificidad y la sensibilidad son cada vez mucho más altas que para los ensayos colorimétricos de la técnica anterior. De hecho, los resultados son típicamente tan claros que se aproximan a una lectura binaria. Claramente, en el contexto de diagnóstico de alto rendimiento, esto es un beneficio significativo de la presente invención. Adecuadamente, los diferentes análisis descritos en este documento se llevan a cabo en la misma muestra. Por "misma muestra" se enfatiza que esto se refiere a la realización de los diferentes tratamientos y análisis sobre la misma muestra física única. Esto no se refiere, por ejemplo, a una muestra que se divide en un número de diferentes tratamientos y cada uno de los diferentes tratamientos se combina después. Por "misma muestra" se entiende que se utiliza una muestra física, tal como una mancha de sangre o muestra de sangre, y cada uno de los diferentes análisis se lleva a cabo en esa misma muestra única. Esto no se ha enseñado en la técnica anterior. De hecho, la técnica anterior enseña lejos de esto porque la técnica anterior hace hincapié en la importancia de optimizar las condiciones para cada análisis individual que se está llevando a cabo. Las prácticas de detección selectiva actuales de todo el mundo emplean una mancha diferente para cada prueba que se esté realizando. Se enseña constantemente que una mancha por enzima debe analizarse en la técnica anterior. Por lo tanto, es una notable diferencia de la presente invención que el enfoque de los inventores implica el análisis de varias enzimas en una misma mancha única. Este es un punto importante, ya que no se había detectado hasta la presente invención que la información útil para diversas enzimas puede, de hecho, extraerse de los sistemas subóptimos (o incluso completamente no optimizados) o sistemas sin tamponamiento que se enseñan en este documento. . Esta es una forma de realización clave de la multiplexación global de la presente invención.

Un punto similar surge en conexión con las diluciones utilizadas. Una dilución típica de la muestra para el análisis típico de las hemoglobinopatías es de 6 - 8 veces mayor que para el análisis de metabolitos. Por otra parte, en la técnica anterior, los metabolitos normalmente se extraen de la mancha de sangre utilizando metanol o mezclas de metanol:agua para fijar (dejar sin extraer la proteína desnaturalizada y las sales), reduciendo de este modo la supresión de iones en la fuente de electropulverización. De acuerdo con la presente invención, el único disolvente usado es agua. Sin embargo, es una ventaja de la presente invención que, efectivamente, se puede detectar de forma fiable y reproducible metabolitos de diagnóstico, incluso en las muestras que se han diluido de 6 - 8 veces para el análisis de hemoglobinopatías. Esto es sorprendente en sí mismo, teniendo en cuenta las concentraciones significativamente más bajas de los metabolitos en las muestras diluidas. Por otra parte, esto es sorprendente en otro nivel en el que sistemas de extracción con metanol o con mezcla de metanol:agua que se consideran parte del procedimiento estándar para el análisis de metabolitos sorprendentemente pueden omitirse según la presente invención. Adecuadamente, no se usan disolventes orgánicos en las etapas preparativas de los procedimientos de la invención. Claramente, si se requieren el tampón de recorrido para EMEM o aditivos similares para la lectura, deberían añadirse como es práctica habitual antes de la lectura. Sin embargo, adecuadamente, las etapas de disolventes orgánicos se omiten de preparación de la muestra. Adecuadamente se omiten de los procedimientos las etapas de extracción de metabolitos convencionales.

#### Muestra

Una muestra puede ser cualquier material adecuado derivado del sujeto que se va a analizar. Adecuadamente, la muestra comprende sangre. En algunas realizaciones, dicha sangre puede ser sangre del cordón umbilical, que puede tener la ventaja de que conducir a un diagnóstico más temprano. Más adecuadamente, la muestra es sangre capilar. Adecuadamente, la muestra es sangre capilar de un pinchazo en el talón. Lo más adecuadamente, la muestra comprende sangre capilar de un pinchazo en el talón tomada de un neonato de 0 días hasta 10 días de edad. Adecuadamente, la sangre se toma el día 1 hasta el día 8 después del parto, de adecuadamente el día 3 hasta el día 8 después del parto, adecuadamente el día 5 al día 8 después del parto.

Las manchas estándar en una tarjeta para manchas de sangre mediante la cual se recogen estas muestras de punción del talón son típicamente relativamente grandes (por ejemplo, más de 6 mm de diámetro). En la actualidad, se recogen aproximadamente cuatro manchas de una sola sesión de obtención de muestras por punción. Sin embargo, es una ventaja de la presente invención que se necesita significativamente menos material de muestra. Específicamente, una muestra de sangre para su uso en la presente invención puede ser ventajosamente de 6 mm o de menos de 6 mm de diámetro, y adecuadamente puede ser un mero punto de 3,2 mm, lo más adecuadamente sólo un punto de 3,2 mm. Para la comparación, se pueden obtener aproximadamente seis manchas de 3,2 mm del mismo material que se requiere para una sola mancha estándar de la técnica anterior ("mancha grande").

Cabe señalar que los servicios sanitarios de varios países conservan estas muestras de manchas de sangre. Por ejemplo, en Dinamarca las manchas se almacenan congeladas. En el Reino Unido, las manchas suelen conservarse en su estado seco. El número de manchas tomadas y almacenadas anualmente es significativo. Por ejemplo, en el Reino Unido se toman aproximadamente 600.000 muestras al año, aproximadamente 3.000.000 al año en EE.UU. y aproximadamente 4.000.000 al año en toda Europa (excluido el Reino Unido). Por lo tanto, es una ventaja adicional de la presente invención que se tienen que obtener menos manchas y, consecuentemente, tendrán que almacenarse menos manchas. Alternativamente, se puede obtener la misma cantidad de sangre que en las técnicas de obtención de muestras existentes, y una ventaja de la invención es que hay más sangre más residual sobrante para las nuevas pruebas de seguimiento en una etapa posterior.

Es un problema adicional que poco después del nacimiento, los bebés pueden sufrir dificultades y / o pueden presentar problemas de alimentación. Estos factores pueden dar lugar a metabolitos que "desaparecen" o, de hecho, que aparecen en momentos inesperados. Sin embargo, las actividades enzimáticas siempre están ahí, a pesar de los aparentes caprichos de aparición o desaparición de metabolitos en muestras de sujetos en dificultades. Por lo tanto, es una ventaja de la presente invención a la hora de analizar la actividad catalítica o la actividad enzimática en la muestra que las tensiones después del parto en el sujeto que se está analizando se eliminan en gran medida del análisis. De hecho, mediante la detección de la actividad enzimática directamente en lugar del metabolito, la sensibilidad puede incrementarse. Por otra parte, mediante el uso de sustrato marcado en el análisis de la actividad enzimática, cualquier efecto de fondo o producto preexistente en la muestra pueden eliminarse, mejorando la especificidad del análisis.

Desde una perspectiva de la técnica anterior, es sorprendente que podría hacerse que la multiplexación enseñada en el presente documento funcionara. La razón es que el digesto proteolítico de los polipéptidos en la muestra, tal como el digesto tríplico, liberará aminoácidos, incluyendo fenilalanina. Si la fenilalanina se utiliza como metabolito de diagnóstico (por ejemplo, cuando su presencia se indica como indicativa de la fenilcetonuria), cabría esperar que este tratamiento confunda esos resultados. Sin embargo, como se demuestra en el presente documento, de hecho el análisis multiplexado funciona. De hecho, es posible utilizar manchas de sangre para normalizar este efecto y tenerlo en cuenta, es decir, es posible observar más fenilalanina de la se libera en realidad, por lo que, de hecho, sorprendentemente no importa si el tratamiento con proteasa se multiplexa junto con la otros análisis. En otras palabras, mediante el uso de un calibrador con la mancha de sangre de la concentración conocida de fenilalanina, la cantidad de fenilalanina liberada de una muestra mediante la actividad de tripsina se compensa por la liberación equivalente de los patrones de la muestra de sangre. Esto también es cierto para otros aminoácidos. En cualquier caso, esto no es un problema para el análisis de acilcarnitina.

La edad de la muestra puede ser importante en algunas realizaciones. Esto significa el tiempo transcurrido desde que se recogió la muestra, y no se refiere a la edad del sujeto del que se tomó la muestra. Por lo tanto, los muestreadores pueden variar de unos días a semanas, de meses o incluso años, tal como dos años. Normalmente, cuanto más antigua es la mancha, menos proteína se eluye. Así, cuando se usan tratamientos con proteasa en el análisis, la cantidad de aminoácidos libres de 'fondo' liberados (que da una lectura "basal" diferente a partir de la cual se va a evaluar la presencia diagnóstica de, por ejemplo Phe para FCU) tiende a ser menor en las muestras de mayor edad, es decir muestras (que son de semanas o meses de antigüedad). Por esta razón, se prefiere el uso de muestras de control o de referencia de aproximadamente la misma edad cuando se comparan muestras. Esto significa, preferentemente, muestras que tienen 2-3 meses de diferencia, adecuadamente de 2 meses de diferencia, adecuadamente de 1 mes de diferencia, adecuadamente de 2 semanas de diferencia, lo más adecuadamente de 1 semana de diferencia.

Para las muestras de más edad, el uso de metanol como disolvente de recorrido puede ser ventajoso para optimizar la ionización de las cantidades absolutas inferiores de material eluido.

### **Tratamiento con proteasa**

Una etapa de digestión con proteasa se lleva a cabo como última etapa antes de analizar la muestra (es decir, una última etapa antes de la lectura). Típicamente, la muestra se rehidratará primero, después se le añadirá cualquier sustrato (adecuadamente añadido en agua solo, de modo que se evita la adición de cualquier sistema de tamponamiento), después la muestra se incubará para permitir la catálisis de esos sustratos y sólo entonces se realizará la adición de la proteasa seguida de una incubación apropiada para permitir la acción de la proteasa. Claramente, es preferible añadir la proteasa después de que las enzimas en la muestra han tenido la oportunidad de actuar sobre el sustrato añadido exógenamente (si existe). Si la proteasa se añade de forma simultánea con los sustratos, existe el riesgo de que las propias enzimas se degraden por la acción de la proteasa, con el consiguiente riesgo de dar un resultado falso negativo para dichas actividades enzimáticas. Por tanto, las etapas de adición de la proteasa e incubación con proteasa llevan a cabo adecuadamente las últimas o inmediatamente antes del análisis de la muestra (de lectura).

Adecuadamente, las muestras no están butiladas. Adecuadamente, no se realiza ninguna derivatización de la muestra.

Adecuadamente, no se lleva a cabo la desnaturalización inespecífica de proteínas en la muestra.

Adecuadamente, las adiciones solo se hacen en agua. Adecuadamente, el agua es el único disolvente usado en la preparación de la muestra. Adecuadamente, no se usan disolventes orgánicos en la preparación de muestras.

Claramente "tampón de recorrido" o "disolvente de recorrido" (que puede comprender disolvente orgánico tal como acetonitrilo) añadido en el punto de lectura no se considera parte de la preparación de la muestra, es una ventaja de la invención que la preparación de muestras no implica disolventes orgánicos, pero esto no debe interpretarse para excluir la adición de tampón de recorrido final como parte de la lectura. La adición final del disolvente de recorrido (de forma adecuada después de la elución / adición de sustrato, la incubación de actividad enzimática, la adición de la proteasa, y la incubación con la proteasa) se lleva a cabo adecuadamente. Tiene la ventaja de estimular una ionización eficiente de los péptidos, sustratos enzimáticos / productos, y los metabolitos convencionales. Además,

puede ser ventajoso en la solubilización de algunos metabolitos, por ejemplo, acilcarnitinas de cadena larga. Por lo tanto, adecuadamente, la adición final del disolvente de recorrido (que puede comprender disolvente orgánico) es una parte del proceso actual en el punto de lectura.

5 El tampón de recorrido puede comprender cualquier composición adecuada conocida en la técnica. Adecuadamente, el tampón de recorrido comprende acetonitrilo tal como se establece en el presente documento, en particular en la sección de ejemplos. Adecuadamente, se utiliza cualquier tampón de recorrido adecuado para EMEM. En algunas realizaciones, las reacciones enzimáticas (ya sean diagnósticas por sí mismas o si se usa proteasa tal como tripsina para producir polipéptidos de diagnóstico) se detuvieron mediante la adición de tampón de recorrido. En algunas realizaciones, este tampón de recorrido de detención puede comprender metanol, o puede consistir en metanol. Esto ofrece la ventaja de una mejor ionización. Por supuesto, en un sentido práctico, el uso de metanol como tampón de recorrido de detención /disolvente no excluye el uso del disolvente de recorrido convencional, tal como disolvente a base de acetonitrilo. Desde una perspectiva, dicho disolvente convencional puede seguir usándose, ya que normalmente un pequeño volumen de muestra se carga está realmente cargado en la máquina de EMEM para la lectura, en el que el volumen puede comprender 2  $\mu$ l de la muestra detenida (es decir, la muestra que comprende tampón de recorrido (disolvente de recorrido de parada), pero, por supuesto, esta muestra típicamente se introduce en un sistema de carga capilar (o "conducto" y, por tanto, es probable que esté bordeado a cada lado por tampón de recorrido basado en acetonitrilo convencional. Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, se entenderá que el uso de metanol como tampón de recorrido de detención no excluye al acetonitrilo ni a otros tampones convencionales a partir de la etapa de lectura, pero se alcanzan ciertas ventajas mediante el uso de dicho metanol como disolvente de recorrido (disolvente de recorrido de detención). Por lo tanto, adecuadamente, los procedimientos de la invención comprenden la etapa de detener la reacción con un disolvente de recorrido convencional de acetonitrilo-H<sub>2</sub>O-ácido fórmico, tal como 1 ml del mismo, más adecuadamente los procedimientos de la invención comprenden la etapa de detener la reacción con metanol, tal como 1 ml del mismo.

25 Adecuadamente, no se añaden a la muestra tampones exógenos. Adecuadamente se omiten las etapas de tamponamiento de los procedimientos de la invención.

Adecuadamente, no se añade a la muestra un tampón exógeno.

Adecuadamente, no se realiza ninguna etapa de extracción intermedia, sino más bien adecuadamente, la muestra se analiza directamente después de la preparación sin etapas intermedias.

### **Desnaturalización**

30 En la técnica anterior para el análisis de proteínas se considera necesario desnaturalizar la(s) proteína(s) antes de la digestión con proteasa. En la técnica anterior, por ejemplo en relación con hemoglobinopatía, las muestras se desnaturalizan formalmente con adiciones separadas de acetonitrilo y ácido fórmico y después se dejaron en reposo. De acuerdo con los procedimientos de la técnica anterior, el ácido fórmico en las muestras se desnaturaliza después utilizando carbonato de amonio para llevar el pH cerca del pH óptimo de la tripsina antes de añadir tripsina. La eliminación de estas etapas, en base a la idea de que las proteínas en manchas de sangre seca ya están al menos parcialmente desnaturalizadas, es una simplificación masiva de los procedimientos de la invención. Por lo tanto, adecuadamente, los procedimientos de la invención omiten específicamente las etapas de preparación de muestras basadas en disolvente orgánico o ácido. Adecuadamente, los procedimientos de la invención omiten específicamente etapas de preparación de la muestra basadas en la desnaturalización químicas. Adecuadamente, los procedimientos de la invención comprenden la preparación de muestras sin etapa (s) intermedias de disolvente orgánico / desnaturalización. En un aspecto amplio, la invención se refiere a un procedimiento(s) de análisis de proteínas tales como procedimientos diagnósticos de hemoglobinopatía que omiten dichas etapas incluso cuando esos procedimientos no se multiplexan tal como se enseña en el presente documento.

### **Cuantificación - Patrones internas / Proporción producto: sustrato**

45 La cuantificación puede realizarse utilizando sustratos marcados con isótopos estables. Adecuadamente, dicho sustrato se marca con al menos un isótopo estable, adecuadamente al menos dos isótopos estables (s). Adecuadamente, dicho(s) isótopo(s) se selecciona/n del grupo que consiste en deuterio, carbono 13, nitrógeno. 15, y oxígeno 18. Adecuadamente dicho isótopo es el carbono 13. Cuando se usan dos isótopos, son adecuadamente el carbono 13 y el nitrógeno 15. Adecuadamente, cuando el sustrato es un polipéptido, el isótopo estable se incorpora en el extremo N con respecto al sitio de escisión de la endopeptidasa de interés (si los hay), de manera el marcador es retenido por el péptido después de la escisión con endopeptidasa (si existe). Los patrones internos de isótopos estables para la medición de los metabolitos / péptidos (por ejemplo, péptido isótopos estables) usando procedimientos estándar de dilución de isótopos pueden añadirse la adición inicial de sustratos enzimáticos o con la adición de la proteasa. Los isótopos estables de productos enzimáticos se añaden de manera adecuada después de la incubación de la enzima, lo que tiene la ventaja de que no inhiben la actividad enzimática. Cuando se añaden sustratos marcados con isótopos estables para la especificidad, esta está adecuadamente en la adición inicial, es decir de forma que la o las enzimas tienen la oportunidad de actuar en cualquiera de tales sustrato (s). Es una ventaja de la invención que la presencia o ausencia de actividades enzimáticas o la actividad enzimática relativa, típicamente se analiza sin la necesidad de cuantificación. Típicamente, esto se puede medir usando el producto producido o la relación sustrato: producto. Una ventaja clave de realizaciones que ofrecen además la cuantificación

es cuando se utilizan la concentración(es) subóptima(s) de sustrato.

Alternativamente se puede llevar a cabo cuantificación por derivación de la relación de sustrato / producto.

### **Otras aplicaciones**

5 Los sistemas y procedimientos de la invención permiten el diagnóstico simultáneo de enfermedades metabólicas hereditarias y hemoglobinopatías, en un una mancha de sangre de solo 3,2 mm y sin transferencias de muestras, sobre la base de metabolito sangre completa multiplexada, la actividad enzimática y la medición de péptidos trípticos mediante EMEM.

La invención encuentra aplicación en la detección de mutaciones en una proteína / polipéptido, y / o en la medición cuantitativa de LAS proteínas / polipéptidos como péptidos liberados por proteasa tal como tripsina.

10 Ventajosamente, los inventores omiten cualquier adición para la desnaturalización clásica de la hemoglobina (o cualquier proteína) simplemente simplificando significativamente el procedimiento complete.

El sistema puede ampliarse fácilmente para incluir metabolitos adicionales, actividades enzimáticas, o péptidos trípticos y representa un enfoque analítico multiplexado general aplicable a una serie de diagnósticos clínicos.

15 Un beneficio clave de la invención es el uso de la mancha de sangre como el único requisito de amortiguación para medir una gama de actividades enzimáticas, tales como biotinidasa (pH óptimo 6,0) y porfobilinógeno sintasa (pH óptimo 6,4). Adecuadamente, los sustratos se añaden en agua (es decir, adecuadamente el agua es el único disolvente / vehículo utilizado). Los productos enzimáticos se miden después para determinar la actividad. La invención se refiere a "el diagnóstico en un" punto

20 Un efecto técnico clave de la utilización de los sustratos de enzimas en agua es que la muestra es ventajosamente equivalente a la que hemos utilizado anteriormente para la digestión tríptica y el diagnóstico de hemoglobinopatía.

25 La inclusión de metabolitos en el mismo análisis de la muestra es sorprendentemente eficaz. La dilución de la muestra para el análisis de hemoglobinopatía es típicamente 6-8 veces superior al habitual para el análisis de metabolitos. Los metabolitos se extraen después por lo general de la sangre usando metanol o mezclas de metanol: agua que minimizan la proteína y la elución de sal para minimizar la supresión de iones en la fuente de electropulverización. Además, los sustratos / productos y procesos enzimáticos pueden aumentar / disminuir los metabolitos de interés. En particular, el análisis de la técnica anterior de metabolitos implica típicamente butilación, que convenientemente está omitida específicamente y adecuadamente de los procedimientos de la invención.

Se puede usar más de un sustrato para una enzima dada. Esto tiene la ventaja de aumentar la especificidad.

Se puede usar un sustrato marcado con isótopo estable. Esto tiene la ventaja de mejorar la especificidad.

30 Adecuadamente se preparan sustratos para que estén específicamente libree del producto enzimático que se va a medir. Esto tiene la ventaja de eliminar "falsos positivos" que se pueden producir si el producto contamina el sustrato.

35 Adecuadamente se usan sustratos solubles en agua. Esto tiene la ventaja de mantener el agua en el único disolvente / vehículo y, de este modo, eliminar los disolventes orgánicos y / o las etapas de extracción de preparación de la muestra (aunque, como se ha indicado anteriormente la adición de 'disolvente de recorrido' en la etapa de lectura todavía puede implicar disolvente(S) orgánico(s) tal como acetónitrilo). Es una ventaja de la presente invención que se elimina la cromatografía para la eliminación de tampón o similar.

40 Por lo tanto, en una realización preferida, la muestra comprende una mancha de sangre, la preparación de la muestra no implica ninguna transferencia, y los metabolitos, las actividades enzimáticas, y las proteínas se miden cada una en un solo análisis multiplexado.

45 Los inventores demostraron un sistema analítico multiplexado para la medición simultánea de analitos (por ejemplo octanoilcarnitina para MCADD), detección de proteínas (hemoglobina beta falciforme) y medición de las actividades enzimáticas, en una solo mancha de sangre de 3,2 mm (el tamaño de la mancha de sangre puede ser mayor o meno y se puede usar sangre entera líquida o plasma, lo más adecuadamente se utiliza sangre; adecuadamente el tamaño de la mancha es de 3,2 mm nominales; lo más adecuadamente el tamaño de la mancha es de 3,2 mm) tal como el uso de la inyección de la muestra directa sin cromatografía y detección por espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría de masas (EMEM). El sistema se describió con referencia a la detección selectiva en neonatos, pero podría aplicarse a una variedad de situaciones de diagnóstico y de seguimiento clínico, por ejemplo, cáncer, diabetes (de tipo 1 y de tipo 2), enfermedad renal, y enfermedad hepática.

50 La invención se puede aplicar también a otros analitos, tales como dimetilarginina asimétrica (ADMA), ácido orótico, y 3-O-metil-dihidroxifenilalanina (3 OMDOPA) para permitir ventajosamente la detección selectiva de otros trastornos hereditarios y congénitos. La detección selectiva de enfermedades con estos metabolitos no se ha descrito previamente. Estos analitos (metabolitos) se pueden incorporar en el sistema de detección selectiva multiplex

descrito actualmente. En particular, los inventores describen el rendimiento de los análisis usando elución de la mancha de sangre con 150 µl de metanol (que contiene toda la gama de isótopos estables para cuantificación de aminoácidos, acilcarnitina, creatinina, ácido metilmalónico, ácido orótico, ADMA, y dimetilarginina simétrica (SDMA)) durante 30 minutos, seguido de 2 inyecciones, cada una de 5 µl, del eluato, para cromatografía rápida, electropulverización y los modos de iones positivos y negativos, y el análisis RM en un SCIEX API5000 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Cabe señalar que se ha propuesto al SDMA como una medida de la tasa de filtración glomerular y los datos presentados en este documento demuestran que el SDMA se puede medir con exactitud y precisión suficientes en una mancha de sangre, lo que permite un diagnóstico preciso de la insuficiencia renal y la monitorización de la función renal en un amplia gama de afecciones clínicas, e, g diabetes y enfermedades cardíacas, asociadas con la disminución de la función renal y el consiguiente aumento del riesgo cardiovascular.

### **Breve descripción de las figuras**

Las figuras 1 a 8 muestran las exploraciones.

La Figura 9 muestra un diagrama.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran cromatogramas; las líneas naranjas son las líneas superiores, excepto en la figura 12, panel inferior, en el que la línea azul es la línea superior.

La Figura 13 muestra un gráfico.

La figura 14 muestra cromatogramas; en el panel superior de la línea azul es la línea superior.

La figura 15 muestra cromatogramas; en el panel superior de la línea azul es la línea superior.

La figura 16 muestra cromatogramas; en el panel superior de la línea azul es la línea superior.

Las figuras 17 y 18 muestran gráficos de curvas estándar.

A continuación, la invención se describe mediante los ejemplos. Se pretende que estos ejemplos sean ilustrativos, y no están destinados a limitar las reivindicaciones adjuntas.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1:**

Procedimiento general:

La mancha de sangre en placas de pocillos profundo - añadir 100 µl de sustrato incluyendo isótopos estables para fenilalanina, tirosina y octanoilcarnitina, e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

Añadir 5 µl de tripsina (5 mg / ml) e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Añadir 1 ml de disolvente de recorrido que contiene PABA con isótopo estable.

Listo para inyectar. 1 minuto de tiempo EMEM

Procedimientos detallados:

Inyección de 2 µl. 75 µl/min. Fase móvil acetonitrilo: agua 1:1 con ácido fórmico al 0,025 %. Adquisiciones de EMEM MRM de un total de 1 minuto para hemoglobinopatías clínicamente diagnósticas, ácido 5-aminolevulínico, porfobilinógeno, biocitina, biotina, lisina, d5-lisina, biotina, PABA, PABA, d4-PABA, fenilalanina, tirosina, octanoilcarnitina, d5 -fenilalanina, d4 tirosina y d3-octanoilcarnitina.

Se realizaron los siguientes análisis:

1) Los inventores incubaron manchas de sangre total de 3,2 mm, las prepararon a partir de sangre entera colocada sobre papel de filtro Schleicher & Schuell (utilizado para la detección selectiva neonatal), con ácido 5-aminolevulínico, el sustrato natural de la porfobilinógeno sintasa, y se incubaron a 37 °C durante 30 min y 1 h y se midió el porfobilinógeno por mediante EMEM.

2) Como 1, pero incluyendo 100 µmol / l de succinilacetona, que demuestra la inhibición del ensayo - no se detectó (virtualmente) porfobilinógeno, y, por lo tanto, la capacidad para detectar tirosinemia de tipo 1.

3) Los inventores incubaron manchas de sangre total de 3,2 mm, las prepararon a partir de sangre entera colocada sobre papel de filtro Schleicher & Schuell (utilizado para la detección selectiva neonatal), con biocitina, el sustrato natural de la biotinidasa, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y 1 hora y se midió la biotina y la lisina por mediante EMEM.

4) Como 3, pero utilizando glóbulos rojos lavados con solución salina con plasma de un paciente con deficiencia de biotinidasa añadida, que demostró actividad reducida de biotinidasa. Este experimento y 3 se complicaron por la presencia de cantidades significativas de biotina en el sustrato. Se destaca que la discriminación todavía era posible permitiendo la detección de la deficiencia de biotinidasa, pero el beneficio de un sustrato libre de biotina o lisina marcada con isótopos estables (señal activada y no está presente en condiciones estándar).

5) Los inventores incubaron manchas de sangre total de 3,2 mm, las prepararon a partir de sangre entera colocada sobre papel de filtro Schleicher & Schuell (utilizado para la detección selectiva neonatal), con botina PABA, un sustrato artificial de la biotinidasa, y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y 1 hora y se midió la biotina y el PABA mediante EMEM.

6) Como 5, pero utilizando glóbulos rojos lavados con solución salina con plasma de un paciente con deficiencia de biotinidasa añadida, que demostró actividad reducida de biotinidasa. Este experimento y 5 se complicaron por la presencia de cantidades significativas de biotina en el sustrato. Se destaca que la discriminación, en particular usando PABA, todavía era posible permitiendo la detección de la deficiencia de biotinidasa, pero con la ventaja de un / sustrato libre de PABA/ biotina .

7) Como 5 y 6, pero con PABA isótopo estable añadido para la cuantificación de PABA liberado.

8) Como el anterior pero con ácido 5-aminolevulínico y biocitina o ácido 5-aminolevulínico y PABA biotina o ácido 5-aminolevulínico, biocitina y biotina PABA añadidos para demostrar la capacidad para medir ambas enzimas simultáneamente y hacer el diagnóstico de cualquiera de biotinidasa y / o tirosinemia de tipo 1 en la misma mancha de sangre.

9) Como el anterior pero añadiendo tripsina e incubando durante otros 30 minutos a 37 °C para demostrar las actividades enzimáticas normales, el patrón de la hemoglobina, la fenilalanina y octanoilcarnitina.

10) Como 9, pero la muestra de sujetos con enfermedad de células falciformes para demostrar las actividades enzimáticas normales, el patrón de fenilalanina, octanoilcarnitina y de hemoglobina de la enfermedad de células falciformes.

11) Como en 9 pero con la muestra de un paciente con FCU para demostrar las actividades enzimáticas normales, el patrón de la hemoglobina, octanoilcarnitina y el aumento de fenilalanina diagnóstico de FCU.

12) Como en 9 pero con la muestra de un paciente con MCADD para demostrar las actividades enzimáticas normales, el patrón de la hemoglobina, fenilalanina y el aumento de octanoilcarnitina diagnóstico de FCU.

## **Ejemplo 2: Análisis multiplexado**

Este ejemplo presenta un análisis multiplexado que implica el tratamiento con proteasa, así como el ensayo de los aminoácidos libres en las muestras, que no ha sido posible en las técnicas basadas en la técnica anterior. Además, los inventores han demostrado que cada uno de los análisis y tratamientos pueden llevarse a cabo en multiplex de acuerdo con la presente invención y que cada una de las lecturas del análisis sigue siendo sólida y fiable a pesar del hecho de que sólo se prepara una muestra para la detección de metabolitos, actividades enzimáticas, análisis de la proteasa y que esta muestra se prepara sin tamponamiento exógeno y sin etapas de desnaturalización basadas en disolventes y en un corto plazo de tiempo, que no ha sido posible en la técnica anterior.

Por lo tanto, el procedimiento usado en esta sección, incluyendo el curso de tiempo optimizado, es:

mancha de sangre de 3,2 mm en placas de pocillos profundos, añadir 100 µl de sustrato (50 µM, después de la consideración de las concentraciones, ácido 5-aminolevulínico + biocitina o biotilil-PABA) e incubar a 37 °C durante 60 minutos.

Añadir 100 µl de tripsina (0,5 mg / ml) e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Añadir 1 ml de disolvente de recorrido que incluye isótopos estables para fenilalanina, tirosina y octanoilcarnitina.

Listo para inyectar. 1 minuto de tiempo en EMEM.

Los inventores demostraron en las siguientes tablas el incremento de la señal de fenilalanina en respuesta a la incubación con tripsina. (Tenga en cuenta que muchas de las filas están en pares de muestras duplicadas para ayudar a eliminar el error experimental). Obsérvese que los isótopos estables no se ven afectados. Esto es porque el isótopo estable, por supuesto, no está presente en la proteína en la muestra que está siendo digerida con tripsina y dando lugar al aumento de la señal de fenilalanina después de la digestión.

Esto también demuestra el incremento de las señales, fenilalanina y el patrón interno isótopo estable (aumento de la ionización), en metanol. Los resultados se calcularon utilizando las normas apropiadas.

A pesar de los problemas de envejecimiento de la muestra, la linealidad de la curva estándar, los valores de control, y la facilidad en la identificación del paciente con FCU indican la validez del sistema.

La fenilalanina elevada es indicativa de fenilcetonuria.

5 Las áreas de los picos en G son mayores que en F, es decir, midiendo la Phe de la liberación trípica así como la Phe realmente presente en la muestra. Los inventores demuestran que procede de liberación trípica porque D5 (isotópica) son las mismas columnas O y P. Si hubiera habido un efecto de la señal, el estándar isotópica habría 'subido' (es decir, una mayor señal) también.

10 Metanol como disolvente de detención/recorrido da mejor ionización/mayor sensibilidad. Esto se demuestra comparando la columna F con H y la columna O con Q. Esto es ventajoso pero opcional, puesto el disolvente de recorrido/detención convencional funcionan con gran eficacia.

15 Una demostración clave de este ejemplo es que no importa para el rendimiento de la invención exactamente en qué modo se analiza la Phe. Por ejemplo, la atención está dirigida a S/T/U/V, en particular a las filas 23/24. Claramente con tripsina se observa más Phe. Esto es debido a la liberación de Phe por la tripsina como se ha explicado anteriormente. Del mismo modo, con metanol se observa más Phe, debido a una mejor ionización como se ha explicado anteriormente. Desde un punto de vista de la técnica anterior, no cabría esperar que esto funcionara, ya que sería de esperar que la Phe liberada por la tripsina generara un nivel de Phe de fondo tal que la señal de Phe presente en los pacientes de FCU se perdería. Sin embargo, sorprendentemente los inventores muestran que en un análisis de multiplexado de acuerdo con la presente invención, todavía se tiene una excelente discriminación. Una de las razones se debe a la comparación con los controles adecuados. Mediante la incorporación de tratamiento con tripsina en el control, se pueden observar niveles elevados de Phe en los tratamientos de tripsina de controles sin FCU. Sin embargo, incluso con la señal producida por la tripsina, todavía hay una excelente discriminación con los niveles más altos de un paciente con FCU. Un punto clave es que la liberación relacionada con tripsina es menor en las muestras de mayor edad debido a que eluye menos proteína, estando por lo tanto disponible para el ataque por tripsina en muestras más antiguas. Además, y más importante, en las muestras de la misma edad, la elución de proteínas, y, por tanto, la señal de Phe producida por tripsina, es comparable entre los controles y los pacientes de FCU de modo que el "fondo" de la señal de Phe liberada mediante la proteasa es comparable entre los dos, pero crucialmente, y de forma inesperada con respecto a la técnica anterior, según la presente invención sigue existiendo una diferencia detectable sólida en la señal en una muestra de FCU debido al diagnóstico libre de Phe que hay en muestra y no en el control. Por lo tanto, mientras que los procedimientos de la técnica anterior son confundidos por un enfoque multiplex, los inventores mostraron que su procedimiento es sólido incluso en multiplex. El [fondo más la señal] de una muestra de FCU se distingue claramente de la señal [de fondo solamente] de un control adecuado, a pesar del gran componente de fondo (generada por la Phe liberada por la proteasa). En otras palabras, se puede permitir la "elevación" de la señal en los ensayos multiplexados de proteasa y la señal de diagnóstico real todavía se puede discriminar según la presente invención.

35 Es una característica ventajosa opcional de la invención el uso de muestras de control de la misma edad cuando un análisis de la proteasa es parte del ensayo multiplex, ya que esto tiene la ventaja de que el fondo coincide incluso mejor y, por lo tanto, una discriminación mejor/más sólida.

A	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Nombre de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Concentración del analito	Área del pico del analito (Recuentos)	Proporción del área	Proporción del área	Proporción del área	Proporción del área			
				Sin disolvente de rec.- tripsina	Disolvente de rec.- tripsina	Sin tripsina-metanol	Tripsina-metanol	Sin disolvente de rec.- tripsina	Disolvente de rec.- tripsina	Sin tripsina-metanol	Tripsina-metanol
6	Mancha blanco	Fenilalanina	N/A	45200	53300	79000	37800	0,072	0,094	0,103	0,059
7	Pat. 1	Fenilalanina	61,8	324000	559000	653000	945000	1,550	2,450	1,290	2,190
8	Pat. 2	Fenilalanina	568	1120000	1460000	3060000	2790000	5,820	6,940	5,580	6,660
9	Pat. 3	Fenilalanina	1130	2520000	3070000	4690000	4540000	10,400	10,900	8,250	10,600
10	QC1	Fenilalanina	N/A	494000	776000	1220000	1380000	2,320	3,250	2,150	3,110
11	QC2	Fenilalanina	N/A	1350000	1540000	2540000	2570000	5,680	5,910	4,800	5,720
12	MSUD Pat.	Fenilalanina	N/A	255000	475000	531000	684000	1,100	2,120	1,020	1,540
13	MSUD QC L	Fenilalanina	N/A	248000	463000	668000	809000	1,150	1,890	1,270	1,960
14	MSUD QC H	Fenilalanina	N/A	244000	479000	573000	868000	1,150	2,170	1,180	2,000
15	Control	Fenilalanina	N/A	312000	584000	858000	1090000	1,500	2,690	1,620	2,580
16	Control	Fenilalanina	N/A	318000	618000	866000	1260000	1,630	2,910	1,630	2,870
17	Control +SA	Fenilalanina	N/A	376000	636000	866000	1340000	2,020	3,070	1,680	3,170
18	Control +SA	Fenilalanina	N/A	382000	597000	861000	1320000	1,850	2,920	1,620	3,050
19	Control lavado	Fenilalanina	N/A	280000	445000	596000	741000	1,130	1,820	1,110	1,760
20	Control lavado	Fenilalanina	N/A	240000	478000	702000	721000	0,962	1,710	1,370	1,620
21	MCADD CDC	Fenilalanina	N/A	457000	748000	1230000	1460000	2,230	3,740	2,410	3,290
22	MCADD CDC	Fenilalanina	N/A	435000	746000	1080000	1450000	2,340	3,740	2,170	3,380
23	PKU NEW	Fenilalanina	N/A	879000	1140000	1890000	2050000	3,790	4,480	3,680	4,710
24	PKU NEW	Fenilalanina	N/A	875000	1190000	1980000	2150000	4,050	4,510	4,110	5,700
25	MSUD	Fenilalanina	N/A	187000	329000	254000	367000	0,611	1,090	0,473	0,916
26	MSUD	Fenilalanina	N/A	164000	339000	267000	454000	0,482	1,120	0,512	1,100
27	AS	Fenilalanina	N/A	228000	301000	384000	443000	0,807	1,060	0,724	1,020
28	AC	Fenilalanina	N/A	338000	406000	490000		0,905	1,130	0,922	
29	AA	Fenilalanina	N/A	234000	315000	375000		0,910	1,100	0,721	

A	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
Nombre de la muestra	Nombre del pico IS	Área del pico IS (Recuentos)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)			
6	D5Phe	624000	569000	770000	640000	< 0	< 0	< 0	< 0
7	D5Phe	209000	228000	505000	430000	57,6	39,1	8,42	41,3
8	D5Phe	192000	211000	548000	419000	576	611	669	607
9	D5Phe	243000	283000	568000	427000	1130	1110	1080	1110
10	D5Phe	213000	239000	567000	442000	151	140	140	158
11	D5Phe	237000	265000	530000	449000	559	467	549	488
12	D5Phe	232000	224000	519000	444000	2,75	< 0	< 0	< 0
13	D5Phe	217000	245000	525000	413000	8,1	< 0	5,3	11,3
14	D5Phe	213000	221000	486000	434000	8,46	2,46	0	16,7
15	D5Phe	209000	217000	530000	423000	50,6	68,7	58,7	90,5
16	D5Phe	195000	212000	533000	440000	66,5	97,5	59,7	127
17	D5Phe	187000	207000	529000	424000-	114	118	67,3	165
18	D5Phe	205000	205000	531000	433000	94,8	98,1	59,1	149
19	D5Phe	248000	245000	535000	422000	5,96	< 0	< 0	< 0
20	D5Phe	249000	280000	514000	446000	< 0	< 0	19,6	< 0
21	D5Phe	205000	200000	508000	442000	140	203	181	180

23	PKU NEW	D5Phe	232000	254000	510000	435000	329	297	377	361
24	PKU NEW	D5Phe	216000	265000	481000	377000	362	302	443	486
25	MSUD	D5Phe	306000	302000	536000	401000	< 0	< 0	< 0	< 0
26	MSUD	D5Phe	339000	304000	522000	413000	< 0	< 0	< 0	< 0
27	AS	D5Phe	283000	285000	531000	435000	< 0	< 0	< 0	< 0
28	AC	D5Phe	373000	359000	531000	< 0	< 0	< 0	< 0	< 0
29	AA	D5Phe	257000	287000	520000	< 0	< 0	< 0	< 0	< 0

Análisis multiplex: Tyr

Los inventores demostraron que el incremento de la señal de tirosina en respuesta a la incubación con tripsina. Obsérvese que los isótopos estables no se ven afectados.

5 Esto también demuestra el incremento de las señales, tirosina y el patrón interno isótopo estable (aumento de la ionización), en metanol.

A pesar de las cuestiones del envejecimiento de la muestra, la linealidad de la curva patrón y los valores de control confirman la validez del sistema.

Las siguientes tablas muestran los datos.

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Tiempo del pico del analito	Concentración del analito	Área del pico del analito (Recuentos)			
					Sin disolvente de rec. -tripsina	Disolvente de rec. -tripsina	Sin tripsina-metanol	Tripsina-metanol
Mancha en blanco	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	14800	79100	26600	80100
Pat. 1	Sin tripsina RS	Estándar	Tirosina	822	520000	801000	1070000	1350000
Pat. 2	Sin tripsina RS	Estándar,	Tirosina	80,2	95400	287000	250000	563000
Pat. 3	Sin tripsina RS	Estándar	Tirosina	1180	706000	870000	1290000	1280000
QC1	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	288000	488000	653000	899000
QC2	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	123000	273000	235000	428000
MSUD Pat.	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	72200	282000	155000	394000
MSUD QC L	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	78100	261000	198000	436000
MSUD QC H	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	79800	268000	180000	506000
Control	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	86900	350000	238000	630000
Control	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	87800	408000	246000	829000
Control +SA	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	94300	379000	226000	734000
Control +SA	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	96600	330000	229000	670000
Control lavado	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	87800	240000	177000	409000
Control lavado	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	78600	263000	197000	393000
MCADD CDC	Sin tripsina RS	Desconocido-	Tirosina	N/A	106000	338000	301000	660000
MCADD CDC	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	106000	337000	281000	654000
PKU NEW	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina-	N/A	86500	329000	181000	588000
PKU NEW	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	88700	347000	187000	738000
MSUD	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	58600	198000	74400	222000
MSUD	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	48200	205000	77100	250000
AS	Sin tripsina RS	Desconocido,	Tyrosin6	N/A	62100	125000	109000	184000
AC	Sin tripsina RS	Desconocido-	Tirosina	N/A	85900	157000	139000	184000
AA	Sin tripsina RS	Desconocido	Tirosina	N/A	69600	136000	100000	184000

Nombre de la muestra	Nombre del pico IS	Área del pico IS (Recuentos)		Área del pico IS (Recuentos)	Área del pico IS (Recuentos)	Concentración calculada (µmol/l)		Concentración calculada (µmol/l)
		Sin disolvente de rec.- tripsina	Disolvente de rec. - tripsina			Sin tripsina- metanol	Tripsina- metanol	
Mancha en blanco	13C6Tyr	373000	308000	434000	342000	< 0	< 0	< 0
Pat. 1	13C6Tyr	106000	108000	233000	197000	897,0	1120,0	958
Pat. 2	13C6Tyr	97300	104000	256000	200000	55,9	< 0	35,8
Pat. 3	13C6Tyr	118000	127000	252000	198000	1130,0	982,0	1090
QC1	13C6Tyr	107000	103000	250000	199000	423,0	469,0	453
QC2	13C6Tyr	113000	119000	255000	207000	78,3	< 0	21,3
MSUD Pat.	13C6Tyr	105000	104000	239000	192000	< 0	< 0	< 0
MSUD QC L	13C6Tyr	102000	116000	247000	185000	10,4	< 0	< 0
MSUD QC H	13C6Tyr	108000	103000	221000	192000	3,6	< 0	< 0
Control	13C6Tyr	97200	101000	233000	196000	37,4	153,0	46,6
Control	13C6Tyr	90000	93300	233000	194000	54,9	378,0	55,9
Control +SA	13C6Tyr	86400	93100	232000	190000	79,9	304,0	35,4
Control +SA	13C6Tyr	89400	94200	234000	201000	77,6	164,0	36,4
Control lavado	13C6Tyr	123000	114000	234000	204000	< 0	< 0	< 0
Control lavado	13C6Tyr	114000	122000	231000	198000	< 0	< 0	4,62
MCADD CDC	13C6Tyr	89300	89900	226000	200000	100,0	226,0	125
MCADD CDC	13C6Tyr	82000	88400	230000	199000	122,0	241,0	97,7
PKU NEW	13C6Tyr	108000	120000	237000	198000	17,4	< 0	< 0
PKU NEW	13C6Tyr	99200	120000	221000	184000	37,4	17,6	2,41
MSUD	13C6Tyr	147000	137000	245000	188000	< 0	< 0	< 0
MSUD	13C6Tyr	168000	140000	242000	183000	< 0	< 0	< 0
AS	13C6Tyr	134000	133000	241000	211000	< 0	< 0	< 0
AC	13C6Tyr	177000	175000	249000	< 0	< 0	< 0	< 0
AA	13C6Tyr	119000	127000	222000	< 0	< 0	< 0	< 0

Análisis multiplex: Oct Carn

Los inventores demostraron que el ligero incremento de la señal de octanoilcarnitina en respuesta a la incubación con tripsina. Obsérvese que los isótopos estables también se ven afectados. Sugiere una mejor ionización después de la digestión de proteínas.

- 5 Esto también demuestra el incremento de las señales, octanoilcarnitina y el patrón interno isótopo estable (aumento de la ionización), en metanol.

A pesar de los problemas de envejecimiento de la muestra, la linealidad de la curva estándar, los valores de control, y la facilidad en la identificación del paciente con MCADD indican la validez del sistema.

	Concentración calculada (µmol/l) Sin disolvente de rec- tripsina	Concentración calculada (µmol/l) Disolvente de rec. - tripsina	Concentración calculada (µmol/l) Sin tripsina-metanol	Concentración calculada (µmol/l) Tripsina-metanol
Mancha en blanco	0,140	<0	0,122	< 0
Pat. 1	2,930	2,980	2,940	3,080
Pat. 2	0,461	0,389	0,446	0,250
Pat. 3	0,171	0,191	0,175	0,230
<b>MCADD CDC</b>	<b>12,400</b>	<b>11,500</b>	<b>11,300</b>	<b>8,980</b>
<b>MCADD CDC</b>	<b>11,900</b>	<b>10,200</b>	<b>11,000</b>	<b>9,740</b>

- 10 Con todo detalle los datos se presentan en la siguiente tabla:

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Concentración del analito	Área del pico del analito (Recuentos)		Área del pico del analito (Recuentos)	Proporción del área del área (recuentos)		Proporción del área del área (recuentos)		
					Sin disolvente de rec, - rec-tripsina	Disolvente de rec, - tripsina		Sin disolvente rec-tripsina	Disolvente de rec, - tripsina			
Mancha en blanco	Sin tripsina RS	Desconocido	Octanol Carnitina	N/A	1390	491	1130	677	0,046	0,018	0,032	0,018
Pat, 1	Sin tripsina RD	Estándar	Octanol Carnitina	2,9	24900	29900	43000	50600	1,410	1,330	1,480	1,490
Pat, 2	Sin tripsina RD	Estándar	Octanol Carnitina	0,5	3520	5540	6750	8830	0,190	0,288	0,222	0,260
Pat, 3	Sin tripsina RD	Estándar	Octanol Carnitina	0,16	1310	4410	2070	7260	0,087	0,195	0,074	0,236
QC1	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanol Carnitina	N/A	4270	7510	7620	9990	0,258	0,375	0,259	0,324
QC2	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanol Carnitina	N/A	10800	15900	18700	25000	0,708	0,760	0,598	0,740
MSUD Pat,	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanol Carnitina	N/A	891	4130	2390	5010	0,053	0,238	0,079	0,157

MSUD QC L	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	402	5170	1420	6050	0,025	0,249	0,042	0,182
MSUD QC H	Sin tripsina RD	Estándar	Octanoil Carnitina	N/A	648	5590	1800	5910	0,037	0,291	0,060	0,176-
Control	Sin tripsina RD	Estándar	Octanoil Carnitina	N/A	970	3800	3050	6110	0,058	0,230	0,097	0,170
Control	Sin tripsina RD	Estándar	Octanoil Carnitina	N/A	461	3200	1460	6140	0,032	0,173	0,047	0,185
Control +SA	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	891	4540	32501	4910	0,055	0,247	0,104	0,146
Control +SA	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	835	33540	2010	5230	0,050	0,208	0,062	0,184
Control lavado	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	1790	2780	2660	6020	0,101	0,126	0,080	0,193
Control lavado	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	422	4520	1420	4650	0,023	0,216	0,049	0,153
MCADD CDC	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	87000	91200	161000	140000	6,290	5,670	5,260	4,020
MCADD CDC	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	85500	91700	153000	149000	5,400	4,160	5,140	4,550
PKU NEW	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	221	3880	1970	5410	0,013	0,187	0,065	0,165
PKU NEW	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	621	2510	763	5320	0,033	0,102	0,025	0,167
MSUD	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	N/A	1380	5310	768	5290	0,076	0,237	0,023	0,152

MSUD	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	1070	8110	1060	5750	0,045	0,306	0,035	0,180
AS	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	827	4560	1590	4140	0,046	0,226	0,056	0,116
AC	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	385	5950	406		0,018	0,224	0,012	
AA	Sin tripsina RD	Desconocido	Octanoil Carnitina	419	5690	1380		0,023	0,228	0,048	

Nombre de la muestra	Nombre de pico IS	Área del pico IS (Recuentos)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)	Concentración calculada (µmol/l)				
Mancha blanco Pat, 1 Pat, 2 Pat, 3 QC1 QC2 MSUD Pat,	D3C8	30400	27300	35600	36900	Sin disolvente de rec-tripsina	Sin disolvente de rec-tripsina	Disolvente de rec, -tripsina	Sin tripsina-metanol	Tripsina-metanol
	D3C8	17700	22400	29100	34000	0,140	2,930	< 0	0,122	< 0
	D3C8	18500	19300	30400	34000	0,461	0,389	2,980	2,940	3,080
	D3C8	14900	22600	28000	30700	0,171	0,191	0,389	0,446	0,250
	D3C8	16500	20000	29400	30800	0,571	0,595	0,175	0,175	0,230
	D3C8	15300	20900	31300	33700	1,620	1,390	0,565	0,565	0,475
	D3C8	16700	17300	30300	32000	0,169	0,227	1,230	1,230	1,360
	D3C8									

MSUD QC L	D3C8	16400	20800	34000	33200	0,106	0,155	0,142	0,131
MSUD QC H	D3C8	17300	19300	29700	33600	0,134	0,249	0,172	0,072
Control	D3C8	16900	16600	31400	36000	0,-105	0,266	0,239	0,098
Control	D3C8	14300	18500	31000	33200	0,120	0,086	0,139	0,101
Control +SA	D3C8	16300	18400	31100	33700	0,175	0,261	0,2-20	0,026
Control +SA	D3C8	16900	17100	32500	28400	0,165	0,185	0,164	0,087
Control lavado	D3C8	17800	22200	33300	31200	0,222	0,048,	0,174	0,015
Control lavado	D3C8	18800	21000	29000	30500	0,094	0,,134	0,156	0,034
MCADD CDC	D3C8	13800	16100	30600	34800	12,400	11,500	11,300	8,980
MCADD CDC	D3C8	15800	22000	29700	32700	11,900	10,200	11,000	9,740
PKU NEW	D3C8	17500	20800	30400	32800	0,071	0,072	0,174	< 0
PKU NEW	D3C8	18700	24600	31000	31800	0,127	0,004	0,143	< 0
MSUD	D3C8	18100	22400	34000	34800	0,155	0,255	0,108	0,056
MSUD	D3C8	23600	26500	30600	31900	0,143	0,353	0,1,13	0,104
AS	D3C8	17900	20200	28500	35700	0,143	0,161	0,143	< 0
AC	D3C8	21500	26600	33000		0,072	0,268	0,085	
AA	D3C8	17900	24900	28800		0,098	0,256	0,119	

Análisis multiplexado: Leu

5 Los inventores demostraron que el incremento de la señal de leucina en respuesta a la incubación con tripsina. Esto es menos prominente en la(s) mancha(s) viejas de paciente(s) de MSUD como se ha indicado anteriormente. Obsérvese que los isótopos estables no se ven afectados.

Esto también demuestra el incremento de las señales, leucina y el patrón interno isótopo estable (aumento de la ionización), en metanol.

Sin embargo, la linealidad de la curva patrón y los valores de control indican la validez del sistema en muestras contemporáneas. Datos mostrados en la siguiente tabla.

10

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Concentración del analito	Area del pico del analito (recuentos)		Area del pico del analito (recuentos)	Proporción del área		Area del pico del analito (recuentos)	Proporción del área (recuentos)	
					Sin disolvente de rec- tripsina	Disolvente de rec, - tripsina		Sin disolvente de rec- tripsina	Disolvente de rec, - tripsina		Sin tripsina- metanol	Tripsina- metanol
Mancha en blanco	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	54100	62800	50600	0,907	0,886	0,907	0,798	0,694
Pat, 1	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	147000	118000	255000	5,000	2,330	5,000	1,970	4,730
Pat, 2	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	154000	146000	313000	5,550	2,600	5,550	2,230	5,490
Pat, 3	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	161000	151000	279000	4,720	3,060	4,720	2,320	5,090
QC1	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	164000	161000	314000	5,820	2,500	5,820	2,460	5,760
QC2	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	175000	166000	287000	5,470	2,720	5,470	2,530	4,780
MSUD Pat,	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	533	196000	225000	293000	6,890	3,320	6,890	3,350	5,490
MSUD QC L	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	124	141000	130000	248000	4,650	2,170	4,650	1,900	4,530
MSUD QC H	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	228000	277000	442000	7,850	5,040	7,850	4,320	7,660
Control	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	206000	151000	385000	6,890	2,240	6,890	2,230	6,830
Control	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	220000	159000	452000	8,250	2,390	8,250	2,370	8,320
Control +SA	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	219000	155000	466000	7,300	2,800	7,300	2,350	8,580
Control +SA	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	192000	176000	430000	7,310	2,920	7,310	2,760	7,290
Control lavado	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	125000	120000	208000	3,660	1,800	3,660	1,780	3,700
Control lavado	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	128000	129000	194000	3,560	1,810	3,560	1,930	3,210
MCADD CDC	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	243000	230000	488000	9,360	3,600	9,360	3,720	8,890
MCADD CDC	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	243000	214000	476000	9,200	4,050	9,200	3,540	8,340
PKU NEW	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	181000	151000	333000	5,370	2,600	5,370	2,230	5,810
PKU NEW	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	208000	155000	385000	6,110	2,920	6,110	2,540	7,670
MSUD	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	216000	277000	264000	5,320	4,930	5,320	4,250	4,550
MSUD	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	223000	278000	302000	5,710	3,900	5,710	4,260	5,730
AS	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	89000	109000	121000	2,150	1,800	2,150	1,590	1,980
AC	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	103000	124000	187000	2,050	1,870	2,050	1,820	1,820
AA	Sin tripsina RS	Desconocido	Leucina	N/A	86900	99100	192000	2,200	1,920	2,200	1,540	1,540

Nombre de la muestra	Nombre del pico IS	Área del pico IS (Recuentos)	Concentración calculada (µmol/l)		Concentración calculada (µmol/l)			
						Sin disolvente de rec-tripsina	Disolvente de rec. - tripsina	
Mancha blanco	D3 Leu	64800	78700	59700	72900	< 0	< 0	< 0
Pat. 1	D3 Leu	27800	60100	29500	53900	183,0	188,0	143,0
Pat. 2	D3 Leu	25800	65100	27800	56900	279,0	288,0	219,0
Pat. 3	D3 Leu	30000`	65000	34000	54800	439,0	136,0	242,0
QC1	D3 Leu	28500	65300	28200	54500	241,0	337,0	283,0
QC2	D3 Leu	32300	65800	32100	60000	321,0	273,0	302,0
MSUD Pat.	D3 Leu	30800	67200	28500	53300	533,0	533,0	533,0
MSUD QC L	D3 Leu	29000	68300	30300	54700	124,0	124,0	124,0
MSUD QC H	D3 Leu	27300	64100	29100	57600	1140,0	707,0	807,0
Control	D3 Leu	27900	67500	29900	56400	151,0	533,0	218,0
Control	D3 Leu	26200	67000	26700	54300	203,0	780,0	258,0
Control +SA	D3 Leu	27400	65800	30000	54300	348,0	608,0	252,0
Control +SA	D3 Leu	25900	63800	26200	58900	391,0	610,0	368,0
Control lavado	D3 Leu	35200	67800	34200	56200	< 0	< 0	89,1
Control lavado	D3 Leu	33400	66900	36000	60400	< 0	< 0	< 0
MCADD CDC	D3 Leu	26100	61800	26000	54900	629,0	983,0	640,0
MCADD CDC	D3 Leu	22500	60400	26400	57100	791,0	954,0	588,0
PKU NEW	D3 Leu	31600	67700	33800	57200	276,0	256,0	217,0
PKU NEW	D3 Leu	28700	61100	34000	50200	391,0	390,0	304,0
MSUD	D3 Leu	40700	65300	40600	58000	1100,0	246,0	788,0
MSUD	D3 Leu	45700	65200	39000	52700	735,0	317,0	792,0
AS	D3 Leu	36600	68500	41400	61000	< 0	< 0	36,9
AC	D3 Leu	48700	68000	50300	19,2	7	< 0	102,0
AA	D3 Leu	35100	64200	39600	36,0	< 0	23,5	

Las concentraciones calculadas de 1100 y 735  $\mu\text{mol/l}$  para los pacientes de MSUD mostraron discriminación sólida en comparación con las concentraciones calculadas mucho más bajas para los pacientes no afectados; independientemente de los tratamientos con proteasa y / o metanol se mantuvo esta discriminación.

5 La invención se puede aplicar incluso en el análisis de muestras antiguas (por ejemplo, de meses a 2 años de edad o incluso más antiguas). Las exploraciones y/o proporciones, tales como la proporción Leu-Phe, se pueden utilizar para obtener excelentes resultados de diagnóstico. Por ejemplo, los resultados calculados para leucina y valina son menos fiables y esto parece estar relacionado con la edad de la mancha. En cuanto a las exploraciones, está claro que se debe hacer un diagnóstico. En este escenario, la proporción leucina / fenilalanina y / o la proporción valina / fenilalanina se pueden usar para discriminar la muestra del paciente con MSUD. Adicionalmente la inspección de las  
10 exploraciones muestra que las proporciones leucina / alanina y valina / alanina serían significativamente mejores.

Para ilustrar esto, consulte la Figura 1, exploración de acilcarnitina (superior) y exploración de pérdida neutra. (inferior, pérdida del ion formiato).

15 Compárese la Fig 1 con la figura 2 para ver elevación de Phe, por lo tanto se diagnostica FCU al paciente. Compárese la figura 3 para ver la leucina / isoleucina elevada (132,3) en la muestra de MSUD. La proporción Leu: Phe (132,3: 166,4) es un indicador aún más sólido de MSUD. La proporción Leu: Ala (132,3: 90,1) es un indicador aún todavía más sólido de MSUD, porque en MSUD, la Ala está típicamente baja como efecto secundario, por lo que mediante el estudio de esta proporción Leu: Ala como diagnóstico está todavía más pronunciada en MSUD.

La Figura 4 muestra que se detecta octanoilcarnitina (288,2) en un paciente de MCADD, y que esta detección y diagnóstico no se ven alterados por el análisis multiplexado de la invención.

20 Estos experimentos se repiten, esta vez con proteasa como parte del proceso de multiplex. La Figura 5 muestra la muestra de control para el proceso completo, incluyendo la proteasa (tripsina). Obsérvese que la señal es aproximadamente 10 veces más alta que en la figura 1 debido a la liberación de aminoácidos por la proteasa. Sin embargo, a pesar de esta señal de orden de magnitud más alto, la invención ventajosamente todavía proporciona una excelente discriminación. Compárese la Phe (166,3) en la figura 6 a la figura 5, está claramente elevada en la  
25 figura 6, lo que diagnostica FCU incluso a pesar de los niveles 10 veces más altos en general de señal / fondo. Además, la comparación de 132,2 de la figura 7 con la figura 5 (aprox.  $11,6 \times 10^5$  vs  $1,1 \times 10^5$ ) discrimina con facilidad y firmeza y diagnostica al paciente con MSUD. Como anteriormente, si las proporciones tales como de Leu:Ala se comparan, se consigue una discriminación aún más sólida. Teniendo en cuenta la octanoilcarnitina, compárese el 288,4 de la Fig 8 a la Fig 5 para ver una discriminación convincente y diagnosticar MCADD incluso en presencia de  
30 la proteasa tripsina, como parte del multiplex.

Adecuadamente, en la práctica, las manchas de muestras clínicas en una carrera se realizan todas en plazo de una semana o similar uno de otro. Sin embargo, para ilustrar la fiabilidad de la invención, las manchas de MSUD se hicieron hace más de 1 año y se desprende de los tratamientos "sin tripsina" frente a "tripsina" que no se obtiene ningún aumento significativo de la leucina o valina con tripsina en esta mancha.

35 Nota sobre ácido 5-aminolevulínico / isoleucina / leucina

Obsérvese que cada una de estas especies (así como la hidroxiprolina) hace una contribución al pico de 132,3. Esta es una razón por la cual las concentraciones de sustrato, tales como las concentraciones de ácido 5-aminolevulínico se minimizan ventajosamente. Por lo tanto, cuanto menos ácido 5-aminolevulínico se usa en la muestra multiplex, su presencia será "inflará" menos el pico de 132,3. Las técnicas anteriores suelen utilizar aproximadamente 20 veces  
40 más sustrato como se enseña en este documento y, por lo tanto, no se observarían los efectos y no se podrían observar en los procedimientos de la técnica anterior. Adecuadamente, se utiliza sustrato ácido 5-aminolevulínico 50  $\mu\text{M}$ .

Las exploraciones demuestran que es posible establecer el diagnóstico de MSUD. Como se señaló anteriormente, la señal también incluye alguna contribución del ácido 5-aminolevulínico, pero esto se minimiza ventajosamente mediante el uso de la transición de leucina de alta energía de colisión como lectura. En cualquier caso, se  
45 demuestra que el enfoque de la exploración funcionará incluso en esta situación de multiplexado.

En la mayoría de los laboratorios de detección selectiva de recién nacidos en todo el mundo se realice una exploración de pérdida neutra para los aminoácidos (la mayoría usan muestras butilada pero muestras sin derivatizar y la pérdida neutra  $m/z$  46, también son utilizables como se muestra en estos ejemplos) y una  
50 exploración de iones precursores del producto  $m/z$  85 para acilcarnitinas (mismo comentario que en la butilación excepto que el ion del producto  $m/z$  85 es el mismo para las butiladas y sin derivatizar).

Preferiblemente se usan MRM. Sin embargo, lo anterior ilustra cómo la invención se puede aplicar en forma multiplexada incluso con diversas lecturas alternativas que puede seleccionar el operador.

Análisis multiplexado: Val

55 Esto demuestra el aumento de la señal de valina en respuesta a la incubación con tripsina (no la mancha antigua de un paciente de MSUD). Obsérvese que los isótopos estables no se ven afectados. Esto también demuestra el

incremento de las señales, valina y el patrón interno isótopo estable (aumento de la ionización), en metanol.

Las cuestiones relativas al envejecimiento de la muestra hacen que la identificación del paciente con MSUD sea difícil. Sin embargo, la linealidad de la curva patrón y los valores de control indican la validez del sistema en muestras contemporáneas.

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Muestra	Analito	Analito	Analito	Analito	Analito	Analito	Proporción del área		Proporción del área
									Sin tripsina	Tripsina	
Mancha blanco	Sin tripsina	Desconocido	N/A	172000	153000	191000	Tripsina	Tripsina	0,188	0,188	Tripsina
Pat, 1	Sin tripsina	Desconocido	N/A	913000	1410000	1630000	0	Tripsina	3,560	1,940	Tripsina
Pat, 2	Sin tripsina	Desconocido	N/A	942000	1580000-	2300000	2360000	Tripsina	4,240	2,610	Tripsina
Pat, 3	Sin tripsina	Desconocido	N/A	984000	1190000	1610000	2020000	Sin tripsina	2,510	1,810	Tripsina
QC1	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1020000	1630000	2240000	2980000	Tripsina	4,170	2,380	Tripsina
QC2	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1050000	1420000	1900000	2220000	Sin tripsina	3,190	2,180	Tripsina
Pat, de MSUD	Sin tripsina	Estándar	522	1330000	1990000	2840000	2950000	Tripsina	5,250	3,240	Tripsina
MSUD QC L	Sin tripsina	Estándar	200	779000	1310000	1660000	2060000	Tripsina	3,240	1,880	Tripsina
MSUD QC H	Sin tripsina	Desconocido	N/A	2130000	2610000	4000000	4870000	Sin tripsina	6,730	4,760	Tripsina
Control	Sin tripsina	Desconocido	N/A	911000	1990000	2260000	3600000	Tripsina	5,490	2,560	Tripsina
Control	Sin tripsina	Desconocido	N/A	935000	2230000	2420000	4440000	Sin tripsina	6,380	2,710	Tripsina
Control +SA	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1090000	2150000	2240000	4790000	Tripsina	5,980	2,620	Tripsina
Control +SA	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1080000	1910000	2310000	4230000	Sin tripsina	5,360	2,600	Tripsina
Control lavado	Sin tripsina	Desconocido	N/A	809000	1100000	1540000	2000000	Tripsina	2,510	1,720	Tripsina
Control lavado	Sin tripsina	Desconocido	N/A	746000	1170000	1750000	1840000	Sin tripsina	2,420	1,980	Tripsina
MCADD CDC	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1090000	2100000	2640000	4260000	Tripsina	6,390	3,050	Tripsina
MCADD CDC	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1020000	2150000	2380000	4240000	Sin tripsina	6,310	2,870	Tripsina
PKU NEW	Sin tripsina	Desconocido	N/A	941000	1550000	1880000	2630000	Tripsina	3,630	2,070	Tripsina
PKU NEW	Sin tripsina	Desconocido	N/A	969000	1650000	1860000	3060000	Sin tripsina	3,670	2,360	Tripsina
MSUD	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1830000	1770000	2300000	2070000	Tripsina	3,520	2,580	Tripsina
MSUD	Sin tripsina	Desconocido	N/A	1630000	1830000	2320000	2460000	Sin tripsina	3,530	2,640	Tripsina
AS	Sin tripsina	Desconocido	N/A	710000	827000	1190000	1240000	Tripsina	1,590	1,350	Tripsina
AC	Sin tripsina	Desconocido	N/A	792000	794000	1090000	1220	Sin tripsina	1,280	1,220	Tripsina
AA	Sin tripsina	Desconocido	N/A	775000	871000	1160000	1,570	Tripsina	1,710	1,420	Tripsina

Nombre de la muestra	Nombre del pico IS	Área del pico IS (Recuentos)		Área del pico IS (Recuentos)	Concentración calculada (µmol/l)		Concentración calculada (µmol/l)	
		Sin disolvente de rec- tripsina	Disolvente de rec. - tripsina		Sin tripsina- metanol	Tripsina- metanol		
Mancha blanco	D8Val	927000	818000	1040000	967000	< 0	< 0	No
Pat. 1	D8Val	392000	396000	836000	760000	293,0	216,0	235,0
Pat. 2	D8Val	376000	374000	880000	743000	339,0-	375,0	500,0
Pat. 3	D8Val	461000	475000	885000	726000	241,0	185,0	135,0
QC1	D8Val	400000	390000	941000	732000	349,0	318,0	539,0
QC2	D8Val	440000	444000	870000	750000	310,0	272,0	188,0
MSUD Pat.	D8Val	418000	379000	877000	734000	522,0	522,0	522,0
MSUD QC L	D8Val	394000	402000	886000	688000	200,0	200,0	200,0
MSUD QC H	D8Val	398000	387000	839000	727000	1090,0	884,0	1360,0
Control	D8Val	366000	361000	881000	725000	335,0	363,0	813,0
Control	D8Val	342000	350000	895000	746000	400,0	396,0	1120,0
Control +SA	D8Val	361000	359000	854000	748000	478,0	377,0	1260,0
Control +SA	D8Val	364000	356000	888000	748000	461,0	371,0	1030,0
Control lavado	D8Val	468000	437000	891000	757000	134,0	164,0	89,1
Control lavado	D8Val	457000	483000	888000	759000	108,0	223,0	21,9
MCADD CDC	D8Val	347000	329000	865000	728000	505,0	478,0	1090,0
MCADD CDC	D8Val	322000	340000	829000	732000	512,0	435,0	1080,0
PKU NEW	D8Val	411000	427000	906000	739000	282,0	247,0	378,0
PKU NEW	D8Val	402000	449000	788000	672000	314,0	314,0	690,0
MSUD	D8Val	547000	504000	889000	709000	561,0	367,0	1,77,0
MSUD	D8Val	628000	521000	880000	706000	365,0	381,0	355,0
AS	D8Val	523000	520000	878000	803000	35,4	75,7	< 0
AC	D8Val	652000	621000	895000	< 0	< 0	43,6	< 0
AA	D8Val	493000	510000	820000	92,9	< 0	90,4	< 0

Las exploraciones en las figuras 1-8 muestran cómo podrían usarse las proporciones para establecer el diagnóstico incluso en muestras muy antiguas como se ha explicado anteriormente bajo el encabezado "Leu". Adicionalmente, se puede usar la proporción Val-Phe (véase más adelante).

Análisis multiplexado: Leu-Phe

- 5 Obsérvese que el uso de la proporción de la señal leucina / fenilalanina identifica fácilmente al paciente de MSUD,

Nombre de la muestra	Área del pico del analito	Área del pico del analito	Proporción Leu/Phe
	(Recuentos)	(Recuentos)	
	Disolvente de rec. -tripsina	Disolvente de rec. -tripsina	
Mancha en blanco	54100	53300	1,02
Pat. 1	147000	559000	0,26
Pat. 2	154000	1460000	0,11
Pat. 3	161000	3070000	0,05
QC1	164000	776000	0,21
QC2	175000	1540000	0,11
MSUD Pat.	196000	475000	0,41
MSUD QCL	141000	463000	0,30
MSUD QC H	228000	479000	0,48
Control	206000	584000	0,35
Control	220000	618000	0,36
Control +SA	219000	636000	0,34
Control +SA	192000	597000	0,32
Control lavado	125000	445000	0,28
Control lavado	128000	478000	0,27
MCADD CDC	243000	748000	0,32
MCADD CDC	243000	746000	0,33
PKU NEW	181000	1140000	0,16
PKU NEW	208000	1190000	0,17
<b>MSUD</b>	<b>216000</b>	<b>329000</b>	<b>0,66</b>
<b>MSUD</b>	<b>223000</b>	<b>339000</b>	<b>0,66</b>
AS	89000	301000	0,30
AC	103000	406000	0,25
AA	86900	315000	0,28

La proporción de la concentración puede variar ligeramente debido a problemas de precisión con bajas concentraciones de fenilalanina.

- 10 En teoría, en la práctica, y a partir de las exploraciones y los datos presentados en este documento, la proporción de leucina / alanina discriminará mejor y por lo tanto se prefiere para MSUD.

Análisis multiplexado: Val-Phe

Obsérvese que el uso de la proporción de la señal valina / fenilalanina identifica fácilmente al paciente de MSUD:

Nombre de la muestra	Área del pico del analito	Área del pico del analito	Proporción Val/Phe
	(Recuentos)	(Recuentos)	
	Disolvente de rec. -tripsina	Disolvente de rec. -tripsina	
Mancha en blanco	153000	53300	2,87
Pat. 1	1410000	559000	2,52
Pat. 2	1580000	1460000	1,08
Pat. 3	1190000	3070000	0,39
QC1	1630000	776000	2,10
QC2	1420000	1540000	0,92
Pat. de MSUD	1990000	475000	4,19
MSUD QCL	1310000	463000	2,83
MSUD QC H	2610000	479000	5,45

Nombre de la muestra	Área del pico del analito (Recuentos) Disolvente de rec. -tripsina	Área del pico del analito (Recuentos) Disolvente de rec. -tripsina	Proporción Val/Phe
Control	1990000	584000	3,41
Control	2230000	618000	3,61
Control +SA	2150000	636000	3,38
Control +SA	1910000	597000	3,20
Control lavado	1100000	445000	2,47
Control lavado	1170000	478000	2,45
MCADD CDC	2100000	748000	2,81
MCADD CDC	2150000	746000	2,88
PKUNEW	1550000	1140000	1,36
PKU NEW	1650000	1190000	1,39
MSUD	1770000	329000	5,38
MSUD	1830000	339000	5,40
AS	827000	301000	2,75
AC	794000	406000	1,96
AA	871000	315000	2,77

La proporción de la concentración puede variar debido a problemas de precisión con bajas concentraciones de fenilalanina.

5 En teoría, en la práctica, y como se muestra a partir de las exploraciones, la proporción de valina / alanina proporciona otro discriminante sólido.

10 Hay que tener en cuenta que, como se ha indicado anteriormente, en estos ejemplos particulares las muestras de MSUD son mucho más antiguas que las demás y, por tanto, presentan menos liberación relacionada con la proteasa. Como se ha demostrado con creces, los procedimientos de la invención siguen siendo herramientas diagnósticas sólidas con una excelente discriminación incluso cuando se produce una iteración elevada por la acción de la proteasa. De hecho esto se demuestra mediante los conjuntos de datos presentados en los ejemplos anteriores.

**Ejemplo 3: biotinidasa con Biotina / PABA multiplexada**

Manchas de sangre incubadas con biotinil PABA (aprox. 50 µmol / l) y ácido 5 –aminolevulínico (50 µmol/l)

15 Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Los inventores plantearon la pregunta: ¿Medir la biotina o PABA discrimina entre el control y la deficiencia de biotinidasa?

También abordaron las preguntas: ¿¿Puede la proporción producto / sustrato usarse para la diferenciación?

¿Cómo se compara la actividad de control de los adultos con la de una reciente muestra de recién nacido?

20 ¿Es la actividad medible en muestras antiguas y muestras recogidas en EDTA?

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Area del pico del analito (Recuentos)
Control	Biot PABA	Desconocido	Biotina	75600
Control	Biot PABA	Desconocido	Biotina	70900
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Biotina	69300
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Biotina	69200
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Biotina	23400
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Biotina	20300
Control	Biot PABA	Desconocido	PABA	45100
Control	Biot PABA	Desconocido	PABA	45100
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	PABA	47900
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	PABA	44700
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	PABA	1950

Control lavado	Biot PABA	Desconocido	PABA	1210
----------------	-----------	-------------	------	------

Conclusiones:

La señal de biotina en la muestra de control adulto es solo 3,5 veces la señal en la muestra de deficiencia de biotinidasa, véanse las filas 1,2 y 5,6 (resaltado en negrita y subrayadas).

- 5 La señal de PABA en la muestra de control adulto es 30 veces la señal en la muestra de deficiencia de biotinidasa, véanse las filas 7,8 y 11,12 (resaltado en negrita y en cursiva).

La señal de biotina más baja, en la muestra de MCADD, no es significativamente diferente de la de la muestra de deficiencia de biotinidasa. La señal de PABA más baja, en la muestra de MCADD, todavía es 5 veces la de la muestra de deficiencia de biotinidasa. Por tanto, PABA es un analito preferido.

- 10 Obsérvese que hay una señal de biotina altamente significativa en la mancha en blanco incubada con sustrato, lo que implica una mala proporción señal: ruido. Obsérvese que hay una señal virtualmente no medible de PABA en la mancha en blanco incubada con sustrato, lo que implica una muy alta proporción señal: ruido. Por tanto, de nuevo, PABA es un analito preferido.

- 15 La proporción PABA PABA / biotini /PABA proporciona una mayor discriminación, 35. veces. La actividad de la biotinidasa es medible en muestras antiguas y en las muestras de EDTA (aunque hay un grado de deterioro de la muestra en las muestras antiguas).

Un sustrato preferido es biocitina, ya que es el sustrato natural y porque normalmente está menos contaminado con biotina que otros sustratos.

**Ejemplo 4: PBG sintasa multiplexado**

- 20 Manchas de sangre incubadas con agua, biocitina (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l) y biotiniPABA (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l). Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Se usaron dos MRM para medir el porfobilinógeno.

- 25 Pregunta principal: ¿La medición de porfobilinógeno discrimina entre el control y la tirosinemia de tipo 1 (la succinilacetona inhibe la actividad de la porfobilinógeno sintasa)?

Preguntas secundarias: ¿Qué MRM de porfobilinógeno es mejor?

¿¿Puede la proporción producto / sustrato usarse para la diferenciación?

¿Cómo se compara la actividad de control de los adultos con la de una reciente muestra de recién nacido?

¿Es la actividad medible en muestras antiguas y muestras recogidas en EDTA?

- 30 ¿Hay alguna diferencia en la actividad de la PBG sintasa usando biocitina o biotiniPABA para medir la actividad de biotinidasa al mismo tiempo?

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Área del pico del analito (Recuentos)
Control	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno	58800
Control	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno	62500
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno	3970
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno	3810
Control	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno	61600
Control	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno	56900
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno	4680
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno	4220
Control	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno 2	32900
Control	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno 2	36400
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno 2	1910
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Porfobilinógeno 2	2400
Control	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno 2	36500
Control	Blot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno 2	33200
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Porfobilinógeno 2	1540

Control +SA      Biot PABA      Desconocido      Porfobilinógeno 2      1940

Conclusiones:

5 La señal de porfobilinógeno en la muestra de control de adulto es 15 veces la señal en la muestra de tirosinemia de tipo 1 (más que la mancha de sangre en blanco), véase resaltado en negrita La señal de porfobilinógeno más baja en cualquiera de las otras muestras sin EDTA sigue siendo 2 veces la señal en la muestra de tirosinemia de de tipo 1.

Obsérvese que no hay prácticamente ninguna señal de porfobilinógeno medible en la mancha en blanco incubada con sustrato, implica alguna actividad residual en la muestra de tirosinemia de tipo 1.

10 La MRM de 227,3 / 122,1 es más sensible pero la proporción señal: ruido no es mejor que 227,3 / 94,0. Implica que es posible pero 227,3 / 122,1 es preferible debido a la mayor señal.

La proporción producto / sustrato proporciona ligeramente mayor discriminación, -15 -a 20 veces. La muestra de recién nacido reciente es del paciente con FCU y la actividad es de aproximadamente 60 - 70% de la actividad del adulto pero todavía altamente discriminatoria.

15 La actividad de PBG sintasa es medible en muestras antiguas, (pero probablemente no en muestras de EDTA), aunque es casi seguro que algún grado de deterioro de la muestra en las muestras antiguas.

No hay diferencia entre sustratos de la biotinidasa.

#### Ejemplo 5: Hbs multiplexada

20 Manchas de sangre incubadas con agua, biocitina (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l) y biotinII PABA (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l). Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Pregunta principal: ¿La multiplexación, mediante la inclusión de los sustratos enzimáticos y de la incubación, afecta a la capacidad de detectar el péptido de la enfermedad falciforme?

Pregunta secundaria: ¿Hay alguna diferencia, en particular con respecto a la supresión de iones, entre los sustratos?

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Muestra Tipo	Nombre del pico del analito	Área del pico del analito (recuentos)	Intervalos de masa del analito (uma)	Proporción del área
AS	Agua	Desconocido	Falciforme	<b>91800</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,050</b>
AS	Agua	Desconocido	Falciforme	<b>92600</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,040</b>
AS	Biocitina	Desconocido	Falciforme	<b>103000</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,060</b>
AS	Biocitina	Desconocido	Falciforme	<b>108000</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,030</b>
AS	Biot PABA	Desconocido	Falciforme	<b>107000</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,050</b>
AS	Biot PABA	Desconocido	Falciforme	<b>104000</b>	461,9/472,4 uma	<b>1,110</b>

25

Conclusiones:

30 La señal falciforme en la muestra de HbAS de adulto es aproximadamente 100 veces la señal en otras muestras en agua o bien sustrato, véase resaltado en negrita (AS = heterocigoto). No hay diferencia entre los sustratos de la biotinidasa para los péptidos falciformes o de tipo salvaje. Por tanto, el análisis multiplexado es sorprendentemente adecuado para el diagnóstico de hemoglobinopatías también. Cuando los sustratos están presentes y se realizan las incubaciones para las actividades enzimáticas que se van a analizar, no hay perjuicio para el diagnóstico de hemoglobinopatía multiplexado simultáneo, es decir, ningún efecto sobre las señales o en la discriminación.

35 Lo mismo se ha realizado para Hbc, HbDPunjab, HbOarab, HbE, deltaLepore y HbF y todos ellos funcionan bien y no hay efectos de fondo . NB HbF MCADD era un bebé, por lo que esta es la razón se observó una gran cantidad de HbF para esa muestra.)

#### Ejemplo 6: Biotinidasa con Biocitina / biotina multiplexado

Manchas de sangre incubadas con agua y biocitina (50 µmol / l) y ácido 5 –aminolevulínico (50 µmol/l).

Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Pregunta principal: ¿Medir la biotina discrimina entre el control y la deficiencia de biotinidasa?

5 Preguntas secundarias: ¿¿Puede la proporción producto / sustrato usarse para la diferenciación? ¿Cómo se compara la actividad de control de los adultos con la de una reciente muestra de recién nacido?

¿Es la actividad medible en muestras antiguas y muestras recogidas en EDTA?

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Área del pico del analito (Recuentos)	Intervalos de la masa del analito (uma)	Proporción del área
Control	Biocitina	Desconocido	Biotina	<b>86500 uma</b>	244,6/227,0	<b>0,203</b>
Control	Biocitina	Desconocido	Biotina	<b>105000 uma</b>	244,6/227,0	<b>0,221</b>
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Biotina	103000 uma	244,6/227,0	0,265
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Biotina	102000 uma	244,6/227,0	0,223
Control lavado	Biocitina	Desconocido	Biotina	<b>1950 uma</b>	244,6/227,0	<b>0,003</b>
lavadoControl	Biocitina	Desconocido	Biotina	<b>1800 uma</b>	244,6/227,0	<b>0,003</b>

Conclusiones:

10 La señal de vitrina en la muestra de control de adulto es 45 veces la señal en la muestra de deficiencia de biotinidasa (igual que la mancha de sangre en blanco), véase resaltado en negrita La señal de biotina más baja en cualquiera de las otras muestras sin EDTA sigue siendo 8 veces la señal en la muestra de deficiencia de biotinidasa.

Obsérvese que hay una señal virtualmente no medible de biotina en la mancha en blanco incubada con sustrato, lo que muestra una muy alta proporción señal: ruido.

15 Como era de esperar, la proporción producto / sustrato ofrece mayores tiempos de discriminación 73. La muestra de recién nacido reciente es del paciente con FCU y la actividad no es significativamente menor (la actividad puede ser menor en los bebés prematuros, pero todavía da una buena discriminación).

La actividad de biotinidasa es medible en muestras antiguas y en las muestras de EDTA, aunque es casi seguro que algún grado de deterioro de la muestra en las muestras antiguas. Lavado significa glóbulos rojos lavados (la biotinidasa se encuentra en el plasma), para equivalencia de plasma de un paciente con deficiencia de biotinidasa se añade bock, por lo que está libre de biotinidasa.

## 20 Ejemplo 7: PKU multiplexado

Manchas de sangre incubadas con agua, biocitina (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l) y biotiniPABA (50 µmol/l) y ácido 5-aminolevulínico (50 µmol/l). Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Pregunta principal: ¿Se puede medir la fenilalanina suficientemente bien para detectar fenilcetonuria?

25 ¿Es el procedimiento verdaderamente cuantitativo?

¿Afecta la adición de mezcla de sustrato de la enzima a la señal de fenilalanina?

Obsérvense los resultados calculados a partir de patrones en la mezcla de biocitina

Los datos de FCU multiplex se muestran en la siguiente tabla:

<b>Nombre de la muestra</b>	<b>ID de la muestra</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Nombre del pico del analito (Recuentos)</b>	<b>Área del pico del analito</b>	<b>Concentración del analito</b>	<b>Intervalos de la masa del analito (uma)</b>	<b>Proporción del área</b>	<b>Nombre del pico IS</b>	<b>Área del pico IS para DAD (mAU x min)</b>	<b>Intervalos de la masa de IS (uma)</b>	<b>Concentración calculada (µmol/l)</b>
Mancha en blanco	Agua	Desconocido	Fenilalanina	33400	N/A	165,9/120,1 uma	0,02	D5 Phe	1640000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
Pat. 1	Agua	Estándar	Fenilalanina	545000	61,8	165,9/120,1 uma	0,82	D5 Phe	667000 N/A	170,9/125,1 uma	54,70
Pat. 2	Agua	Estándar	Fenilalanina	1580000	568	165,9/120,1 uma	2,68	D5 Phe	589000 N/A	170,9/125,1 uma	557,00
Pat. 3	Agua	Estándar	Fenilalanina	3230000	1130	165,9/120,1 uma	4,81	D5 Phe	672000 N/A	170,9/125,1 uma	1130,00
QC1	Agua	Desconocido	Fenilalanina	756000	N/A	165,9/120,1 uma	1,27	D5 Phe	597000 N/A	170,9/125,1 uma	176,00
QC2	Agua	Desconocido	Fenilalanina	1650000	N/A	165,9/120,1 uma	2,57	D5 Phe	644000 N/A	170,9/125,1 uma	527,00
Control	Agua	Desconocido	Fenilalanina	719000	N/A	165,9/120,1 uma	1,40	D5 Phe	515000 N/A	170,9/125,1 uma	211,00
Control	Agua	Desconocido	Fenilalanina	635000	N/A	165,9/120,1 uma	1,22	D5 Phe	519000 N/A	170,9/125,1 uma	164,00
Control +SA	Agua	Desconocido	Fenilalanina	662000	N/A	165,9/120,1 uma	1,22	D5 Phe	543000 N/A	170,9/125,1 uma	163,00
Control +SA	Agua	Desconocido	Fenilalanina	624000	N/A	165,9/120,1 uma	1,17	D5 Phe	534000 N/A	170,9/125,1 uma	150,00
Control lavado	Agua	Desconocido	Fenilalanina	581000	N/A	165,9/120,1 uma	0,78	D5 Phe	744000 N/A	170,9/125,1 uma	45,20
Control lavado	Agua	Desconocido	Fenilalanina	530000	N/A	165,9/120,1 uma	0,83	D5 Phe	639000 N/A	170,9/125,1 uma	58,30
MCADD	Agua	Desconocido	Fenilalanina	404000	N/A	165,9/120,1 uma	0,72	D5 Phe	563000 N/A	170,9/125,1 uma	28,10
MCADD	Agua	Desconocido	Fenilalanina	331000	N/A	165,9/120,1 uma	0,49	D5 Phe	678000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
PKU	Agua	Desconocido	Fenilalanina	4790000	N/A	165,9/120,1 uma	10,20	D5 Phe	471000 N/A	170,9/125,1 uma	2580,00
PKU	Agua	Desconocido	Fenilalanina	4790000	N/A	165,9/120,1 uma	9,24	D5 Phe	519000 N/A	170,9/125,1 uma	2320,00
MSUD	Agua	Desconocido	Fenilalanina	375000	N/A	165,9/120,1 uma	0,49	D5 Phe	763000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
MSUD	Agua	Desconocido	Fenilalanina	302000	N/A	165,9/120,1 uma	0,42	D5 Phe	718000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Agua	Desconocido	Fenilalanina	309000	N/A	165,9/120,1 uma	0,42	D5 Phe	728000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Agua	Desconocido	Fenilalanina	302000	N/A	165,9/120,1 uma	0,40	D5 Phe	758000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Agua	Desconocido	Fenilalanina	461	N/A	165,9/120,1 uma	0,48	D5 Phe	951000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Agua	Desconocido	Fenilalanina	470000	N/A	165,9/120,1 uma	0,51	D5 Phe	922000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Agua	Desconocido	Fenilalanina	343000	N/A	165,9/120,1 uma	0,47	D5 Phe	735000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Agua	Desconocido	Fenilalanina	271000	N/A	165,9/120,1 uma	0,42	D5 Phe	652000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
Mancha en blanco	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	71900	N/A	165,9/120,1 uma	0,05	D5 Phe	1460000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0

Pat. 1	Biocitina	Estándar	Fenilalanina	550000	61,81	165,9/120,1 uma	0,84	D5 Phe	659000 N/A	170,9/125,1 uma	59,70
Pat. 2	Biocitina	Estándar	Fenilalanina	1660000	568	165,9/120,1 uma	2,86	D5 Phe	580000 N/A	170,9/125,1 uma	605,00
Pat. 3	Biocitina	Estándar	Fenilalanina	3130000	1130	165,9/120,1 uma	4,68	D5 Phe	668000 N/A	170,9/125,1 uma	1100,00
QC1	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	809000	N/A	165,9/120,1 uma	1,42	D5 Phe	571000 N/A	170,9/125,1 uma	217,00
QC2	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	1660000	N/A	165,9/120,1 uma	2,64	D5 Phe	628000 N/A	170,9/125,1 uma	545,00
Control	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	681000	N/A	165,9/120,1 uma	1,26	D5 Phe	539000 N/A	170,9/125,1 uma	175,00
Control	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	693000	N/A	165,9/120,1 uma	1,24	D5 Phe	560000 N/A	170,9/125,1 uma	168,00
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	685000	N/A	165,9/120,1 uma	1,42	D5 Phe	484000 N/A	170,9/125,1 uma	216,00
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	682000	N/A	165,9/120,1 uma	1,20	D5 Phe	550000 N/A	170,9/125,1 uma	159,00
Control lavado	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	486000	N/A	165,9/120,1 uma	0,75	D5 Phe	651000 N/A	170,9/125,1 uma	36,20
Control lavado	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	516000	N/A	165,9/120,1 uma	0,81	D5 Phe	635000 N/A	170,9/125,1 uma	53,60
MCADD	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	450000	N/A	165,9/120,1 uma	0,89	D5 Phe	509000 N/A	170,9/125,1 uma	73,20
MCADD	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	422000	N/A	165,9/120,1 uma	0,80	D5 Phe	526000 N/A	170,9/125,1 uma	51,00
PKU	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	4880000	N/A	165,9/120,1 uma	9,68	D5 Phe	504000 N/A	170,9/125,1 uma	2440,00
PKU	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	4800000	N/A	165,9/120,1 uma	9,35	D5 Phe	513000 N/A	170,9/125,1 uma	2350,00
MSUD	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	331000	N/A	165,9/120,1 uma	0,43	D5 Phe	765000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
MSUD	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	308000	N/A	165,9/120,1 uma	0,39	D5 Phe	799000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	319000	N/A	165,9/120,1 uma	0,47	D5 Phe	679000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	317000	N/A	165,9/120,1 uma	0,46	D5 Phe	685000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	459000	N/A	165,9/120,1 uma	0,56	D5 Phe	817000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	499000	N/A	165,9/120,1 uma	0,55	D5 Phe	903000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	336000	N/A	165,9/120,1 uma	0,52	D5 Phe	645000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Biocitina	Desconocido	Fenilalanina	317000	N/A	165,9/120,1 uma	0,52	D5 Phe	604000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
MSUD Pat.	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	432000	N/A	165,9/120,1 uma	0,69	D5 Phe	624000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
MSUD LQC	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	471000	N/A	165,9/120,1 uma	0,76	D5 Phe	624000 N/A	170,9/125,1 uma	21,60
MSUD HQC	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	452000	N/A	165,9/120,1 uma	0,86	D5 Phe	523000 N/A	170,9/125,1 uma	38,40
Mancha blanco	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	76900	N/A	165,9/120,1 uma	0,05	D5 Phe	1500000 N/A	170,9/125,1 uma	67,70
Pat. 1	Biot PABA	Estándar	Fenilalanina	596000	61,81	165,9/120,1 uma	1,07	D5 Phe	588000 N/A	170,9/125,1 uma	123,00
Pat. 2	Biot PABA	Estándar	Fenilalanina	1840000	568	165,9/120,1 uma	3,49	D5 Phe	528000 N/A	170,9/125,1 uma	775,00

Pat. 3	Biot PABA	Estándar	Fenilalanina	3310000	1130	165,9/120,1 uma	4,85	D5 Phe	681000 N/A	170,9/125,1 uma	1140,00
QC1	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	869000	N/A	165,9/120,1 uma	1,54	D5 Phe	565000 N/A	170,9/125,1 uma	249,00
QC2	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	1830000	N/A	165,9/120,1 uma	2,94	D5 Phe	623000 N/A	170,9/125,1 uma	627,00
Control	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	747000	N/A	165,9/120,1 uma	1,49	D5 Phe	501000 N/A	170,9/125,1 uma	236,00
Control	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	746000	N/A	165,9/120,1 uma	1,50	D5 Phe	498000 N/A	170,9/125,1 uma	239,00
Control + SA	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	692000	N/A	165,9/120,1 uma	1,34	D5 Phe	518000 N/A	170,9/125,1 uma	195,00
Control + SA	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	721000	N/A	165,9/120,1 uma	1,45	D5 Phe	497000 N/A	170,9/125,1 uma	225,00
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	525000	N/A	165,9/120,1 uma	0,83	D5 Phe	634000 N/A	170,9/125,1 uma	58,00
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	554000	N/A	165,9/120,1 uma	0,86	D5 Phe	643000 N/A	170,9/125,1 uma	67,00
MCADD	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	447000	N/A	165,9/120,1 uma	0,82	D5 Phe	545000N/A	170,9/125,1 uma	55,80
MCADD	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	451000	N/A	165,9/120,1 uma	0,76	D5 Phe	591000N/A	170,9/125,1 uma	40,30
PKU	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	4820000	N/A	165,9/120,1 uma	9,64	D5 Phe	500000 N/A	170,9/125,1 uma	2430,00
PKU	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	5040000	N/A	165,9/120,1 uma	9,84	D5 Phe	513000 N/A	170,9/125,1 uma	2480,00
MSUD	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	346000	N/A	165,9/120,1 uma	0,43	D5 Phe	806000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
MSUD	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	377000	N/A	165,9/120,1 uma	0,52	D5 Phe	729000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	338000	N/A	165,9/120,1 uma	0,48	D5 Phe	705000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AS	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	306000	N/A	165,9/120,1 uma	0,44	D5 Phe	694000N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	448000	N/A	165,9/120,1 uma	0,51	D5 Phe	877000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AC	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	480000	N/A	165,9/120,1 uma	0,57	D5 Phe	848000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	330000	N/A	165,9/120,1 uma	0,51	D5 Phe	644000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0
AA	Biot PABA	Desconocido	Fenilalanina	325000	N/A	165,9/120,1 uma	0,52	D5 Phe	623000 N/A	170,9/125,1 uma	< 0

Conclusiones:

La muestra del paciente se identifica muy fácilmente. Es un valor alto, pero la discriminación (señal, proporción o concentración) es excelente.

- 5 El procedimiento parece ser altamente cuantitativo, la linealidad, la precisión y los resultados de CC son excelentes. El fondo de de tripsina significa que la curva patrón no pasa por cero.

La concentración de fenilalanina del paciente se mide como se ha indicado anteriormente.

Sin embargo, los patrones y QC se realizaron al mismo tiempo. El alto valor en el control y los niveles bajos (medidos <0) en las muestras más antiguas pueden indicar un problema de elución leve.

- 10 En la práctica, todas las muestras analizadas se habrán tomado, preferentemente, en el plazo de 1 semana. No hay efectos de los sustratos en las señales.

**Ejemplo 8: MCADD multiplexado**

- 15 Manchas de sangre incubadas con agua, biocitina (50  $\mu\text{mol/l}$ ) y ácido 5-aminolevulínico (50  $\mu\text{mol/l}$ ) y biotinIIIPABA (50  $\mu\text{mol/l}$ ) y ácido 5-aminolevulínico (50  $\mu\text{mol/l}$ ). Proceso analítico completo para la actividad enzimática, péptidos diagnósticos de hemoglobinopatías tras la digestión con tripsina, y los metabolitos.

Pregunta principal: ¿Se puede medir la octanoilcarnitina suficientemente bien para detectar MCADD?

¿Es el procedimiento verdaderamente cuantitativo?

¿Afecta la adición de la mezcla de sustrato de la enzima a la señal de fenilalanina? Obsérvese los resultados calculados a partir de los patrones en la mezcla de biocitina.

- 20 Dtos de MCADD multiplexado en la tabla a continuación:

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico del analito	Área del pico del analito (Recuentos)	Concentración del analito		Proporción del área del pico IS	Nombre del pico IS	Área del pico IS para DAD (mAU x min)	Intervalos de la masa de IS (uma)	Concentración calculada (µmol/l)
					Intervalos de la masa del analito (uma)	Intervalos de la masa de IS (uma)					
Mancha en blanco	Agua	Desconocido	Octanoilcarnitina	1410	N/A	288,1/85,3 uma	0,03	D3 C8	56200 N/A	291,1/85,3 uma	< 0
Pat. 1	Agua	Estándar	Ornitilcarnitina	29700	2,9	288,1/85,3 uma	0,82	D3 C8	36300 N/A	291,1/85,3 uma	2,60
Pat. 2	Agua	Estándar	Ornitilcarnitina	6960	0,5	288,1/85,3 uma	0,21	D3 C8	32600 N/A	291,1/85,3 uma	0,47
Pat. 3	Agua	Estándar	Ornitilcarnitina	4180	0,16	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C8	35600 N/A	291,1/85,3 uma	0,13
QC1	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	6310	N/A	288,1/85,3 uma	0,19	D3 C8	32800 N/A	291,1/85,3 uma	0,40
QC2	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	14500	N/A	288,1/85,3 uma	0,44	D3 C8	33200 N/A	291,1/85,3 uma	1,25
Control	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	1790	N/A	288,1/85,3 uma	0,06	D3 C8	27700 N/A	291,1/85,3 uma	< 0
Control	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2580	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C8	28100 N/A	291,1/85,3 uma	0,04
Control +SA	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2740	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C8	27900 N/A	291,1/85,3 uma	0,07
Control +SA	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2700	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C8	27400 N/A	291,1/85,3 uma	0,07
Control lavado	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	3840	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C8	33500 N/A	291,1/85,3 uma	0,12
Control lavado	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	4020	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C8	33100 N/A	291,1/85,3 uma	0,15
MCADD	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	5630	N/A	288,1/85,3 uma	0,19	D3 C8	29000 N/A	291,1/85,3 uma	0,40
MCADD	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	5210	N/A	288,1/85,3 uma	0,18	D3 C8	29300 N/A	291,1/85,3 uma	0,35
PKU	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2000	N/A	288,1/85,3 uma	0,07	D3 C8	28600 N/A	291,1/85,3 uma	< 0
PKU	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2620	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C8	26400 N/A	291,1/85,3 uma	0,07
MSUD	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	4650	N/A	288,1/85,3 uma	0,13	D3 C8	36900 N/A	291,1/85,3 uma	0,16
MSUD	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	4040	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C8	34900 N/A	291,1/85,3 uma	0,13
AS	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2910	N/A	288,1/85,3 uma	0,08	D3 C8	35900 N/A	291,1/85,3 uma	0,00
AS	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	3020	N/A	288,1/85,3 uma	0,08	D3 C8	35900 N/A	291,1/85,3 uma	0,02
AC	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	4570	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C8	45300 N/A	291,1/85,3 uma	0,08
AC	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	5610	N/A	288,1/85,3 uma	0,13	D3 C8	43600 N/A	291,1/85,3 uma	0,17
AA	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	2890	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C8	33300 N/A	291,1/85,3 uma	0,02
AA	Agua	Desconocido	Ornitilcarnitina	3030	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C8	29100 N/A	291,1/85,3 uma	0,09
Mancha en blanco	Biocitina	Desconocido	Octanoilcarnitina	1210	N/A	288,1/85,3 uma	0,02	D3 C8	49300 N/A	291,1/85,3 uma	< 0

Pat. 1	Biocitina	Standard	Ornitoilcarnitina	31900	2,9	288,1/85,3 uma	0,92	D3 C9	34700 N/A	291,1/85,3 uma	2,95
Pat. 2	Biocitina	Standard	Ornitoilcarnitina	6230	0,52	288,1/85,3 uma	0,20	D3 C10	30900 N/A	291,1/85,3 uma	0,43
Pat. 3	Biocitina	Standard	Ornitoilcarnitina	4260	0,16	288,1/85,3 uma	0,13	D3 C11	32600 N/A	291,1/85,3 uma	0,18
QC1	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	6980	N/A	288,1/85,3 uma	0,22	D3 C12	31200 N/A	291,1/85,3 uma	0,51
QC2	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	16300	N/A	288,1/85,3 uma	0,48	D3 C13	34100 N/A	291,1/85,3 uma	1,40
Control	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	2570	N/A	288,1/85,3 uma	0,08	D3 C14	30700 N/A	291,1/85,3 uma	0,01
Control	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3430	N/A	288,1/85,3 uma	0,11	D3 C15	30400 N/A	291,1/85,3 uma	0,12
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3130	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C16	27300 N/A	291,1/85,3 uma	0,12
Control +SA	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3900	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C17	31400 N/A	291,1/85,3 uma	0,16
Desconocido	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3510	N/A	288,1/85,3 uma	0,11	D3 C18	31800 N/A	291,1/85,3 uma	0,11
Desconocido	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	2960	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C19	34600 N/A	291,1/85,3 uma	0,02
MCADD	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	7040	N/A	288,1/85,3 uma	0,24	D3 C20	28800 N/A	291,1/85,3 uma	0,58
MCADD	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	5920	N/A	288,1/85,3 uma	0,21	D3 C21	28700 N/A	291,1/85,3 uma	0,45
PKU	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	2830	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C22	30000 N/A	291,1/85,3 uma	0,05
PKU	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	2750	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C23	30200 N/A	291,1/85,3 uma	0,04
MSUD	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	4580	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C24	3800 N/A0	291,1/85,3 uma	0,14
MSUD	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	4740	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C25	40700 N/A	291,1/85,3 uma	0,13
AS	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3260	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C26	3500 N/A0	291,1/85,3 uma	0,05
AS	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3420	N/A	288,1/85,3 uma	0,09	D3 C27	38100 N/A	291,1/85,3 uma	0,04
AC	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	5840	N/A	288,1/85,3 uma	0,15	D3 C28	40200 N/A	291,1/85,3 uma	0,23
AC	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	6100	N/A	288,1/85,3 uma	0,14	D3 C29	42800 N/A	291,1/85,3 uma	0,22
AA	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3240	N/A	288,1/85,3 uma	0,10	D3 C30	31500 N/A	291,1/85,3 uma	0,08
AA	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	4960	N/A	288,1/85,3 uma	0,16	D3 C31	30200 N/A	291,1/85,3 uma	0,20
MSUD Pat.	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3500	N/A	288,1/85,3 uma	0,11	D3 C32	31200 N/A	291,1/85,3 uma	0,11
MSUD LQC	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	3570	N/A	288,1/85,3 uma	0,11	D3 C33	31600 N/A	291,1/85,3 uma	0,12
MSUD HQC	Biocitina	Desconocido	Ornitoilcarnitina	4000	N/A	288,1/85,3 uma	0,12	D3 C34	33900 N/A	291,1/85,3 uma	0,14
Mancha blanco	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	1970	N/A	288,1/85,3 uma	0,04	D3 C35	51900 N/A	291,1/85,3 uma	< 0
Pat. 1	Biot PABA	Estándar	Octanoil carnitina	3140	2,9	288,1/85,3 uma	1,03	D3 C36	30400 N/A	291,1/85,3 uma	3,35
Pat. 2	Biot PABA	Estándar	Octanoil carnitina	704	0,52	288,1/85,3 uma	0,22	D3 C37	31600 N/A	291,1/85,3 uma	0,50
Pat. 3	Biot PABA	Estándar	Octanoil carnitina	550	0,16	288,1/85,3 uma	0,14	D3 C38	39100 N/A	291,1/85,3 uma	0,22
QC1	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	7560	N/A	288,1/85,3 uma	0,23	D3 C39	33600 N/A	291,1/85,3 uma	0,51

QC2	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	15600	N/A	288, 1/85,3 uma	0,50	D3 C40	31100 N/A	291, 1/85,3 uma	1,49
Control	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	3270	N/A	288, 1/85,3 uma	0,13	D3 C41	26100 N/A	291, 1/85,3 uma	0,16
Control	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	3080	N/A	288, 1/85,3 uma	0,11	D3 C42	29000 N/A	291, 1/85,3 uma	0,09
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	2490	N/A	288, 1/85,3 uma	0,09	D3 C43	29300 N/A	291, 1/85,3 uma	0,02
Control +SA	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	2980	N/A	288, 1/85,3 uma	0,10	D3 C44	29700 N/A	291, 1/85,3 uma	0,07
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	3370	N/A	288, 1/85,3 uma	0,11	D3 C45	31100 N/A	291, 1/85,3 uma	0,10
Control lavado	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	2880	N/A	288, 1/85,3 uma	0,09	D3 C46	32800 N/A	291, 1/85,3 uma	0,03
MCADD	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	5540	N/A	288, 1/85,3 uma	0,20	D3 C47	27800 N/A	291, 1/85,3 uma	0,42
MCADD	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	7140	N/A	288, 1/85,3 uma	0,23	D3 C48	30800 N/A	291, 1/85,3 uma	0,53
PKU	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	2020	N/A	288, 1/85,3 uma	0,07	D3 C49	27300 N/A	291, 1/85,3 uma	< 0
PKU	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	1890	N/A	288, 1/85,3 uma	0,07	D3 C50	27100 N/A	291, 1/85,3 uma	< 0
MSUD	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	5330	N/A	288, 1/85,3 uma	0,14	D3 C51	37300 N/A	291, 1/85,3 uma	0,22
MSUD	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	5810	N/A	288, 1/85,3 uma	0,15	D3 C52	37600 N/A	291, 1/85,3 uma	0,26
AS	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	3900	N/A	288, 1/85,3 uma	0,11	D3 C53	36400 N/A	291, 1/85,3 uma	0,10
AS	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	4050	N/A	288, 1/85,3 uma	0,11	D3 C54	36300 N/A	291, 1/85,3 uma	0,11
AC	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	7000	N/A	288, 1/85,3 uma	0,18	D3 C55	40100 N/A	291, 1/85,3 uma	0,33
AC	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	7520	N/A	288, 1/85,3 uma	0,20	D3 C56	37900 N/A	291, 1/85,3 uma	0,42
AA	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	4070	N/A	288, 1/85,3 uma	0,12	D3 C57	34600 N/A	291, 1/85,3 uma	0,13
AA	Biot PABA	Desconocido	Octanoil carnitina	2600	N/A	288, 1/85,3 uma	0,08	D3 C58	33300 N/A	291, 1/85,3 uma	< 0

Conclusiones:

5 La muestra del paciente está en el límite de corte para la detección selectiva de 0,5  $\mu\text{mol} / \text{l}$ . La señal, la proporción o la concentración se adaptan a esta concentración.

Las muestras de EDTA tienen buen aspecto

El procedimiento parece ser altamente cuantitativo, la linealidad, la precisión y los resultados de CC son excelentes.

La concentración de octanoilcarnitina del paciente se mide como se ha indicado anteriormente.

No se detectó ningún efecto de la elución

10 No hay efectos de los sustratos en las señales

Por tanto, los inventores han demostrado ampliamente la capacidad para llevar a cabo diversas series de pruebas en multiplexación. Si las pruebas son metabolitos, actividades enzimáticas o análisis de polipéptidos (a través de la digestión con proteasas), ninguna de las condiciones o tratamientos afectó adversamente a ninguna de las otras lecturas tomadas en el punto de análisis de muestras. Así, la invención proporciona un potente procedimiento de diagnóstico multiplexado.

### Ejemplo 9: Ácido orótico

20 El ácido orótico es un metabolito importante en la síntesis de pirimidinas. En consecuencia, en los trastornos hereditarios de la síntesis de novo de pirimidina, específicamente la deficiencia de la UMP sintasa, las concentraciones de ácido orótico en orina se incrementan. El ácido orótico se sintetiza a partir de fosfato de carbamilo y ácido aspártico y, en consecuencia, en los trastornos hereditarios del ciclo de la urea, es decir, deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC), deficiencia de ácido argininosuccínico sintasa y deficiencia de ácido argininosuccínico liasa, el ácido orótico en orina se incrementa (véase la figura 9).

25 El diagnóstico diferencial de la aciduria orótica hereditaria y trastornos hereditarios del ciclo de la urea es relativamente fácil, basándose en información clínica y la excreción masiva de ácido orótico en la deficiencia de la UMP sintasa. El diagnóstico diferencial de los defectos del ciclo de la urea se basa generalmente en aminoácidos en plasma o en orina: la citrulina está incrementada en la deficiencia de ácido argininosuccínico sintasa y el ácido argininosuccínico se incrementa en la deficiencia de la ácido argininosuccínico liasa. En la deficiencia de la ornitina transcarbamilasa (OTC), la citrulina plasma normalmente disminuye, pero el diagnóstico inicial se basa en el aumento de la excreción urinaria de ácido orótico en ausencia de un aumento diagnóstico en los aminoácidos del ciclo de la urea. El ácido orótico de sangre entera/ plasma rara vez se mide porque el ácido orótico se excreta activamente por el riñón y la concentración en plasma es relativamente baja en comparación con las concentraciones observadas en la orina. Sin embargo, sin tratamiento, las concentraciones en sangre / plasma de ácido orótico se incrementarán en todos los trastornos especificados anteriormente. Solo hay una publicación importante sobre el ácido orótico en plasma en un trastorno del ciclo de la urea (Sass et al (1999) Ped Neph 13, 30 912). Los autores midieron el ácido orótico en plasma en muestras de un paciente con deficiencia de argininosuccinato sintasa usando cromatografía de gases-espectrometría de masas y concluyeron que el análisis en plasma no ofrecía ventajas sobre el análisis de orina.

35 Los inventores divulgan el uso de la cuantificación de ácido orótico en muestra de sangre usando EMEM por electropulverización para detección selectiva de OTC en recién nacidos y pacientes agudos.

40 La siguiente información es un extracto del conjunto de datos de la OMIM Online Mendelian Inheritance in Man) con respecto a esta afección:

La deficiencia de ornitina transcarbamilasa es un error innato ligado al cromosoma X del metabolismo del ciclo de la urea que causa hiperamonemia. El trastorno se puede tratar con arginina en la dieta suplementaria y una dieta baja en proteínas.

45 Los trastornos del ciclo de la urea se caracterizan por la tríada de hiperamonemia, encefalopatía y alcalosis respiratoria. Se han descrito cinco trastornos que implican diferentes defectos en la biosíntesis de las enzimas del ciclo de la urea: deficiencia de OTC, deficiencia de carbamilo fosfato sintetasa (237300), deficiencia de argininosuccinato sintetasa o citrulinemia (215700); deficiencia de argininosuccinato liasa (207900) y deficiencia de arginasa (207800).

### 50 Características clínicas

Russell et al. (1962) describieron 2 primos con intoxicación crónica con amoniaco y deterioro mental. Mediante biopsia del hígado, la actividad de la OTC hepática se demostró que era muy baja. Se supuso que había un defecto

presente en la síntesis de urea a nivel de la conversión de ornitina a citrulina.

Levin et al. (1969) informaron de un bebé mujer afectada cuya madre tenía una aversión a las proteínas y niveles elevados de amoníaco en plasma, mientras que el padre era normal. En otro lactante, un varón, Levin et al. (1969) encontraron lo que consideraban una variante de la hiperamonemia habitual causada por deficiencia de OTC, presumiblemente debido a un cambio enzimático diferente. La actividad enzimática fue el 25 % de lo normal, en lugar de del 5 al 7% de lo normal como en otros casos, y otras propiedades de la enzima mostraron diferencias con respecto a lo normal. El cuadro clínico fue más leve que en los casos habituales. Holmes et al. (1987) también se describe una variante leve de la deficiencia de OTC.

Campbell et al. (1971, 1973) informaron sobre hiperamonemia neonatal letal debido a una deficiencia completa de ornitina transcarbamilasa. Sugirieron que la mutación en el gen que codifica la enzima puede conducir a la deficiencia parcial en mujeres heterocigotas y a deficiencia completa en varones hemocigotos.

Thaler et al. (1974) describieron una "nueva variante tolerante de proteínas" de la deficiencia de OTC en un niño con la encefalopatía con degeneración grasa visceral sugestiva de síndrome de Reye. Krieger et al. (1979) informaron sobre un lactante varón con deficiencia de OTC, que estuvo relativamente libre de síntomas durante 4 meses, pero desarrollaron gradualmente espasticidad severa debido a la atrofia cerebral y murió a los 13 meses de edad. La actividad de OTC en el hígado era un 1,5 % de lo normal. Los autores observaron que el cuadro clínico de la deficiencia de OTC durante las exacerbaciones agudas con la acumulación de grasa microvesicular en el hígado puede sugerir el síndrome de Reye.

Bruton et al. (1970) describieron la transformación de los astrocitos en células glía de tipo II del Alzheimer, una característica de cualquier forma de hiperamonemia. Kornfeld et al. (1985) notificaron hallazgos neuropatológicos en 2 casos de deficiencia de OTC. Un niño de 3 días de edad mostró gliosis principalmente en el tronco cerebral, y una niña de 2 años de edad mostró gliosis generalizada y ulegiria de la corteza cerebral, así como la atrofia de la capa granular interna del cerebelo.

Drogari y Leonard (1988) describieron 6 niños afectados con aparición relativamente tardía de los síntomas clínicos. Uno de ellos era un niño que durante la infancia fue considerado un niño muy difícil, introvertido con temperamento fuerte. A la edad de 12 años, tuvo un episodio de confusión por el que fue ingresado en el hospital, pero no se encontró ninguna causa. A la edad de 14 años, fue ingresado en el hospital profundamente inconsciente después de una comida rica en proteínas la noche antes de la admisión. La excreción de ácido orótico en orina se elevó, y su madre resultó ser un portador. Después, fue tratado con una dieta baja en proteínas, suplementos de arginina, y benzoato sódico. Sufrió más episodios de hiperamonemia, sin embargo, particularmente desencadenada por la restricción de energía. A la edad de 18 años realice unos elogiables exámenes y fue aceptado en la facultad de medicina. Finkelstein et al. (1989, 1990) describieron 21 pacientes varones que presentaron, después de la edad de 28 días, lo que los autores definen como deficiencia de OTC de inicio tardío. Los pacientes parecían normales al nacer, pero la irritabilidad, los vómitos y el letargo, que a menudo eran episódicos, se desarrollaron más tarde. La edad de la presentación varió de 2 meses a 44 años.

La deficiencia parcial en el varón, una forma presumiblemente alélica la comunicaron Matsuda et al. (1971) y Oizumi et al. (1984). (1971) y Oizumi et al. (1984). Oizumi et al. (1984) publicaron el caso de un niño de 6 años de edad, que tenía coma intermitente con hiperamonemia precipitada por infecciones. La biopsia hepática mostró actividad de OTC el 16 % de lo normal. La madre mostró excreción elevada de ácido orótico en la orina después una carga de proteínas. La suplementación de arginina en la dieta abolió los episodios de hiperamonemia en el niño. Matsuda et al. (1991) describieron las características clínicas y de laboratorio de 32 pacientes japoneses con deficiencia de OTC. Dividieron a sus pacientes en 3 grupos según las manifestaciones clínicas y la edad de inicio: grupo 1 (0 a 28 días), grupo 2 (de 29 días a 5 años), y grupo 3 (más de 5 años). La mortalidad y la incidencia de retraso mental más bajas se produjo entre los pacientes del grupo 2. Los pacientes en los grupos 1 y 3 tenían tasas de mortalidad y actividades enzimáticas similares. Estos pacientes tenían los niveles más altos de citrulina y estaban asintomáticos antes de su primer episodio de hiperamonemia. Los autores destacaron que la incidencia de la deficiencia de OTC de inicio tardío es mayor de lo que previamente se ha reconocido.

Anadiotis et al. (2001) informaron sobre un paciente varón de 15 años de edad con deficiencia de OTC que desarrolló pancreatitis mientras estaban tomando una dieta baja en proteínas, citrulina y fenilbutirato de sodio.

Lee y col. (2002) señalaron que ha habido varios informes de dermatosis de tipo acrodermatitis enteropática como en asociación con errores innatos del ciclo de la urea, en la citrulinemia asociada con la deficiencia de argininosuccinato sintasa (Goldblum y col., 1986), y con la deficiencia de carbamoilfosfato sintetasa (Kline y col., 1981). Lee y col. 2002 especularon que dado que la arginina representa una proporción tan grande de la composición de aminoácidos de las queratinas epidérmicas, que la deficiencia de arginina asociada con defectos del ciclo de la urea pueden contribuir a un compromiso de la función de barrera epidérmica y a las lesiones cutáneas en los lactantes afectados.

Lien et al. (2007) informaron sobre un hombre varón de 52 años de edad, que murió repentinamente de hiperamonemia después de una cirugía de rutina para la extirpación de un pólipo en la garganta. Ocho días después de la cirugía, desarrolló confusión, ataxia, y paranoia, que progresó a convulsiones, edema cerebral, coma y la

muerte en 3 días. Los antecedentes médicos eran normales. La hija asintomática de 20 años de edad del paciente acudió a una evaluación prenatal y se descubrió que sus hijos gemelos eran portadores de una mutación en el gen de la OTC. La madre era heterocigota para la mutación, pero el análisis de ADN en muestras de autopsia de su padre no tuvieron éxito. Ambos bebés varones estaban sanos con una dieta baja en proteínas. Lien et al. (2007) hicieron hincapié en la aparición tardía y presentación inusual de la deficiencia de OTC en el hombre mayor.

#### *Mujeres heterocigotas*

Rowe et al. (1986) revisaron 13 mujeres heterocigotas sintomáticas. Presentaron síntomas ya en la primera semana de vida o tan tarde como al sexto año. Los síntomas antes del diagnóstico fueron inespecíficos: irritabilidad episódica extrema (100 %), vómitos episódicos y letargo (100 %), evitación de proteínas (92 %), ataxia (77 %), estadio II de coma (46 %), retraso del crecimiento (38 %), retraso del desarrollo (38 %) y convulsiones (23 %). inicio en el momento del destete de la leche materna era frecuente. Incluido el probando, el 42 % de las mujeres en las 13 familias presentó síntomas.

Gilchrist y Coleman (1987) informaron sobre 2 mujeres heterocigotas que tuvieron inicio tardío de los síntomas severos. Encefalopatía y los déficit neurológicos focales comenzaron a la edad de 36 años en una y a la edad de 38 años en la otra. La segunda presentó niveles altos de orotato en orina después de una comida de proteínas y había tenido una aversión de por vida a comer carne, que por lo general precipita los dolores de cabeza.

Am et al. (1989) discutieron sobre los efectos fenotípicos de la heterocigosidad para mutaciones en el locus OTC. Arn et al. (1990) notificaron que en mujeres por lo demás normales que son portadoras de un alelo mutante de OTC presentan un mayor riesgo de coma hiperamónico, especialmente durante el puerperio. Recomendaron que cualquier mujer que se presente con un episodio de letargo progresivo y estupor, evidencia de disfunción cortical aguda, o estado de coma, especialmente durante el embarazo, se examinará para detectar la deficiencia de OTC mediante análisis de pedigrí, una búsqueda de antecedentes de episodios anteriores, y la medición de amonio plasmático y, si están disponibles de inmediato. La identificación temprana de hiperamonemia proporciona una oportunidad para corregir los niveles de amonio en plasma por la terapia intravenosa con benzoato de sodio, fenilacetato de sodio, y clorhidrato de arginina.

Lee y col. (2002) informaron de un bebé de sexo femenino con lesiones en la piel que se asemejaban a acrodermatitis enteropática y que más tarde se descubrió que tenía deficiencia de OTC. Las causas infecciosas y la deficiencia de cinc se descartaron, y la resolución de la erupción se produjo después de instaurar suplementación con arginina y citrulina.

#### Herencia

Scout et al. (1972) presentaron 2 linajes que respaldaban la herencia recesiva ligada al cromosoma X de la deficiencia de OTC. Short et al. (1973) 4 familias, todo consistente con la herencia ligada al cromosoma X. En el hígado de una mujer heterocigota para deficiencia de OTC, Ricciuti et al. (1976) demostraron 2 clases de células, una deficiente y una normal en la actividad de la enzima. Los hallazgos de mosaicismo celular confirmaron que el gen de la OTC está ligado al cromosoma X. Por lo tanto, la evidencia de la herencia dominante ligada al cromosoma X se basa en (1) la naturaleza severa del trastorno en los varones con ausencia casi completa de la enzima en la mayoría de los casos; (2) una amplia variación en la gravedad clínica y en el nivel de la enzima en las mujeres heterocigotas; (3) la demostración del fenómeno de Lyon en el hígado de mujeres heterocigóticas; y (4) la demostración de estar ligado al cromosoma X en el ratón (véase DeMars y col., 1976).

#### Mapeo

Burdakin y Norum (1981) observaron al menos 1 recombinante en 3 oportunidades para la relación con la deficiencia de OTC y de G6PD (305.900) en el cromosoma X. Los loci se encontraron más tarde que estaban en extremos opuestos del cromosoma X.

#### Diagnóstico

Rowe et al. (1986) sugirieron que los antecedentes familiares, la historia de la dieta, los síntomas no específicos episódicos, la respuesta a la retirada de proteínas, y otras características deben permitir un diagnóstico precoz. En 5 pacientes analizados, IQ estaba por debajo de 70 en el momento del diagnóstico.

La OTC se expresa en el hígado y en la mucosa del intestino delgado. Hamano et al. (1988) describieron la identificación de un portador de la deficiencia de OTC por medio de examen inmunocitoquímico de una muestra de biopsia de la mucosa duodenal. Las células negativas para OTC se distribuyeron alrededor de 1 lado de algunas vellosidades, mientras que las células positivas para OTC se encuentran en el otro lado. Las células epiteliales del intestino surgen de la división de las células de las criptas y después mueven a lo largo de los lados de las vellosidades. Se piensa que el epitelio de las criptas individuales está compuesto por células de un solo tipo de padres.

Aproximadamente el 15 % de las mujeres heterocigotas tienen comas hiperamonémicos que amenazan la vida. Los portadores tanto sintomáticos como asintomáticos muestran un aumento de la excreción de ácido orótico,

especialmente en pruebas de carga de proteína. Pelet et al. (1990) encontraron que la prueba no suele ser negativa en portadores obligados, tal vez no más a menudo que en el 8 % de los portadores.

Hauser et al. (1990) describieron una prueba que puede sustituirse por la carga de nitrógeno para la identificación de las mujeres heterocigotas. En la prueba de carga de nitrógeno, hay una acumulación intramitocondrial de carbamoil fosfato. El exceso de fosfato carbamoilo se difunde en el citosol donde funciona como un sustrato para mejorar la biosíntesis de pirimidina, lo que resulta en la acumulación y la excreción de ácido orótico. En el ensayo propuesto por Hauser et al. (1990), una dosis oral única de sustitutos de alopurinol para la carga de nitrógeno. La eficacia del procedimiento depende del efecto inhibitor del ribonucleótido oxipurinol (un metabolito del alopurinol) en la orotidina monofosfato descarboxilasa, lo que conduce a la acumulación de monofosfato de orotidina y su precursor, ácido orótico, y en última instancia a aciduria orótica y orotidinuria.

Grompe et al. (1991) ofrecieron un algoritmo diagnóstico para la deficiencia de OTC. Aunque la precisión de la detección prenatal y de portadores de deficiencia de OTC se ha mejorado en gran medida mediante análisis de ligación desde la clonación del gen, el diagnóstico basado en RFLP es limitado en este trastorno en el que muchos de los casos representan nuevas mutaciones.

Yudkoff et al. (1996) desarrollaron una nueva técnica que supervisa la competencia metabólica en las mujeres heterocigotas para la deficiencia de OTC. Llegaron a la conclusión de que la prueba controla eficazmente el metabolismo del nitrógeno vivo y puede obviar la necesidad de biopsia de hígado para medir la actividad de la enzima en la deficiencia de OTC. Los portadores de deficiencia de OTC asintomáticos forman la urea a un ritmo normal, lo que indica que la ureagénesis puede ser competente a pesar de que la actividad enzimática es inferior a lo normal. Aunque los portadores de deficiencia de OTC ostensiblemente asintomáticos forman urea a un ritmo normal, el metabolismo del nitrógeno sigue siendo anormal, como se refleja en el aumento de su producción de 5-(15)N-glutamina. La nueva prueba puede ser importante para el seguimiento de la eficacia de nuevos tratamientos para la deficiencia de OTC, por ejemplo, el trasplante de hígado y la terapia génica. El procedimiento utiliza la espectrometría de masas para medir la conversión de 15)NH(4)Cl to (15)N-urea and 5-(15)N-glutamina después de una carga oral de (15) NH (4) C1.

Bowling et al. (1999) informaron sobre una familia con 2 varones consecutivos con deficiencia de OTC causada por una mutación en el gen de OTC. Los análisis bioquímicos de la madre eran normales. La genotipificación de la madre se llevó a cabo en los leucocitos de sangre periférica y fibroblastos de la piel y no mostró ninguna mutación, lo que sugiere fuertemente mosaicismo gonadal. Los autores observaron que el mosaicismo gonadal debe tenerse en cuenta cuando se asesora a parejas en las que la madre ha tenido un niño previamente afectado con la deficiencia de OTC, pero no parece ser un portador.

En resumen, los puntos clave que deben tenerse en cuenta a partir de la descripción OMIM son:

Aunque la OTC es una enfermedad ligada al cromosoma X, puede afectar a mujeres portadoras con una gravedad muy variable.

En el período neonatal puede haber mujeres y hombres con enfermedad muy grave que es casi universalmente fatal.

Los hombres y las mujeres también pueden presentarse en cualquier etapa de la vida, de niño a adulto, con diversos grados de severidad, desde la conducta antisocial a la muerte, dependiendo de la actividad enzimática residual y la autoselección de las dietas bajas en proteínas.

Detección selectiva neonatal no se ha considerado, porque no existe una prueba apropiada.

La invención puede usarse ventajosamente para identificar al grupo de pacientes de inicio tardío que, con el tratamiento dietético relativamente simple y la farmacología "vía alternativa", que va a crecer y desarrollarse normalmente y tendrá un régimen de emergencia prescrita a seguir durante cualquier episodio de descompensación. Esto es análogo a la detección selectiva de la deficiencia de acilCoA de cadena media (MCADD), un trastorno de la oxidación de grasas hereditario recientemente exigido para la detección selectiva en recién nacidos en el Reino Unido. OTC y MCADD representan las principales causas de la "síndrome de Reye".

Los inventores no tienen conocimiento de ningún intento en la técnica para utilizar sangre entera / plasma o sangre seca para la detección de OTC en el período neonatal - esta es otra nueva aplicación de la presente invención. Por supuesto el experto será consciente de que esta prueba en particular no es específica; se detectarán casos de deficiencia de sintasa UMP y otros trastornos del ciclo de la urea (véase más arriba), pero se pueden diferenciar fácilmente por motivos clínicos u otros biomarcadores que son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, adecuadamente el procedimiento de la invención puede comprender una etapa adicional que comprende la diferenciación por motivos clínicos o de biomarcadores para verificar la afección detectada.

En este ejemplo, se presentan los datos de OTC, lo que demuestra la capacidad de cuantificar con precisión ácido orótico en manchas de sangre seca usando un procedimiento cromatográfico que requiere unos 5 minutos. Si se desea reducir el tiempo de procedimiento, es posible optimizar el sistema mediante la reducción de tamaño de la columna y / o el aumento de velocidad de flujo para lograr cromatografía apropiada dentro de un ciclo de 2 min. En

consecuencia, al considerar los datos presentados, es evidente que el ácido orótico en la mancha de sangre seca encuentra aplicación en la detección de gotas de sangre del recién nacido para la deficiencia de OTC.

A continuación, los inventores presentan soporte experimental basado en las siguientes preguntas:

¿Se pueden detectar valores normales de ácido orótico sobre una mancha de sangre seca?

5 ¿Se puede detectar alteraciones en la sangre seca de ácido orótico, dentro del intervalo fisiológico esperado?

Experimento:

Un voluntario adulto proporcionó una muestra de 5 ml de sangre heparinizada con litio que se almacenó en -80 °C. La muestra se descongeló posteriormente, se mezcló y se añadió material estándar ácido orótico como se indica a continuación:

10 90 µl de sangre entera + 10 µl de agua desionizada  
(concentración final, basal)

100 µl de sangre entera + 1 µl de 100 µmol/l de ácido orótico  
(concentración final, basal + 1 µmol/l)

15 100 µl de sangre entera + 1 µl de 500 µmol/l de ácido orótico  
(concentración final, basal + 5 µmol/l)

100 µl de sangre entera + 1 µl de 2,5 mmol/l de ácido orótico  
(concentración final, basal + 25 µmol/l)

100 µl de sangre entera + 1 µl de 10 mmol/l de ácido orótico  
(concentración final, basal + 100 µmol/l)

20 50 µl de cada muestra se pipetearon sobre papel de filtro estándar Schleicher & Schuell y se dejó secar a temperatura ambiente y el ensayo se realice. Se incluyeron una muestra de control DBS (ND de edad) y una muestra de DBS de un paciente con acidemia metilmalónica.

25 Se prepararon manchas de 3,2 mm de sangre (aproximadamente equivalente a 2,5 µl de la muestra). Se preparó un disolvente de elución metanólica (que contiene toda la gama de isótopos estables para cuantificación de aminoácidos, acilcarnitina, creatinina, ácido metilmalónico, ácido orótico, ADMA, SDMA). 150 µl del disolvente de elución se añadieron a cada DBS y se mezclaron durante 30 minutos a 37 °C antes de la centrifugación. Los sobrenadantes se transfirieron a una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos y se aplicó una cubierta. Después, se midieron el ácido orótico, ácido metilmalónico (véanse los cromatogramas a continuación), ácido metilcítrico (datos no mostrados) y ácido 3-hidroxiglutarico (datos no mostrados) después de la cromatografía y la espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría de masas (EMEM) de iones negativos con dilución de isótopos estables en modo de vigilancia de múltiples reacciones (MRM) en un SCIEX API5000 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

35 5 µl de sobrenadante se inyectaron automáticamente con un muestreador automático HTS PAL (CTC Analytics AG, Suiza) en una corriente de fase móvil de 250 µl/min de acetonitrilo: agua (37,5:62,5 v / v). La cromatografía se realizó en una columna Chirobiotic T 100 x 2,1 mm con una columna de guarda de 2 cm x 4,0 mm (Advanced Separation Technologies, Congleton, Reino Unido) y pares de iones de precursor / producto para el ácido orótico (m/z 154,9/111,1 y 156,9/113,1) y el ácido metilmalónico, el ácido metilcítrico y el ácido 3-hidroxiglutarico glutarilcarnitina se adquirieron en modo MRM de iones positivos. Los resultados se calcularon utilizando la versión 1.4.3 de Analyst.

40 Resultados:

Véanse los cromatogramas para DBS ND control, DBS control + 25 µmol / l de ácido orótico y DBS MMA (figuras 10, 11 y 12):

En cada caso, el panel superior es ácido orótico (azul) y el patrón interno de ácido orótico con isótopos estables (rojo) y el panel inferior ácido metilmalónico (azul) y el patrón de ácido metilmalónico con isótopos estables (rojo).

45 La inspección de los cromatogramas, ND control y DBS MMA, demuestra que hay una señal de fondo de interferencia para el ácido orótico. (aprox. 1 - 3 µmol/l) ue limita la sensibilidad de cualquier ensayo para DBS ácido orótico. Sin embargo, a un nivel de 25 µmol / l de ácido orótico añadido, la relación señal:ruido es aproximadamente 8:1. El valor de 25 µmol / l es significativo, ya que los inventores han medido el ácido orótico e plasma / sangre entera en una muestra de un recién nacido con deficiencia de OTC (el hermano de un caso diagnosticado

previamente) y la concentración fue aproximadamente 25µmol / l. De este modo se demuestra la detección selectiva en recién nacidos para la deficiencia de OTC.

5 Teniendo en cuenta el ácido metilmalónico. Los cromatogramas, DBS ND y DBS control + 25µmol / l de ácido orótico, revelan una señal evidente de MMA; de hecho, este es el ácido succínico y se cromatografía poco más tarde que MMA en este sistema. embargo, en el caso positivo, el aumento de MMA es diagnóstico. Esto demuestra la capacidad de utilizar la cromatografía rápida y la EMEM en el modo de ion negativo para medir, de forma simultánea, las concentraciones puntuales de sangre de diagnóstico de ácido orótico y MMA. El potencial de añadir ácidos orgánicos diagnóstico adicionales, por ejemplo, 3-hidroxiglutarato, y mejorar la eficiencia de diagnóstico del sistema de ensayo es evidente.

10 Observese que la cromatografía dura 5 minutos en este ejemplo. Sin embargo, con una columna de 50 mm y el caudal de 400 µl / min, esto se puede reducir a <2 minutos.

15 La adición de patrón de ácido orótico a la sangre entera dentro del intervalo de diagnóstico (1 -100 µmol / l) es fácil de medir con exactitud y precisión. Esto se demuestra con la curva patrón en la figura 13 (curva patrón de DBS ácido orótico (1-100 µmol / l)). El R<sup>2</sup> valor es una medida bruta de la precisión analítica en el intervalo analítico y es 0,9997. Esta es una excelente correlación usando muestras de sangre seca.

Datos primarios de ácido orótico:

Nombre del pico: orótico 15N13C

Uso como patrón interno

Masas Q1 / Q3: 156,93/113,05 uma

20 Nombre del pico: orótico

Patrón interno: orótico 15N13C

Masas Q1 / Q3: 154,93/111,05 uma

Ajuste	Ponderación lineal
Intersección	0,0333
Pendiente	0,0152
Coefficiente de correlación	0,9997
Área de uso	

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	Nombre del pico analito	Concentración del analito	Concentración calculada (µmol/l)
ND antiguo		Desconocido	orótico	N/A	2,4
orótico 1 uM		Estándar	orótico	1	0,9
orótico 5 uM		Estándar	orótico	5	5,3
orótico 25 uM		Estándar	orótico	25	25,9
orótico 100 uM		Estándar	orótico	100	98,9
MMA		Desconocido	orótico	N/A	<0

25 Resumen del ejemplo 9:

La detección de los valores normales de ácido orótico en una mancha de sangre seca usando el sistema cromatográfico actual es problemático, debido a interferencias.

Los inventores pudieron detectar y medir con precisión las alteraciones en el ácido orótico en la mancha de sangre seca en el intervalo diagnóstico esperado.

30 Otros ácidos orgánicos diagnósticos, por ejemplo ácido metilmalónico, se pueden medir de forma simultánea, es decir, este marcador es capaz de multiplexación de acuerdo con la invención.

La medición de ácido orótico urinario incrementado se reconoce como esencial para el diagnóstico de la deficiencia de OTC. Los inventores han demostrado la capacidad para medir DBS ácido orótico sobre el intervalo de

concentración requerido, mediante EMEM de iones negativos en un formato adecuado para la detección selectiva en neonatos y aplicaciones multiplex.

### Ejemplo 10: 3-O-metil-dihidroxifenilalanina

5 La aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) es una enzima de la vía metabólica implicada en la síntesis de neurotransmisores, particularmente de dopamina y serotonina, a partir de fenilalanina y tirosina. La deficiencia de AADC hereditaria tiene como resultado niveles reducidos de dopamina y serotonina en el LCR y aumento de los metabolitos sustrato, L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) y 5-hidroxitriptófano (5-HT). 3OMDOPA se produce mediante la 3-O-metilación de la L-DOPA y también se incrementa.

10 El diagnóstico de la AADC se ha concentrado, principalmente, en la reducción de neurotransmisores en el LCR pero, en algunos casos, la reducción de ácido homovanílico urinaria y el incremento de L-DOPA, 5-HT y 3OMDOPA en orina han probado ser útiles. Se ha publicado muy poco sobre las concentraciones en plasma de los neurotransmisores o L-DOPA, 5-HT, y 3 OMDOPA. Clínicamente, la AADC es una afección significativa (véase más adelante) pero un tratamiento relativamente simple puede ser eficaz.

15 El fosfato de piridoxal es un cofactor esencial para la actividad de AADC. En consecuencia, los problemas en el suministro y síntesis de fosfato de piridoxal pueden presentarse con síntomas similares a los de la deficiencia de AADC. Se han reconocido dos nuevos trastornos hereditarios hace relativamente poco tiempo. primero es un problema de la síntesis de fosfato de piridoxal, específicamente, una mutación en el gen que codifica la enzima piridox(am)ina 5'-fosfato oxidasa (PNPO). Esta condición, asociada con ataques graves y muerte prematura, se trata de una forma muy sencilla y eficaz mediante la administración de fosfato de piridoxal. Es, por tanto, un candidato ideal para la detección selectiva en neonatos. La segunda afección hereditaria es la deficiencia de  $\alpha$ -aminoadípico semialdehído deshidrogenasa (AASD). En esta afección, debido a la deficiencia de la enzima, se acumula  $\alpha$  aminoadípico semialdehído y forma piperidina-6-carboxilato que reacciona, de forma irreversible, con el fosfato de piridoxal para formar un producto de condensación de Knoevenagel. Esto conduce a la deficiencia de fosfato de piridoxal y a posteriores ataques severos. Esta afección, asociada con ataques graves, se trata de una forma muy sencilla y eficaz mediante la administración de fosfato de piridoxina. Es, por tanto, un candidato ideal para la detección selectiva en neonatos. Un cuadro clínico similar se reconoce por la deficiencia de piridoxina nutricional.

25 Se espera que las 3 afecciones descritas anteriormente para dar lugar a la acumulación de 3OMDOPA en plasma / sangre entera. La posibilidad de detección selectiva en recién nacidos utilizando 3OMDOPA se divulga en el presente documento por primera vez.

30 Los inventores divulgan el uso de manchas de sangre seca de cuantificación de 3-O-metil-dihidroxifenilalanina cuantificación utilizando EMEM electropulverización para detección selectiva en recién nacidos y pacientes agudos par alas deficiencias hereditarias AADC, PNPO y deficiencias AASD y la deficiencia de piridoxina sistémica.

La siguiente información es un extracto del conjunto de datos de la OMIM Online Mendelian Inheritance in Man) con respecto a esta afección:

35 la deficiencia de AADC es un error innato del metabolismo de los neurotransmisores que conduce a la deficiencia combinada de serotonina y catecolaminas (Abeling y col., 2000).

#### Características clínicas

40 Hyland y Clayton (1990) y Hyland et al. (1992) informaron sobre gemelos monocigóticos varones nacidos de padres primos hermanos que presentaron a la edad de 2 meses hipotonía grave y movimientos paroxísticos que consisten en llanto seguido de la extensión de los brazos y las piernas, crisis oculógiras y cianosis. También mostraron movimientos coreoatetoides ocasionales de las extremidades. Más tarde, se observaron defectos en la regulación de temperatura e hipotensión postural. Los análisis de laboratorio mostraron una gran disminución de la concentración de ácido homovanílico (HVA) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el LCR, así como disminución de catecolaminas en plasma y de serotonina en sangre entera. Se observó una elevación significativa en la excreción urinaria de L-DOPA, 5-hidroxitriptófano (5HTP), y 3- metoxitirosina, todos los cuales preceden a la etapa de AADC en la vía bioquímica. Los resultados demostraron que la síntesis de serotonina y de dopamina estaban afectadas en los sistemas nerviosos central y periférico, en consonancia con una deficiencia de AADC. La actividad de la enzima AADC se redujo drásticamente en el plasma y en tejido hepático (1 % de control). El tratamiento con un inhibidor de la monoamino oxidasa, un agonista de la dopamina y piridoxina se tradujo en una mejora notable en el tono y el movimiento. Los padres eran asintomáticos, pero tenían perfiles bioquímicos compatibles con ser heterocigotos para la deficiencia de AADC.

55 Maller et al. (1997) notificaron un paciente de origen iraní nacido de padres consanguíneos que presentó en la infancia hipotonía, episodios paroxísticos de llanto inconsolable "rueda hacia atrás" de los ojos, extensión de las extremidades" e inestabilidad de la temperatura. A la edad de 5 años, tenía un retraso severo del desarrollo, profunda hipotonía y aumento del tono muscular en las extremidades con reflejos tendinosos enérgicos y respuestas plantares extensoras. Los movimientos espontáneos eran coreoatetósicos y presentaba hipersudoración. Los análisis de LCR, sangre y orina, así como la baja actividad de la enzima AADC, eran consistentes con la deficiencia

de AADC. Korenke et al. (1997) informaron de un paciente alemán con AADC nacido de padres no relacionados. Los hallazgos del fenotipo clínico y de laboratorio fueron similares a los casos notificados previamente. Korenke et al. (1997) y Maller et al. (1997) destacaron las similitudes clínicas entre la deficiencia de AADC y la deficiencia de dihidropteridina de reductasa (261 630

5 Abeling et al. (1998) informaron sobre una niña holandesa con deficiencia de AADC que tenía un fenotipo clínico más leve, aunque todavía exhibía retraso psicomotor y los episodios hipertónicos característicos con crisis oculógiras. El LCR mostró disminución de 5-HIAA and HVA y la orina mostró disminución de 5-HIAA, ácido vanililmandélico (VMA) y norepinefrina, L-DOPA elevada, sino que también eleva la dopamina y HVA, que debería haber disminuido en la base al defecto enzimática. La actividad de AADC en plasma fue indetectable. Abeling et al.  
10 (1998) sugirieron que la deficiencia de AADC estaba confinada en el compartimiento cerebral. Al examinar varios pacientes de AADC, incluyendo el paciente notificado por Abeling et al. (1998), Abeling et al. (2000) encontraron que todos los pacientes tenían hiperdopaminuria, que aumentó después de la administración de L-DOPA. El HVA también se incrementó. Los autores observaron que la dopamina se produce en el riñón a través de una forma renal de AADC que está presente en los túbulos renales proximales y que participa en la manipulación renal de sodio. En  
15 pacientes con deficiencia de AADC, estas células renales reciben cantidades aumentadas del sustrato acumulado L-DOPA, que se convierte rápidamente en dopamina y HVA.

Swoboda et al. (2003) revisó el fenotipo clínico de 11 pacientes con deficiencia de AADC, incluyendo 4 pacientes previamente notificados. Los síntomas en neonatos incluyeron falta de apetito, letargo, ptosis, hipotermia e hipotensión. Todos los pacientes demostraron anomalías en los movimientos oculares intermitentes, hipotonía  
20 troncal, hipertonia de las extremidades y movimientos voluntarios deteriorados. La mayoría también mostró labilidad emocional e irritabilidad. Otras características incluyen mioclonos, distonía, sudoración paroxística y problemas gastrointestinales, tales como la enfermedad de reflujo, estreñimiento y diarrea. Los resultados clínicos funcionales eran malos.

#### Características bioquímicas

25 Verbeek et al. (2007) describieron ensayos para la actividad enzimática AADC en plasma utilizando ambos de sus sustratos, 5-hidroxitriptófano (5-HTP) y 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-dopa). Ellos encontraron que la actividad enzimática AADC en el plasma control es, de media, un factor de 8 a 12 más alto con L-dopa como sustrato que con 5-HTP. Ambos sustratos de AADC compiten por el mismo sitio activo de la enzima, lo que tiene como resultado actividades enzimáticas residuales igualmente disminuidas en pacientes con deficiencia de AADC. En pacientes con  
30 deficiencia de AADC, las actividades enzimáticas hacia ambos sustratos están igualmente disminuidas, como lo están las concentraciones en el LCR de HVA, 5-HIAA, y MHPG, mientras que los heterocigotos tienen niveles de actividad AADC intermedios. Estas enzimas y los ensayos se pueden realizar en la sangre.

#### Gestión clínica

35 Pons et al. (2004) señalaron que la gestión clínica de la deficiencia de AADC implica generalmente vitamina B6, agonistas de la dopamina e inhibidores de la MAO para potenciar la transmisión monoaminérgica. En la evaluación de la respuesta al tratamiento entre un grupo de pacientes de AADC, los autores detectaron 2 grupos principales: uno con 5 varones que respondieron al tratamiento e realizaron progresos en el desarrollo, y un segundo de 5 mujeres y 1 varón que respondieron mal al tratamiento y con frecuencia desarrollaron discinesias inducidas por fármacos. Los hallazgos sugirieron una diferencia de sexo en el sistema monoaminérgico, siendo las mujeres más  
40 dependientes del sistema de la dopamina.

En resumen, los puntos clave que deben tenerse en cuenta a partir de la descripción OMIM son:

La única mención de 3 OMDOPA (nota, la 3-metoxitirosina es solo un nombre alternativo para 3OMDOPA) se refiere a la orina.

45 El diagnóstico se encuentra todavía en sus primeras etapas y se basa principalmente en la medición de la reducción de los neurotransmisores del LCR.

La posibilidad de detección selectiva en recién nacidos para cualquiera de los 3 trastornos, a pesar de que todos cumplen los criterios internacionales para la detección selectiva del recién nacido, ni siquiera se ha considerado en la técnica anterior.

50 El objetivo de los inventores es identificar los casos de reducción de la actividad de AADC, por cualquier razón, usando la detección selectiva múltiple de la invención, en particular cuando se aplica a la detección selectiva del recién nacido. Por lo tanto, el ensayo no es específico de una afección, pero los posibles trastornos se pueden diferenciar fácilmente por motivos clínicos (respuesta a hacerlo con fosfato de piridoxina o piridoxal) u otros biomarcadores, incluyendo la actividad de AADC. Por lo tanto, de manera adecuada el procedimiento de la invención puede comprender una etapa adicional de confirmación del diagnóstico mediante pruebas secundarias como se describe o como se conoce en la técnica.  
55

En este ejemplo, los datos se presentan demostrando la capacidad de cuantificar con precisión 3OMDOPA en manchas de sangre seca usando un procedimiento cromatográfico que requiere aproximadamente 6 minutos.

Mediante la reducción del tamaño de la columna y / o el aumento del caudal, se puede alcanzar la cromatografía apropiada en un ciclo de 2 minutos. Por consiguiente, al considerar los datos presentados se demostró claramente que el ácido 3OMD en la mancha de sangre seca se puede utilizar en aplicaciones tales como la detección selectiva en manchas de sangre de recién nacido para deficiencias hereditarias de AADC, PNPO, y AASD y la deficiencia de piridoxina sistémica.

5

En la siguiente sección experimental, se abordan las siguientes preguntas:

¿Se pueden detectar valores normales de 3OMDOPA sobre una mancha de sangre seca?

¿Se puede detectar alteraciones en la sangre seca de 3OMDOPA, dentro del intervalo fisiológico esperado?

Experimento:

10 Un voluntario adulto proporcionó una muestra de 5 ml de sangre heparinizada con litio que se almacenó en  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La muestra se descongeló posteriormente, se mezcló y se añadió material estándar 3OMDOPA como se indica a continuación:

90  $\mu\text{l}$  de sangre entera + 10  $\mu\text{l}$  de agua desionizada

(concentración final, basal)

15

100  $\mu\text{l}$  de sangre entera + 1  $\mu\text{l}$  de 100  $\mu\text{mol/l}$  de 3OMDOPA

(concentración final, basal + 1  $\mu\text{mol/l}$ )

100  $\mu\text{l}$  de sangre entera + 1  $\mu\text{l}$  de 500  $\mu\text{mol/l}$  de 3OMDOPA

(concentración final, basal + 5  $\mu\text{mol/l}$ )

100  $\mu\text{l}$  de sangre entera + 1  $\mu\text{l}$  de 2,5  $\text{mmol/l}$  de 3OMDOPA

20

(concentración final, basal + 25  $\mu\text{mol/l}$ )

100  $\mu\text{l}$  de sangre entera + 1  $\mu\text{l}$  de 10  $\text{mmol/l}$  de 3OMDOPA

(concentración final, basal + 100  $\mu\text{mol/l}$ )

25 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra se pipetearon sobre papel de filtro estándar Schleicher & Schuell y se dejó secar a temperatura ambiente y el ensayo se realice. Se incluyeron una muestra de control de DBS (ND de edad), una muestra de DBS de un paciente con deficiencia de AADC, una muestra de DBS de un paciente con deficiencia de glutarilCoA deshidrogenasa y un DBS de un paciente con deficiencia de acilCoA deshidrogenasa de cadena larga. Obsérvese que también se midieron ADMA y SDMA (véase el ejemplo 9).

30 Se prepararon manchas de 3,2 mm de sangre (aproximadamente equivalente a 2,5  $\mu\text{l}$  de la muestra). Se preparó un disolvente de elución metanólica (que contiene toda la gama de isótopos estables para cuantificación de aminoácidos, acilcarnitina, creatinina, ácido metilmalónico, ácido orótico, ADMA, SDMA). 150  $\mu\text{l}$  del disolvente de elución se añadieron a cada DBS y se mezclaron durante 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de la centrifugación. Los sobrenadantes se transfirieron a una placa de polipropileno de 96 pocillos profundos y se aplicó una cubierta. 3OMDOPA (se debe tener en cuenta que en el momento de este experimento en particular no se disponía de ningún patrón interno, pero ahora sí), glutarilcarnitina, (véanse los cromatogramas de las figuras 14 a 16),

35 tetradecenoilcarnitina (véanse los cromatogramas de las figuras 14 a 16), ADMA y SDMA se midieron después tras la cromatografía y espectrometría de masas por electropulverización-espectrometría de masas (EMEM) en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) en un SCIEX API5000 (Applied Biosystems, Warrington, UK).

40 5  $\mu\text{l}$  de sobrenadante se inyectaron automáticamente con un muestreador automático HTS PAL (CTC Analytics AG, Suiza) en una corriente de fase móvil de 250  $\mu\text{l}/\text{min}$  de acetonitrilo: agua (50:50 v / v) con ácido fórmico al 0,025 %. La cromatografía se realizó en una columna Chirobiotic T 100 x 2,1 mm con una columna de guarda de 2 cm x 4,0 mm (Advanced Separation Technologies, Congleton, Reino Unido) y pares de iones de precursor / producto para el ácido orótico ( $m/z$  212,2/166,2 para la cuantificación y 212,2/149,2 para la confirmación), glutarilcarnitina, tetradecenoilcarnitine, ADMA y SDMA se adquirieron en modo MRM de iones positivos. Los resultados se calcularon usando la versión de Analyst 1.4.3.

45 Resultados:

Véanse los cromatogramas para el paciente DBS AADC, paciente con deficiencia de la DBS glutarilCoA deshidrogenasa y el paciente con deficiencia de DBS VLCAD a continuación:

50 En cada caso, el panel superior es el ion de cuantificación iónica de 3OMDOPA (aprox. 2,7min) y el ion de confirmación 3OMDOPA (rojo), el panel central es glutarilcarnitina (aprox. 3,0 min) (azul) y el patrón interno de glutarilcarnitina con isótopo estable (rojo) y el panel inferior es tetradecenoilcarnitina (aprox. 2,5 min) (azul)

y tetradecanoilcarnitina con isótopo estable como patrón interno (rojo).

La inspección de los cromatogramas, paciente con deficiencia de DBS glutarilCoA deshidrogenasa y paciente con deficiencia de DBS VLCAD, demuestra que, normalmente, no hay señal detectable para 3OMDOPA. Sin embargo, en el paciente con deficiencia de AADC hay señales significativas y equivalentes para los iones de cuantificación y confirmación de 3OMDOPA, a una concentración de aproximadamente 10 µmol / l (véase el valor calculado en la tabla siguiente). Por lo tanto, la detección selectiva, tal como la detección selectiva en neonatos de la deficiencia de AADC, es posible de acuerdo con la presente invención. La invención también se puede aplicar a la detección selectiva de cualquier trastorno que de lugar a una reducción de la actividad de AADC.

Teniendo en cuenta la glutarilcarnitina, el cromatograma en el paciente con deficiencia de DBS glutarilCoA deshidrogenasa, en comparación con los otros 2 cromatogramas, demuestra una señal de diagnóstico para la deficiencia de glutarilCoA deshidrogenasa. El cromatograma en el paciente con deficiencia de DBS VLCAD, en comparación con los otros 2 cromatogramas, demuestra una señal de diagnóstico para la deficiencia de VLCAD. Esto demuestra la capacidad de utilizar la cromatografía rápida y la EMEM en el modo de ion positivo para medir, de forma simultánea (es decir, en multiplex), las concentraciones puntuales de sangre de diagnóstico de 3OMDOPA, glutarilcarnitina, y tetradecenoilcarnitina. La oportunidad de añadir compuestos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, de ADMA, y mejorar la eficiencia de diagnóstico del sistema de ensayo es evidente.

Observese que la cromatografía dura 6 minutos en este ejemplo. Sin embargo, con una columna de 50 mm y el caudal de 400µl / min, esto se puede reducir a aproximadamente 2 minutos. La adición del patrón 3OMDOPA a la sangre entera dentro del intervalo diagnóstico (1 -100 µmol / l) se mide fácilmente y con exactitud y precisión, incluso sin patrón interno con isótopo estable. Esto se demuestra por las curvas estándar en las figuras 17 y 18. El valor de R<sup>2</sup> es una medida cruda de la precisión analítica en el intervalo analítico y es 0,9991, usando el ion de cuantificación y 0,9987 usando el ion de confirmación. Estas son excelentes correlaciones utilizando manchas de sangre seca.

Nombre del pico: 3OMDOPA Q

No hay patrón interno

Masas Q1 / Q3: 212,20/166,20 uma

Ajuste	Ponderación lineal
Intersección	-2,04 E+04
Pendiente	2,08 E+04
Coefficiente de correlación	de 0,9991
Área de uso	

Nombre del pico: 3OMDOPA C

No hay patrón interno

Masas Q1 / Q3: 212,20/149,20 uma

Ajuste	Ponderación lineal
Intersección	-1,42 E+03
Pendiente	1,68 E+04
Coefficiente de correlación	de 0,9987
Área de uso	

Nombre de la muestra	ID de la muestra	la Tipo de muestra	Nombre del analito	Concentración del analito	Concentración calculada (µmol/l)
ND antiguo		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	Sin pico
3OMD 1 uM		Estándar	3OMDOPA Q	1	Sin pico
3OMD 5 uM		Estándar	3OMDOPA Q	5	5,4
3OMD 25 uM		Estándar	3OMDOPA Q	25	23,1
3OMD 100 uM		Estándar	3OMDOPA Q	100	102,0
ADMA 1 uM		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	Sin pico
GA 1		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	Sin pico
AADC		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	10,5
VLCADD		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	Sin pico
MCAD		Desconocido	3OMDOPA Q	N/A	Sin pico
ND old		Desconocido	3OMDOPA C	N/A	Sin pico

Nombre de la muestra	ID de la muestra	Tipo de muestra	de Nombre pico analito	del Concentración del analito	Concentración calculada ( $\mu\text{mol/l}$ )
3OMD 1 $\mu\text{M}$		Estándar	3OMDOPA C	1	1,1
3OMD 5 $\mu\text{M}$		Estándar	3OMDOPA C	5	4,9
3OMD 25 $\mu\text{M}$		Estándar	3OMDOPA C	25	22,6
3OMD 100 $\mu\text{M}$		Estándar	3OMDOPA C	100	102,0
ADMA 1 $\mu\text{M}$		Desconocido	3OMDOPA C	N/A	Sin pico
GA 1		Desconocido	3OMDOPA C	N/A	Sin pico
AADC		Desconocido	3OMDOPA C	N/A	10,0
VLCADD		Desconocido	3OMDOPA C	N/A	Sin pico

Resumen del ejemplo 10:

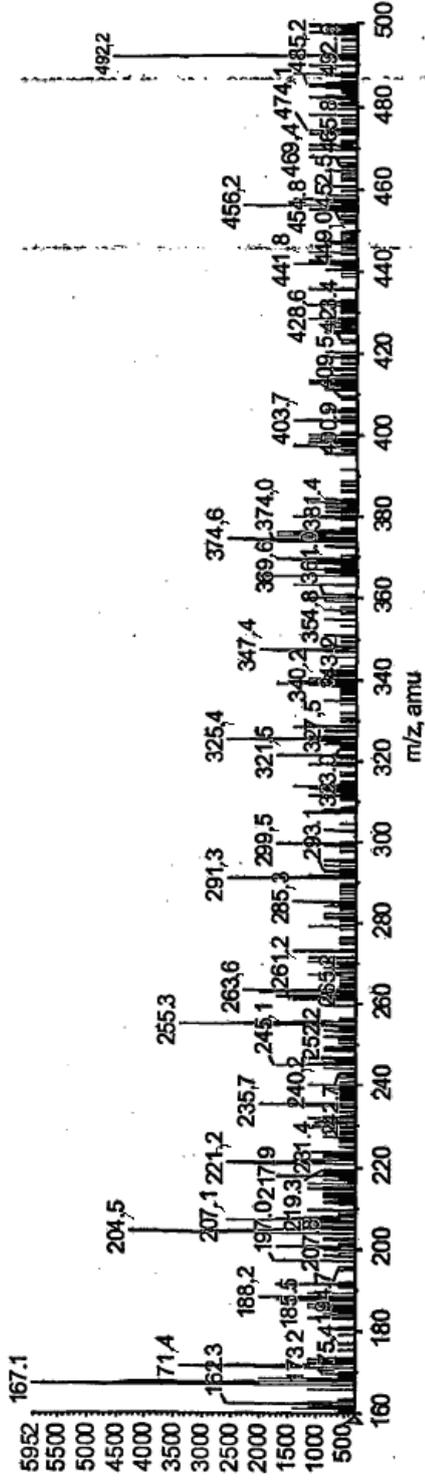
- 5 La detección de los valores normales de ácido 3OMDOPA en una mancha de sangre seca con el sistema actual es problemática debido a que las concentraciones son demasiado bajas. Diferente instrumentación puede abordar esta cuestión.
- Los inventores pueden detectar y medir con precisión alteraciones en la mancha de sangre seca 3OMDOPA dentro del intervalo de diagnóstico esperado (la muestra real del paciente es concluyente).
- Otros compuestos de diagnóstico, por ejemplo glutarilcarnitina, tetradecenoilcarnitina y ADMA, pueden medirse simultáneamente (es decir, en multiplex de acuerdo con la invención).
- 10 La medición del aumento de DBS 3OMDOPA se divulga por primera vez para la detección selectiva en recién nacidos de deficiencias en la actividad de AADC. Los inventores han demostrado que DSS 3OMDOPA aumenta en un paciente recién diagnosticado con deficiencia de AADC. Los inventores han demostrado la capacidad para medir DBS 3OMDOPA, sobre el intervalo de concentración requerido, mediante EMEM de iones en un formato adecuado para la detección selectiva multiplex, tal como detección selectiva en recién nacidos.
- 15 Diversas modificaciones y variaciones de los aspectos y realizaciones descritos en la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para ayudar al diagnóstico de un trastorno en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento:
  - analizar I menos dos características de una muestra proporcionada de dicho sujeto mediante análisis EM
  - en el que la muestra es sangre y, en el que dichas características son indicadores de un trastorno, dichas características seleccionadas de:
    - (i) la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra;
    - (ii) un metabolito comprendido por dicha muestra; y
    - (iii) una actividad enzimática comprendida por dicha muestra,
  - en el que las al menos dos características comprenden
    - (i) la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra y al menos otra característica seleccionada de (ii) y (iii), en el que cada uno de dichas al menos dos características se determina a partir de un análisis multiplexado en la misma muestra única, y
    - en el que el análisis de la composición de aminoácidos de un polipéptido comprendido por dicha muestra comprende
      - (a) añadir una endopeptidasa a dicha muestra, en el que si se analiza una actividad enzimática comprendida dentro de la muestra, se añade la peptidasa a la muestra después de que la actividad enzimática comprendida dentro de la muestra ha tenido la oportunidad de actuar sobre un sustrato añadido,
      - (b) analizar los polipéptidos en dicha muestra después del tratamiento con peptidasa,
      - (c) inferir a partir de (b) información sobre la composición de aminoácidos de dicho polipéptido.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que muestra comprende una mancha de sangre seca.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la muestra está tamponada sólo por los componentes de origen natural de los mismos.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha endopeptidasa es tripsina.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polipéptido comprendido por la muestra es uno o más de la hemoglobina, o mioglobina.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el análisis de un metabolito comprendido por dicha muestra comprende analizar la presencia o ausencia de fenilalanina, octanoilcarnitina, o acilcarnitina.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el análisis de una actividad enzimática comprendida por dicha muestra comprende
  - (a) la adición de un sustrato susceptible a la acción de dicha actividad enzimática a dicha muestra; y
  - (b) analizar la muestra para determinar la presencia o ausencia de dicho sustrato y / o la presencia o ausencia de un producto de la acción de dicha actividad enzimática que actúa sobre dicho sustrato.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que más de un sustrato sensible a la acción de dicha actividad enzimática se añade y se analiza.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho sustrato o sustratos es /son solubles en agua.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que cada dicho sustrato se añade solo en agua.
11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha EM es espectrometría de masas con electropulverización-espectrometría de masas (EMEM).
12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada una de las tres características (i), (ii) y (iii) se analizan.
13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra es una muestra *in vitro*.

Muestra control-Proceso completo sin adición de tripsina

□ +Prec (85.00): Exp 1, 0, 100 a 0.351 min de la muestra 12 (Control) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 5951,8 cps.



□ +NL (46.00): Exp 2, 0, 134 a 0.334 min de la muestra 12 (Control) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 6,6e4 cps.

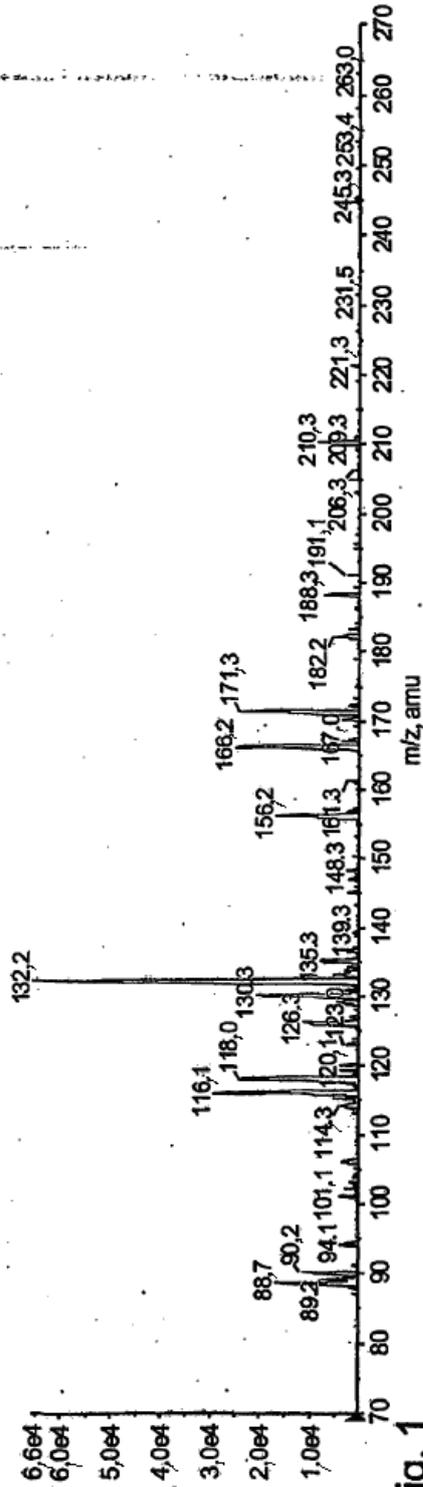
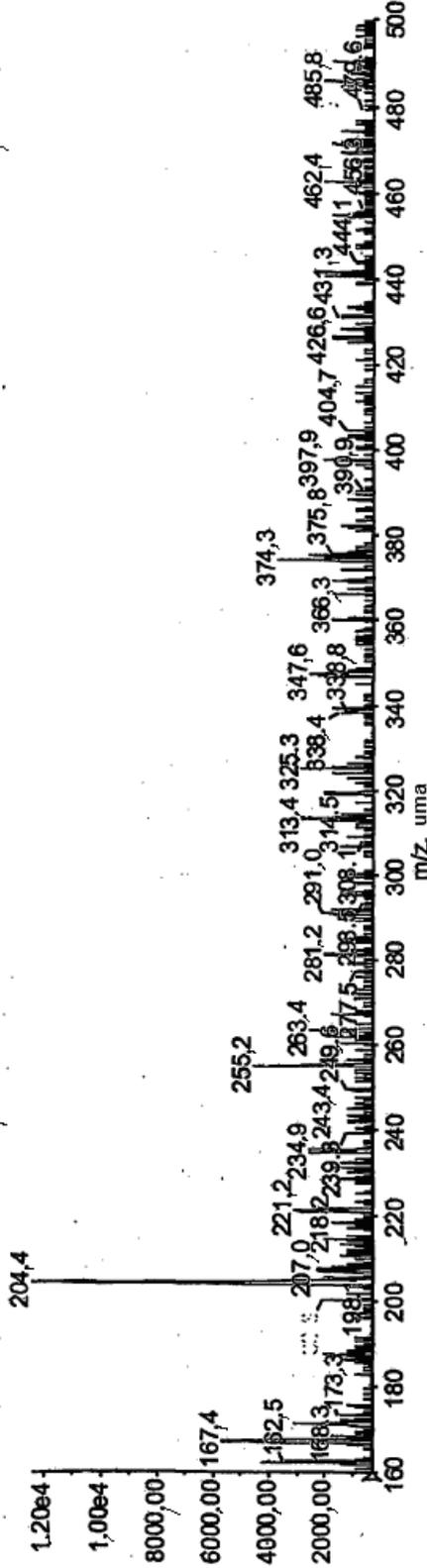


Fig.1

Muestra de fenilcetonuria-Proceso completo pero sin adición de tripsina  
 Fenilalanina incrementada m/z 166,3

□ +Prec (85,00): Exp 1, 0.100 a 1,0.351 min de la muestra 5 (Std 3) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,2e4 cps.



□ +NL (46,00): Exp 2, 0.134 a 1,0.385 min de la muestra 5 (Std 3) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,8e5 cps.

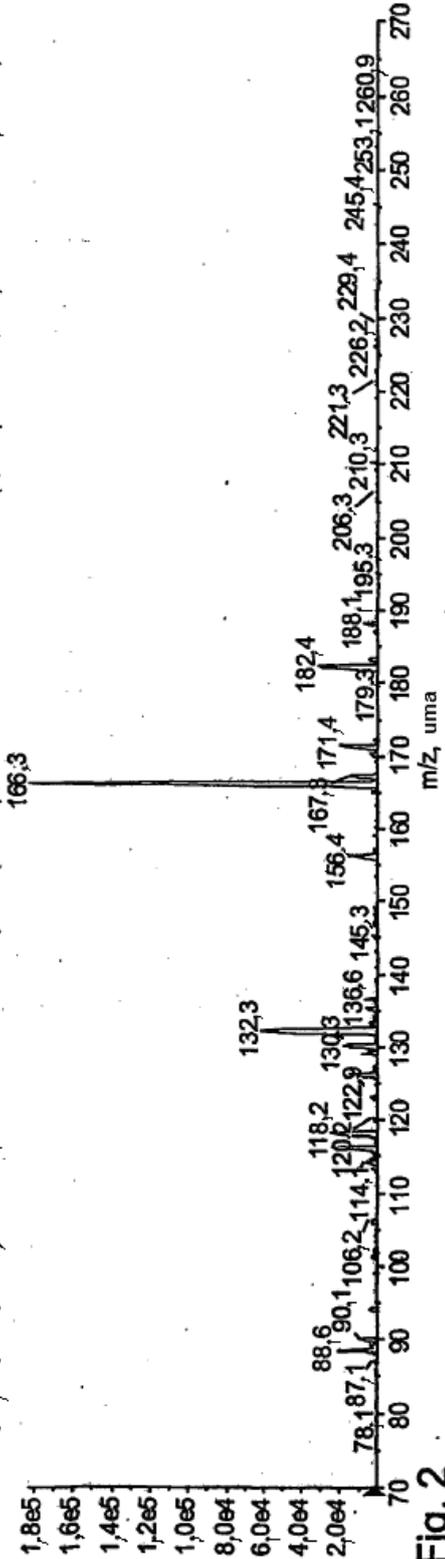
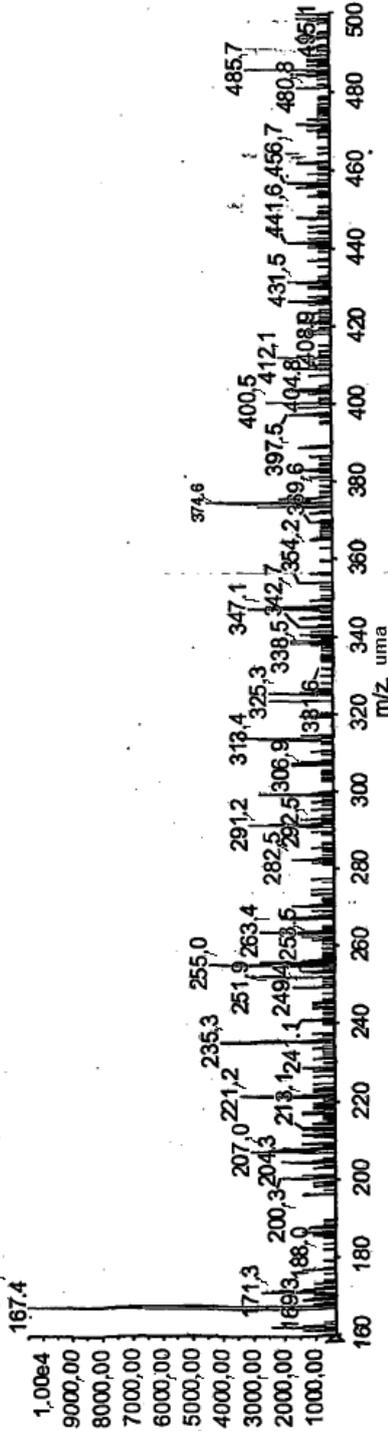


Fig. 2

Muestra de MSUD-Proceso completo pero sin adición de tripsina  
 leucina/soleucina incrementada m/z 132,3

□ +Prec (85.00): Exp 1, 0, 100 a, 0.301 min de la muestra 10 (MSUD QC H) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,1e4 cps.



□ +NL (46.00): Exp 2, 0, 134 a, 0.334 min de la muestra 10 (MSUD QC H) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,2e5 cps.

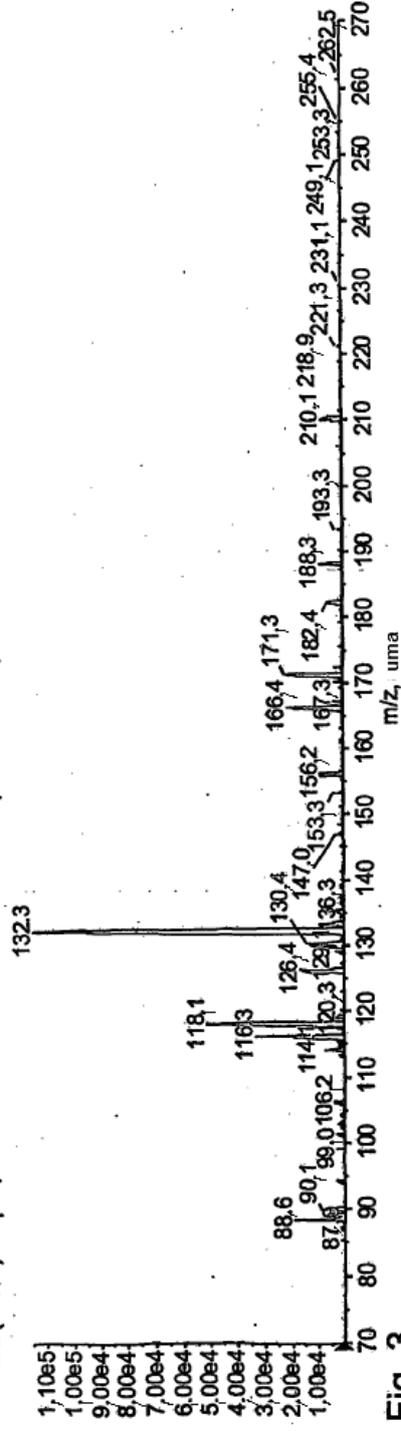
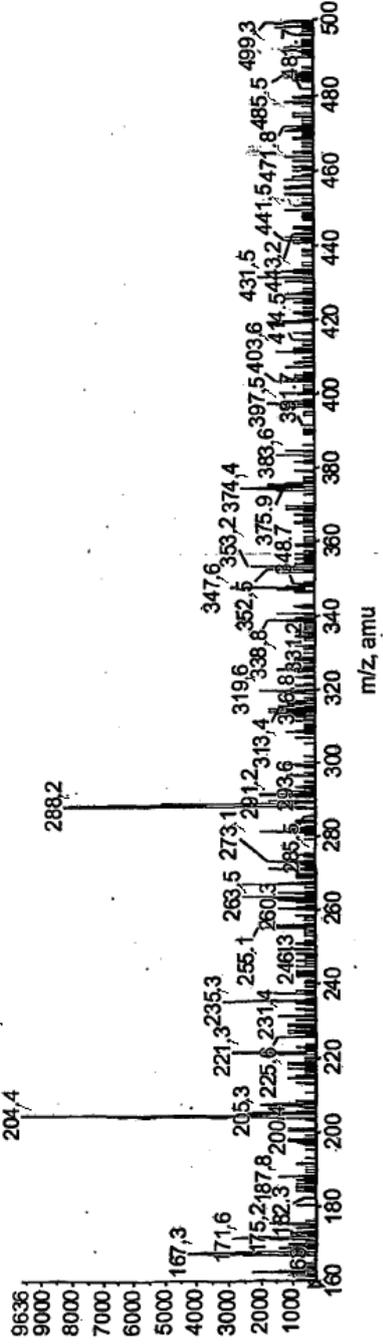


Fig. 3

Muestra de MCADD-Proceso completo pero sin adición de tripsina  
 Octaloilcarnitina incrementada m/z 288,2  
 □ +Prec (85,00): Exp 1, 0, 100 a) 0,351. min de la muestra 18 (MCADD CDC) de 2007-Oct-11 Scan.wif (Turbopulverización) Max. 9636,2 cps.



□ +NL (46,00): Exp 2, 0, 134 a) 0,385 min de la muestra 18 (MCADD CDC) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 4,0e4 cps.

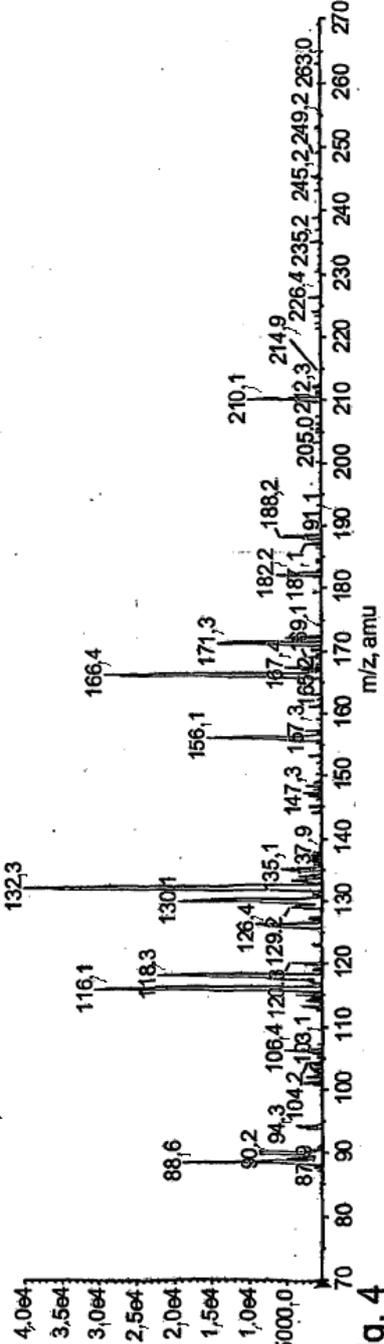
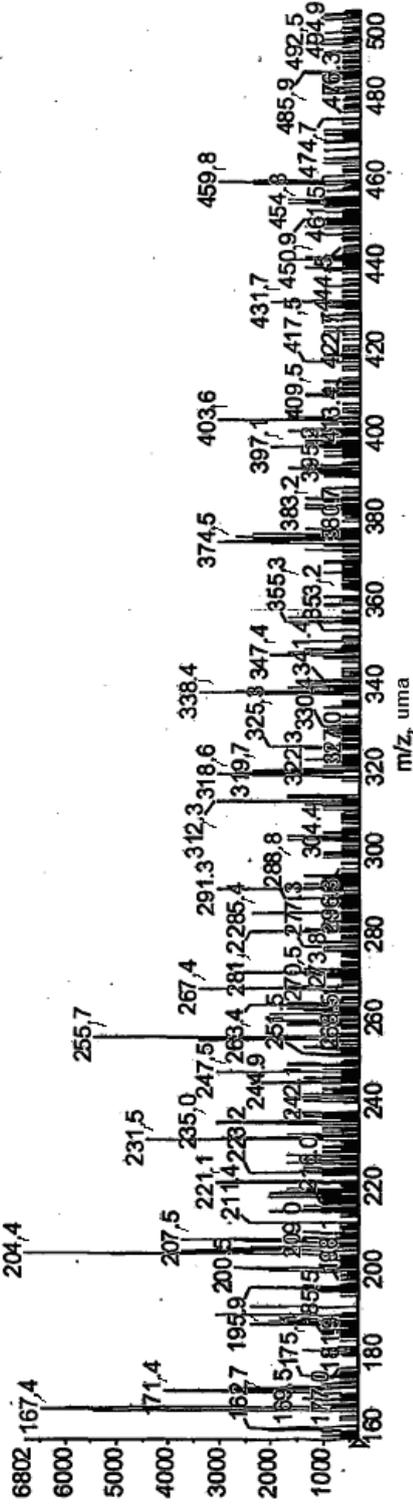


Fig. 4

Muestra control-Proceso completo

□ +Prec (85.00): Exp 1, 0,151 a, 0,351 min de la muestra 36 (Control) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (TurboPulverización) Max. 6802,0 cps.



□ +NL (46.00): Exp 2, 0,134 a, 0,334 min de la muestra 36 (Control) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (TurboPulverización) Max. 1,1e5 cps.

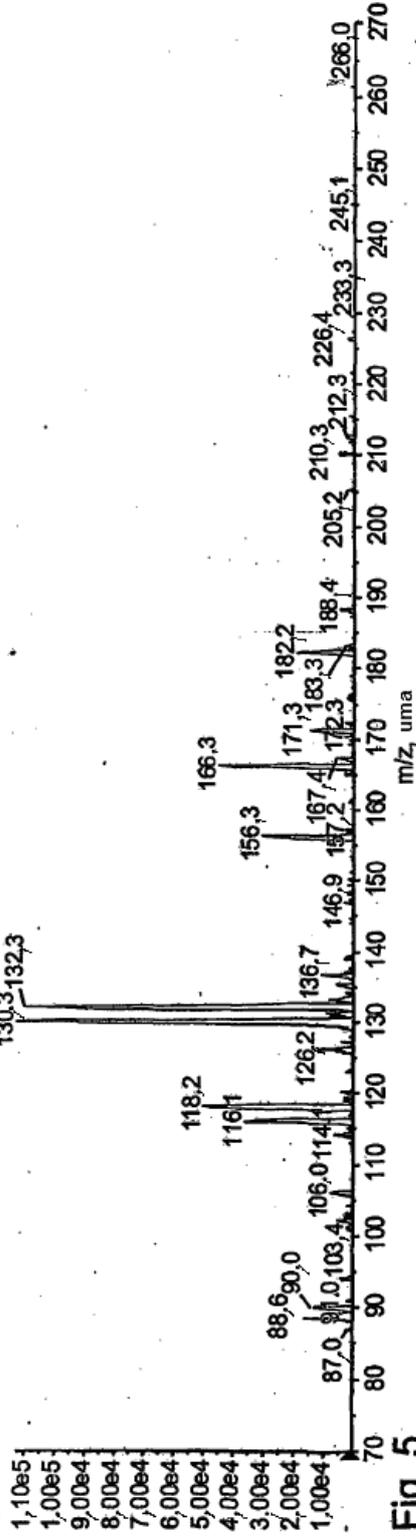
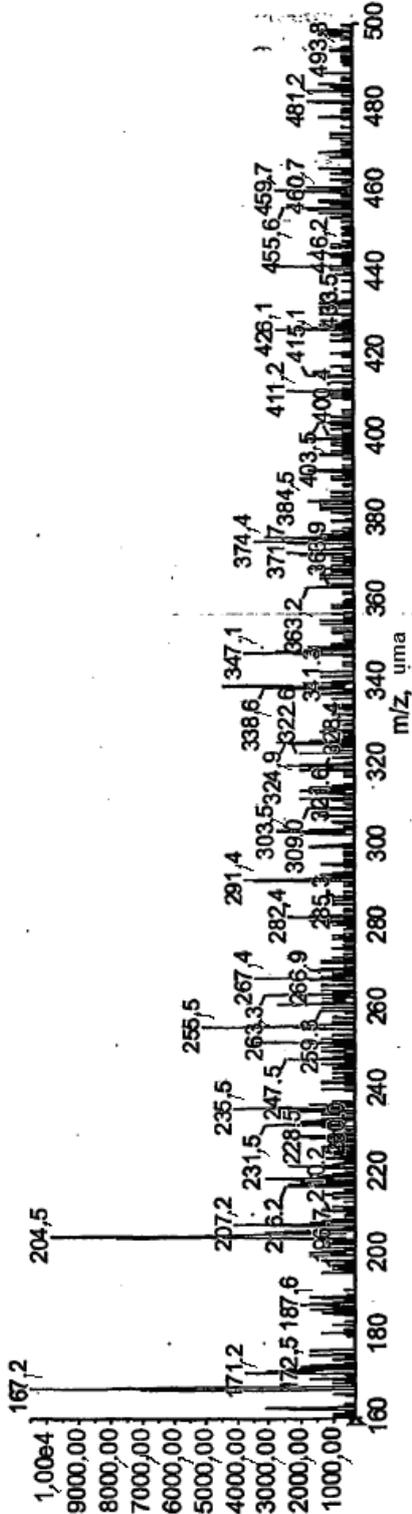


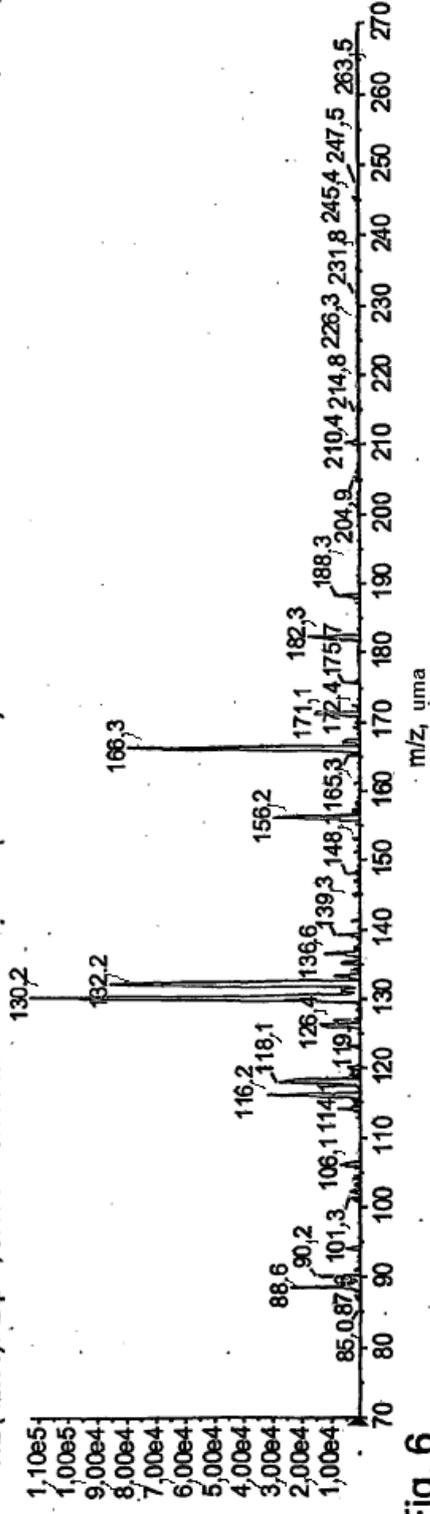
Fig. 5

**Fenilcetonuria-Proceso completo**  
**Fenilalanina incrementada m/z 166,3**

□ +Prec (85.00): Exp 1, 0,151 a 0,351 min de la muestra 44 (PKU NEW) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,1e4 cps.



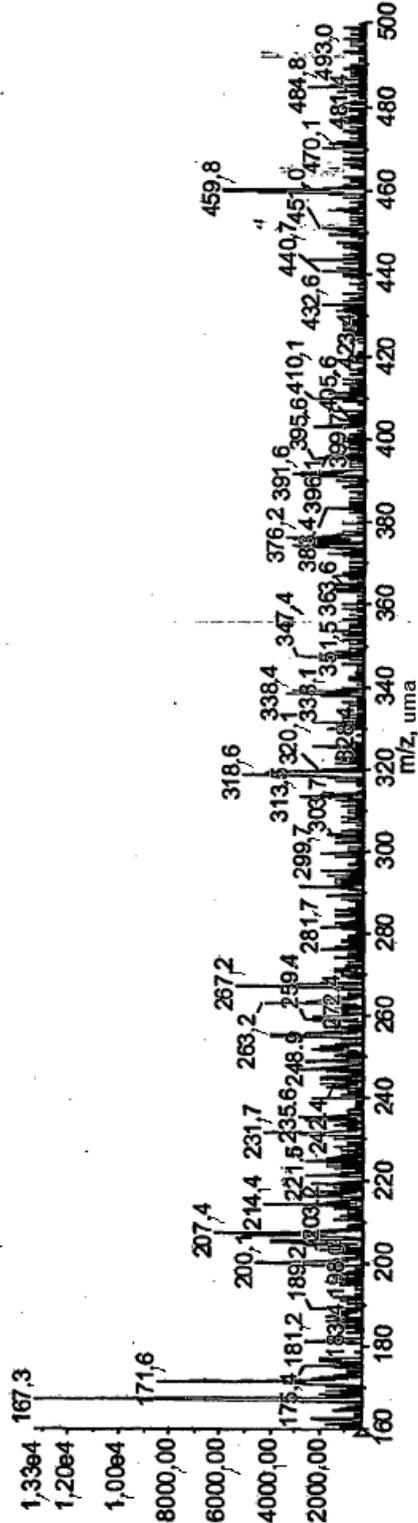
□ +NL (46.00): Exp 2, 0.134 a 0.385 min de la muestra 44 (PKU NEW) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,1e5 cps.



**Fig. 6**

Muestra de MSUD-Proceso completo leucina/isoleucina incrementada m/z 132,2 observe las señales relativas de fenilalanina y alanina (m/z 90,1)

□ +Prec (85.00): Exp 1, 0,151 a, 0,401 min de la muestra 46 (MSUD) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,3e4 cps.



□ +NL (46.00): Exp 2, 0,134 a, 0,334 min de la muestra 46 (MSUD) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 1,6e5 cps.

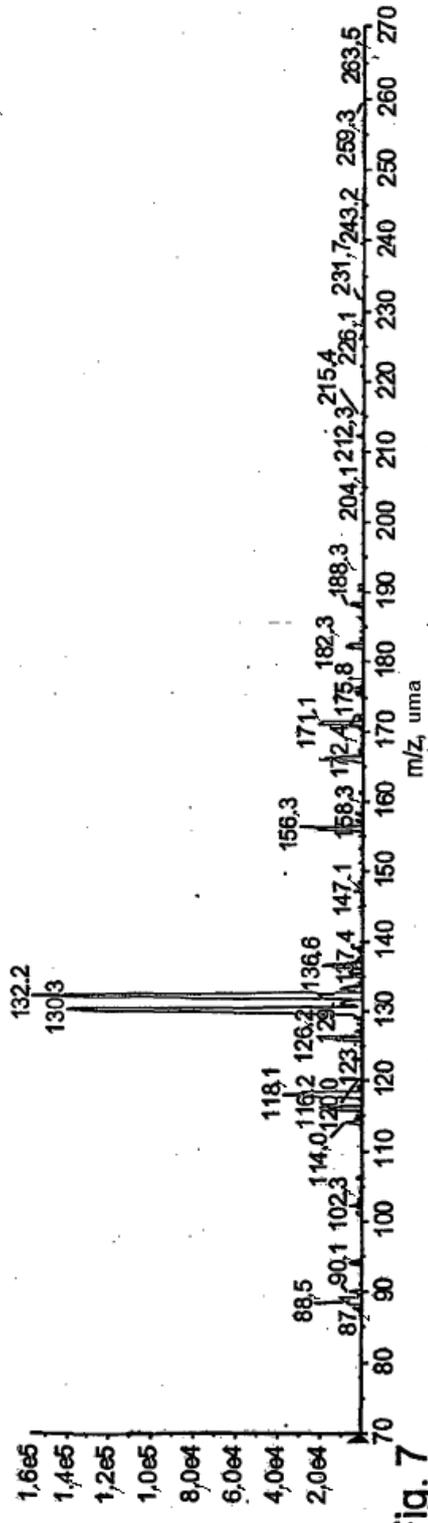
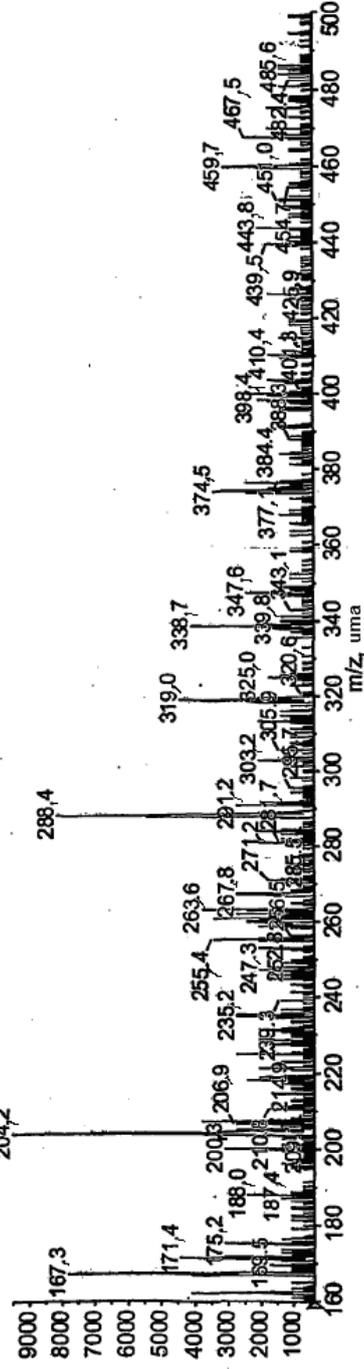


Fig. 7

Muestra de MCADD-Proceso completo sin adición de tripsina  
 Octanoilcarnitina incrementada m/z 288,4

□ +Prec (85,00): Exp 1, 0, 151 a) 0,351 min de la muestra 42 (MCADD CDC) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 9522,8 cps.



□ +NL (46,00): Exp 2, 0, 134 a) 0,385 min de la muestra 42 (MCADD CDC) de 2007-Oct-11 Scan.wiff (Turbopulverización) Max. 9,3e4 cps.

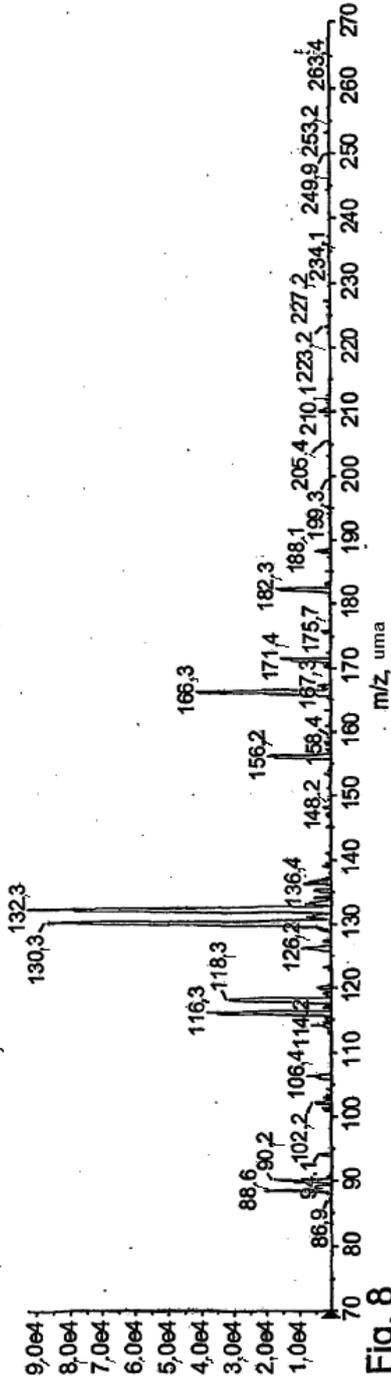


Fig. 8

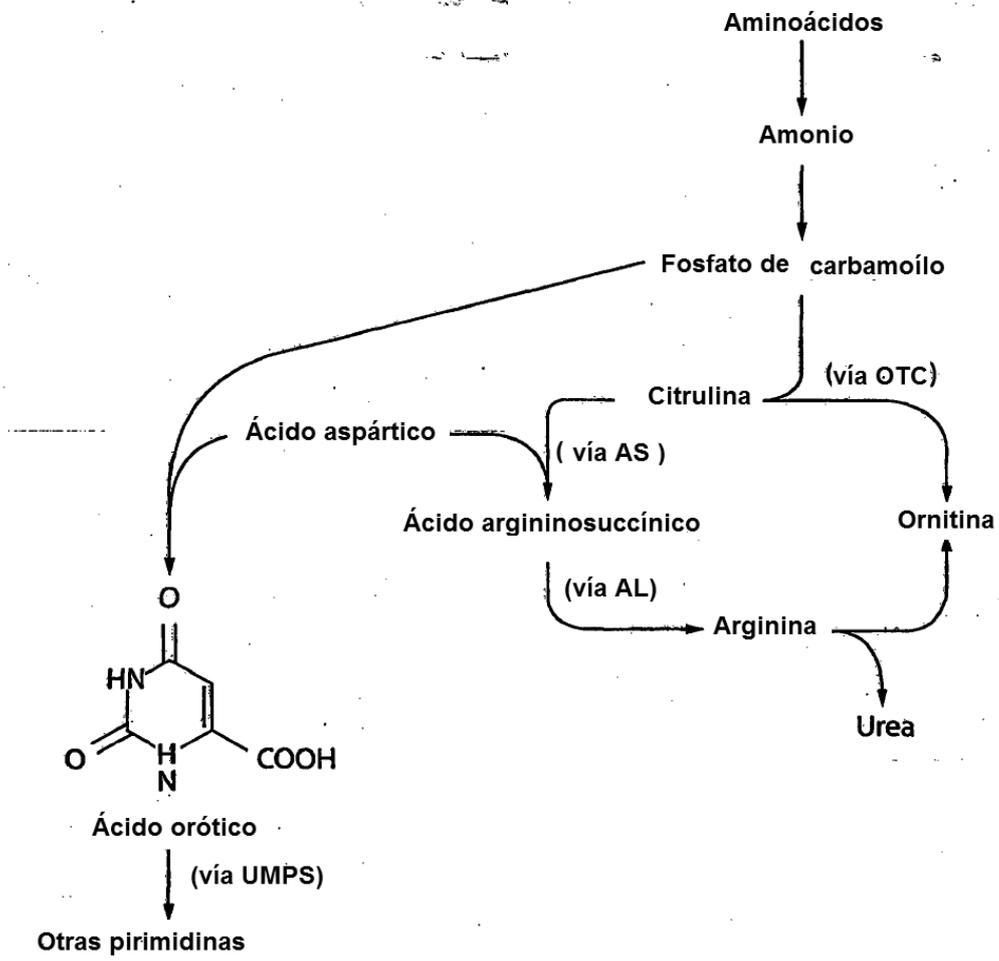
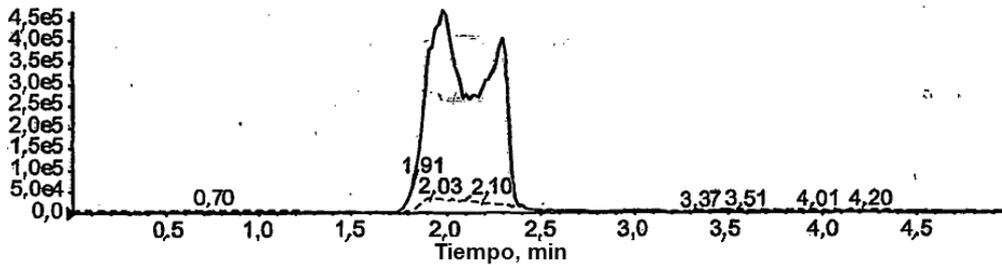


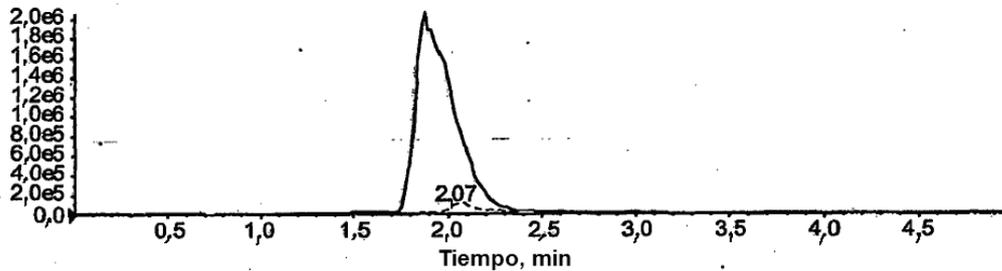
Fig. 9

**Fig. 10 DBS ND control**

□ XIC de RM (2 pares) : Exp 1, 154,9/111,1 uma de la muestra 29 (diagnóstico de MSUD) de metabolito negativo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) **Max. 3,3e4 cps.**

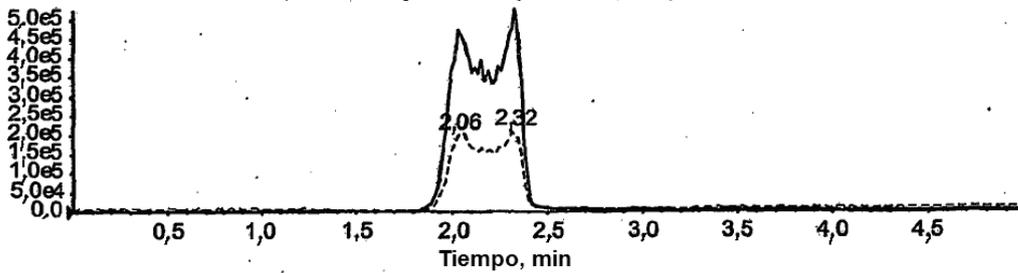


□ XIC de RM (2 pares) : Exp 2, 116,9/72,9 uma de la muestra 29 (diagnóstico de MSUD) de metabolito negativo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) **Max. 1,2e5 cps.**

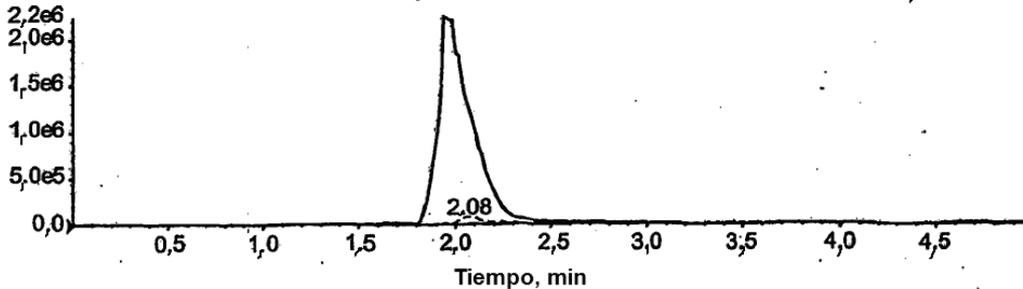


**Fig. 11 DBS control + 25µmol/l Ácido orótico**

□ XIC de RM (2 pares) : Exp 1, 154,9/111,1 uma de la muestra 22 (orótico 25uM) de metabolito negativo; 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) **Max. 2,0e5 cps.**

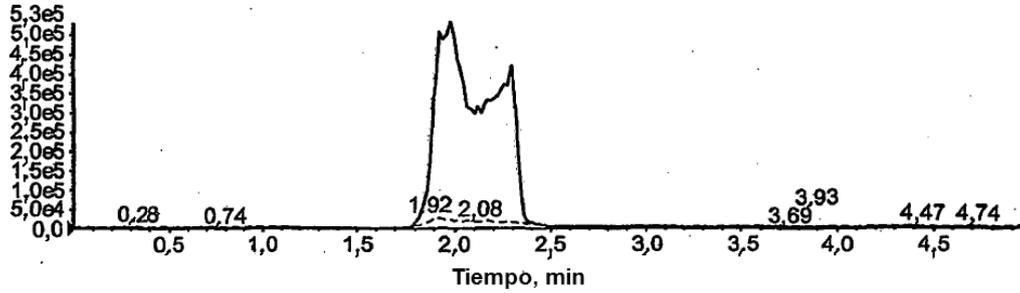


□ XIC de RM (2 pares) : Exp 2, 116,9/72,9 uma de la muestra 22 (orótico 25uM) de metabolito negativo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) **Max. 7,7e4 cps.**

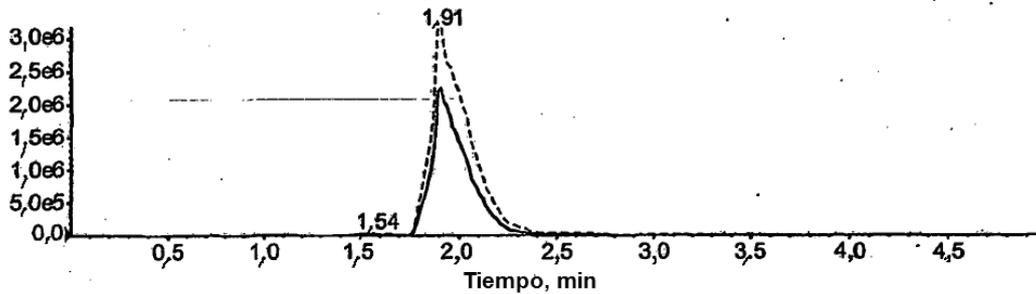


**Fig. 12 DBS MMA**

□ XIC de -MRM (2 pares): Exp 1, 154,9/111,1 umá de la muestra 35 (MMA)  
de metabolito negativo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) Max. 2,6e4 cps.

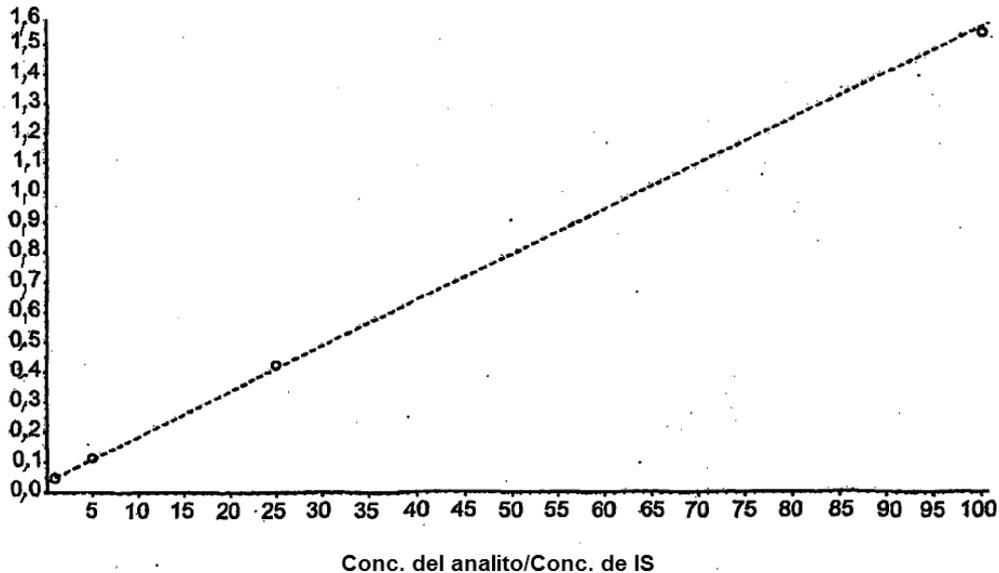


□ XIC de -MRM (2 pares) Exp 2, 116,9/72,9 umá de la muestra 35 (MMA)  
de metabolito negativo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) Max. 3,2e6 cps.



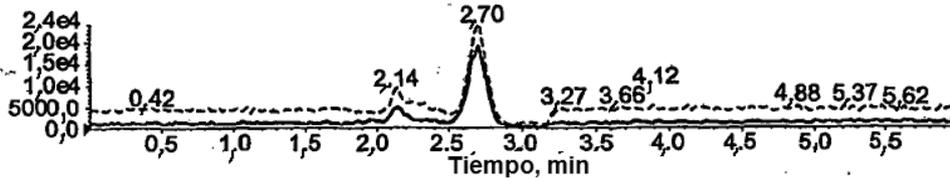
**Fig. 13 Curva patrón de ácido orótico DBS (1-100µmol/l)**

□ Sin título 4 (orótico): Regresión "lineal" ("1 / x" ponderación):  
 $y = 0,0152x + 0,0333$  ( $r = 0,9997$ )

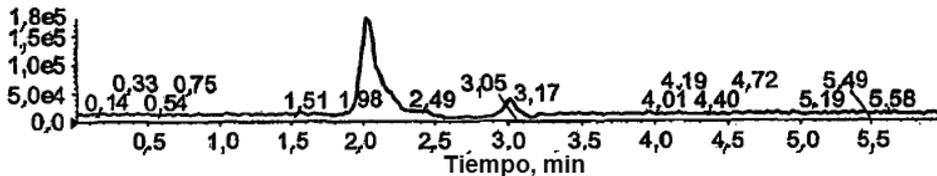


**Fig. 14 Paciente de DBS AADC**

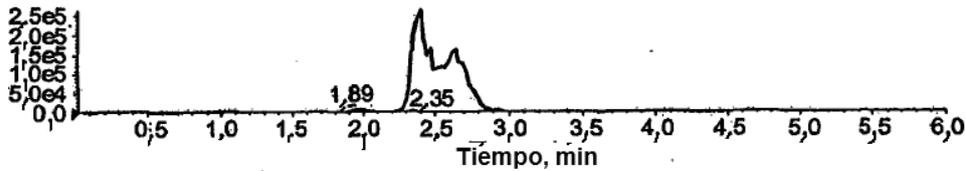
□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 3, 212.2/166.2 uma de la muestra 32 (AADC) Max. 2,4e4 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)



□ XIC of +MRM (2 pares): Exp 5, 276.3/85.1 uma de la muestra 32 (AADC) Max. 1190,0 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)

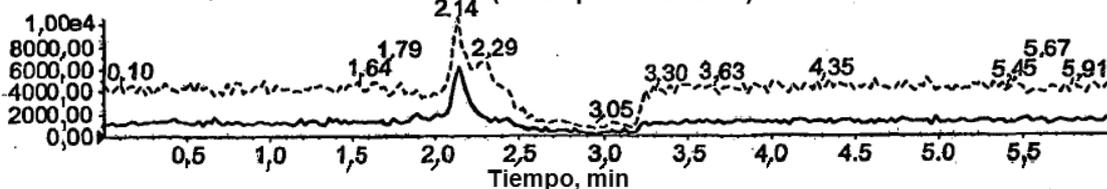


□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 6, 370.3/85.1 uma de la muestra 32 (AADC) Max. 1,9e4 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)

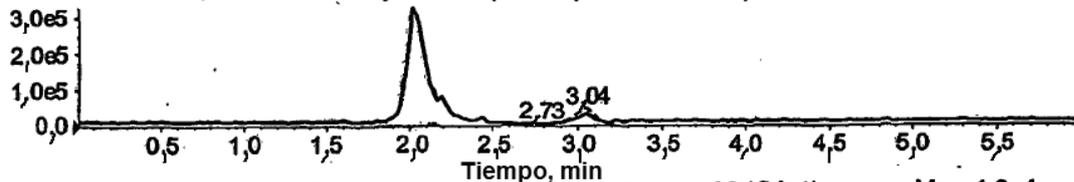


**Fig. 15 Paciente con deficiencia de DBS glutarilCoA deshidrogenasa**

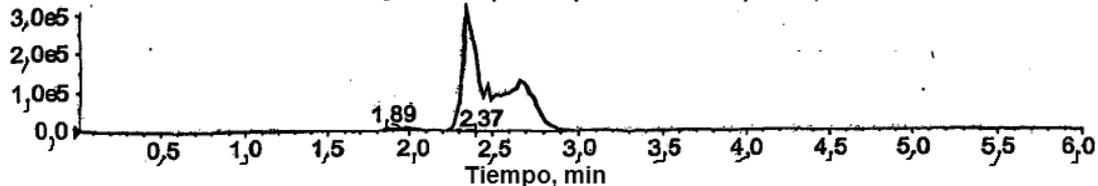
□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 3, 212.2/166.2 uma de la muestra 30 (GA 1) Max. 1,1e4 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)



□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 5, 276.3/85.1 uma de la muestra 30 (GA 1) Max. 5,1e4 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)

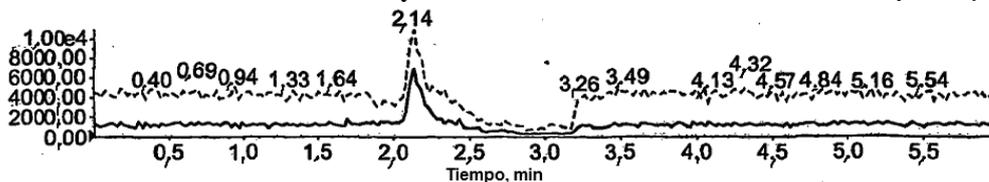


□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 6, 370.3/85.1 uma de la muestra 30 (GA 1) Max. 1,6e4 cps.  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización)

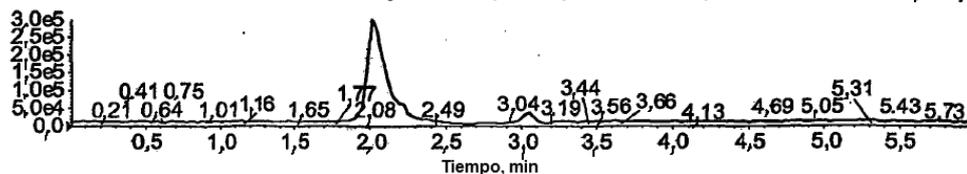


**Fig. 16 Paciente con deficiencia de DBS VLCAD**

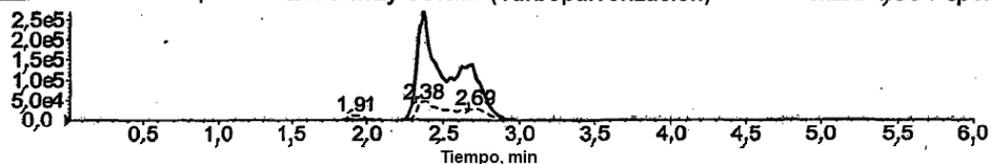
□ XIC de +MRM (2 pares): Exp 3, 212.2/166.2 uma de la muestra 35 (VLCADD)  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) Max. 1,1e4 cps.



□ XIC of +MRM (2 pares): Exp 5, 276.3/85.1 uma de la muestra 35 (VLCADD)  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) Max. 1060,0 cps.



□ XIC of +MRM (2 pares): Exp 6, 370.3/85.1 uma de la muestra 35 (VLCADD)  
de metabolito positivo 2008-May-09.wiff (Turbopulverización) Max. 4,8e4 cps.



**Fig. 17 Curva patrón de DBS 3OMDOPA (1-100µmol/l) cuantificación iones**

□ Sin título 8 (3OMDOPA Q); Regresión "lineal" ("1 / x" ponderación)  
: y = 2,08e+004 x + -2,04e+004 (r = 0,9991)

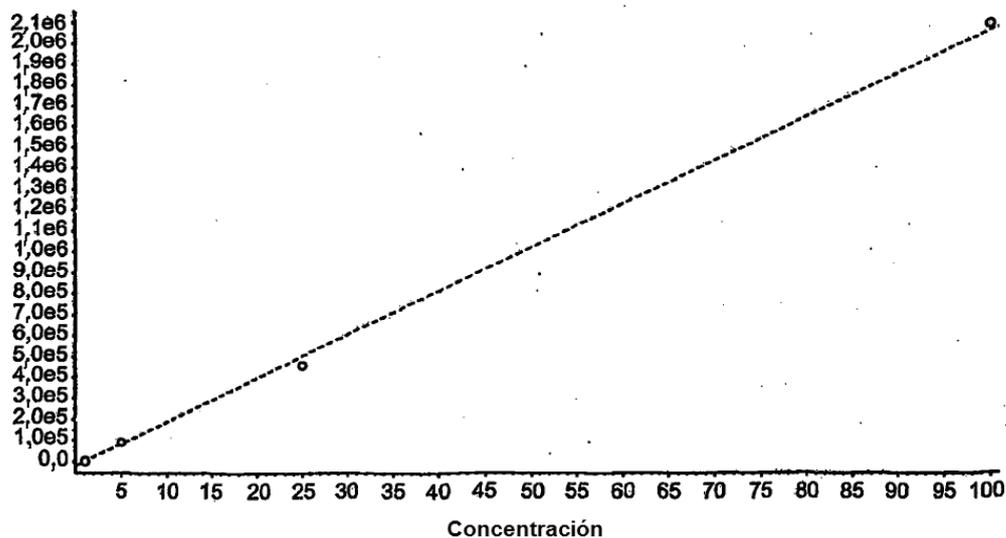


Figure 18- Curva patrón de DBS 20MDOPA (1-100µmol/l) Confirmación iones

□ Sin título 8 (30MDOPA C): Regresión "lineal" ("1/x" ponderación)  
:  $y = 1,68e+004 x + -1,42e+003$  ( $r = 0,9987$ )

