

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 510**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/EP2014/054998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14710251 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2972382**

54 Título: **Detección de compuestos en una mancha de fluido secado mediante MALDI/MS directa**

30 Prioridad:

**14.03.2013 EP 13159111**  
**14.03.2013 US 201361781316 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.10.2017**

73 Titular/es:

**ZENTECH (100.0%)**  
**Avenue du Pré-Aily 10**  
**4031 Angleur, BE**

72 Inventor/es:

**D'ALOIA, MARIA;**  
**SMARGIASSO, NICOLAS;**  
**DEBOIS, DELPHINE y**  
**DE PAUW, EDWIN**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 635 510 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

Detección de compuestos en una mancha de fluido secado mediante MALDI/MS directa

**Campo de la invención**

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método de detección de al menos un compuesto presente en fluidos biológicos. Más concretamente, la invención se refiere a un método de detección y/o identificación de al menos un compuesto presente en una mancha de fluido secado. La invención también se refiere a un método para el análisis de la distribución espacial de un compuesto en una mancha de fluido secado. La presente solicitud describe nuevos métodos para análisis de mancha de fluido secado.

**Descripción de la técnica anterior**

10 **[0002]** En la actualidad, los análisis de fluido se llevan a cabo principalmente en muestras líquidas. Dichas muestras no son fáciles de transportar y la integridad de los compuestos moleculares no puede conservarse durante un largo periodo de tiempo. Con el objetivo de que puedan transportarse más fácilmente y conservarse durante más tiempo, los fluidos pueden secarse en soportes adecuados. Por ejemplo, la mancha de sangre secada (o DBS, por sus siglas en inglés) es una técnica de muestreo de sangre mínima que consiste en transferir  
15 al menos una gotita de sangre sobre un soporte de papel. Por lo general, el soporte de papel está especialmente diseñado para absorber la gotita de sangre para su análisis posterior. Se deja secar al aire la mancha de sangre un par de horas a temperatura ambiente antes de enviarse a laboratorios de análisis. La baja cantidad de muestra de sangre y el fácil manejo de los especímenes han hecho que la técnica de muestreo DBS tenga éxito. Asimismo, permite un almacenamiento simplificado y abarata los costes de transporte. Empezó a tener éxito en  
20 los años sesenta, cuando el Doctor Robert Guthrie desarrolló un ensayo para la detección de la fenilcetonuria. Desde entonces, la "tarjeta de Guthrie" se ha adoptado en todo el mundo para el cribado neonatal de bebés. Las ventajas del muestreo de sangre con un soporte celulósico (método menos invasivo mediante la utilización de un volumen de sangre menor) eran especialmente adecuadas para pacientes pediátricos pero también son atractivas para ensayos clínicos y preclínicos (cumplimiento de las 3 erres: reemplazo, refinamiento y reducción).  
25 Actualmente, la utilización de la técnica de muestreo de mancha secada se extiende a otros fluidos biológicos, tales como suero, plasma u orina.

**[0003]** Por ejemplo, tanto el cribado neonatal como las actividades farmacéuticas han adoptado la tecnología de espectrometría de masas (o MS, por sus siglas en inglés) para el análisis de mancha de sangre secada. Hasta  
30 hace poco, todavía eran necesarias diversas etapas de extracción en un medio líquido y de separación, lo que conlleva una larga preparación de la muestra antes de que pueda realizarse el análisis MS. La extracción de líquido de un punzón que se toma de una muestra de mancha de sangre secada se lleva a cabo, por lo general, mediante la utilización de una mezcla de disolventes acuosos y orgánicos, después de lo cual se realiza la separación de cromatografía de líquidos (CL). Debido a la presencia de una etapa de extracción de líquido y/o  
35 una etapa de separación, la muestra puede contaminarse y/o los compuestos presentes en la muestra pueden dañarse durante una de estas etapas. Con el fin de solventar estos problemas relacionados con la preparación y la manipulación de muestras, cuya importancia es vital en el ámbito farmacéutico y de la diagnosis, se desarrollaron técnicas novedosas y directas (revisado en Déglon et al., 2012 [Anal Bioanal Chem 2012, 402:2485-2498]). Los avances técnicos se centraban principalmente en el análisis rápido de DBS, bien mediante elución directa (p. ej., extracción de líquido en línea), bien mediante desorción/ionización directa. El método anterior es la solución más rápida (no se necesita tratamiento previo), que es adecuado, concretamente, para el análisis de alto rendimiento de mancha de fluido secado. En este contexto, se iniciaron diversos métodos de MS ambientales, desarrollados a partir de diferentes técnicas de ionización básicas: Ionización por desorción con *electrospray* (DESI, por sus siglas en inglés) e ionización por *spray* en papel (PSI, por sus siglas en inglés) en la ionización por *electrospray* (ESI, por sus siglas en inglés), análisis directo en tiempo real (DART, por sus siglas  
45 en inglés) en la ionización por gas descargado (GDI, por sus siglas en inglés) e ionización química con desorción térmica a presión atmosférica (APTDCI, por sus siglas en inglés) en la ionización por impacto de electrones (EI, por sus siglas en inglés).

50 **[0004]** Dichos métodos de MS se utilizan para analizar diferentes manchas de fluido secado, pero con enormes limitaciones. Por ejemplo, diversos factores pueden afectar a la distribución de analitos en la mancha de sangre secada, tales como el volumen de mancha de sangre, el nivel de hematocrito y las propiedades de difusión (efecto cromatográfico). Estos factores pueden afectar al ensayo de analitos mediante desorción/ionización directa. La formación de imágenes de distribución de analitos es un método útil para dirigir el desarrollo de estos  
55 ensayos de analitos. Sin embargo, la formación de imágenes de distribución de analitos en mancha de sangre secada ha sido realizada por. La sensibilidad y la resolución de la autorradiografía todavía no son suficientes para un análisis fiable. Por consiguiente, los métodos de desorción/ionización directa para el análisis de muestra de mancha secada están limitados debido a una baja sensibilidad y/o una baja resolución del método de formación de imágenes, lo que conlleva imprecisiones en la detección de analitos. La preparación de las  
60 muestras y su análisis posterior siguen siendo problemas fundamentales que limitan la utilización de estos métodos en el ámbito de los análisis de mancha secada.

**[0005]** En consecuencia, se necesita un método de MS simple, rápido y fiable para detectar un compuesto presente en una mancha secada sin tratamiento previo. Asimismo, también se necesita un método de MS que permita la formación de imágenes de compuestos en mancha secada sin utilizar marcas específicas y con una sensibilidad y resolución de masa altas, sin ser demasiado sensibles a contaminantes biológicos.

#### Sumario de la invención

**[0006]** Por lo tanto, en este contexto, el objeto de la presente invención es solucionar al menos parcialmente los problemas del estado de la técnica dando a conocer un método para la detección de al menos un compuesto presente en una muestra de fluido, preferiblemente sin una etapa de extracción de líquido, finalmente con una etapa de transferencia que mantiene la distribución espacial de los compuestos presentes en una mancha secada y que permite una determinación posterior de su distribución espacial mediante herramientas de formación de imágenes moleculares.

**[0007]** Según un primer aspecto de la invención, se da a conocer un método para detectar al menos un compuesto presente en fluidos biológicos, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- a. suministrar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte,
- b. fijar al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte en una superficie conductora,
- c. suministrar una solución acuosa u orgánica de un compuesto de absorción de luz ultravioleta,
- d. depositar dicho compuesto de absorción de luz ultravioleta en al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte fijada en dicha superficie conductora,
- e. someter al menos una zona de dicha mancha de fluido secado sobre un soporte a un proceso de desorción/ionización láser asistida por matriz para producir iones,
- f. obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de dichos iones mediante un analizador de espectrometría de masas y,
- g. determinar la presencia del al menos un compuesto mediante el análisis del espectro de masa en modo de barrido completo.

**[0008]** Dicho método permite una detección y visualización rápida y fiable de al menos un compuesto presente en una mancha de fluido secado, sin ninguna etapa de tratamiento previo antes de un análisis mediante MS. Los presentes inventores han descubierto que el análisis directo de una mancha de fluido secado en un soporte mediante la espectrometría de masas MALDI supera las limitaciones de la técnica anterior. El presente solicitante descubrió que los compuestos presentes en una muestra de fluido pueden analizarse fácil y rápidamente sin ninguna etapa de extracción de líquido y separación, lo que es ventajoso, puesto que la preparación de la muestra es más rápida y la ausencia de una etapa de extracción de líquido de los compuestos presentes en una mancha de fluido secado impide una contaminación potencial y/o una degradación de los compuestos. Dicho de otro modo, el método de la invención no comprende ninguna etapa de extracción de líquido ni de separación de un compuesto presente en una mancha de fluido secado. Al menos una parte de la mancha de fluido secado sobre un soporte está fijada en una superficie conductora, sin ninguna etapa de digestión ni de extracción de líquido de una mancha de fluido secado tras la deposición de al menos una gota de fluido en dicho soporte.

**[0009]** En otro modo de realización, la invención se refiere a un método para la detección de al menos un compuesto presente en fluidos, donde se lleva a cabo una etapa adicional de transferencia de al menos un compuesto presente en una mancha de fluido secado sobre una membrana. En consecuencia, tras el suministro de al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte, dicho método comprende las etapas siguientes de:

- transferencia de al menos un compuesto desde la mancha de fluido secado sobre una membrana,
- fijación de al menos una parte de dicha membrana en una superficie conductora.

**[0010]** El análisis directo de una mancha de fluido secado sobre un soporte mediante la espectrometría de masas MALDI podría ser desafiante para algunas aplicaciones y/o compuestos debido al grosor del soporte de papel original. El enfoque indirecto propuesto podría solventar este problema mediante la transferencia de al menos un compuesto sobre un soporte más fino, tal como una membrana de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés). Este modo de realización permite solventar el problema relacionado con el grosor al tiempo que se conserva en la membrana la localización espacial de los compuestos por analizar en la mancha de fluido secado.

**[0011]** En un modo de realización preferido, la presente invención se refiere a un método para determinar posteriormente la distribución espacial de un compuesto en una mancha de fluido secado, comprendiendo el método las etapas adicionales de:

- obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de iones en al menos dos zonas presentes en una mancha de fluido secado, estando una primera zona más próxima a un centro de dicha zona de mancha de fluido secado en relación con una segunda zona,
- seleccionar una relación masa/carga (m/z) precisa correspondiente a una relación masa/carga calculada de al menos un compuesto por detectarse en la dicha zona de mancha de fluido secado,
- determinar una distribución espacial del compuesto en la mancha de fluido secado.

**[0012]** Este modo de realización preferido permite correlacionar la presencia de un compuesto con su distribución espacial en la mancha de fluido secado. Esto es ventajoso, puesto que una diferencia considerable de localización de compuesto entre zonas centrales y periféricas en una mancha de fluido secado puede afectar a los resultados de un ensayo de MS. Los ensayos de distribución de compuestos pueden ser de ayuda para guiar y optimizar el desarrollo de la desorción/ionización de MS local. Además, este modo de realización preferido permite correlacionar la naturaleza, la concentración y la localización espacial de un compuesto elegido en una mancha de fluido secado.

**[0013]** Preferiblemente, el compuesto objeto de análisis mediante el método según la invención es un compuesto en fluidos con una relación masa/carga calculada comprendida entre 100 m/z y 1500 m/z.

**[0014]** De hecho, el método según la invención es especialmente relevante cuando el compuesto tenga una relación masa/carga comprendida entre 100 m/z y 1500 m/z. Con el método de la invención, estos compuestos pueden identificarse fácil y rápidamente en una muestra de fluido secado, a partir de la relación masa/carga precisa medida.

**[0015]** Las reivindicaciones independientes definen la invención. Las reivindicaciones dependientes definen modos de realización ventajosos.

#### Breve descripción de los dibujos

**[0016]** Estos y otros aspectos de la invención se explicarán con más detalle a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una representación esquemática de un experimento con espectrometría de masas MALDI directa en una mancha de sangre secada según un aspecto de la invención.

La figura 2 muestra espectros de masa MALDI FT-ICR de lípidos de mancha de sangre secada: (a) Espectro de masa promediado de la zona 57,75 - 1500 m/z; (b) vista ampliada de la zona 350-550 m/z; (c) vista ampliada de la zona 550-750 m/z; (d) vista ampliada de la zona 750-950 m/z. La anotación de espectro de masa (1-35) corresponde a la asignación de lípidos de la tabla 1.

La figura 3 muestra espectros de masa MALDI FT-ICR de dos compuestos farmacológicos pequeños en una mancha de sangre secada. (a) Espectro de masa promediado de la zona 248 - 287 m/z que muestra el ion  $[M+H]^+$  de dextrometorfano (500, 100 y 20 picomol/L); (b) Espectro de masa promediado de la zona 628 - 656 m/z que muestra el ion  $[M+H]^+$  de amiodarona (500 y 100 picomol/L).

La figura 4 muestra una mancha de sangre secada sobre un soporte celulósico, una membrana de PVDF transferida y el espectro de masa llevado a cabo mediante el método sobre la membrana. (a) imagen óptica de una mancha de sangre secada; (b) imagen óptica de una membrana transferida tintada con negro de Amido 10B; (c) espectro de masa promediado de la zona 200 - 1400 m/z; (d) vista ampliada de la zona 750-800 m/z. La anotación de espectro de masa (14-23) corresponde a la asignación de lípidos de la tabla 1.

La figura 5 muestra una mancha de sangre secada sobre un soporte celulósico y el espectro de masa llevado a cabo mediante el método de la invención. (a) imagen óptica de una mancha de sangre secada; (b) espectro de masa MALDI FT-ICR promediado obtenido mediante un análisis de la mitad derecha de la mancha de sangre secada; (c) a (f) son imágenes de iones de 4 compuestos diferentes.

**[0017]** Los dibujos de las figuras no están dibujados a escala ni son proporcionales. Por lo general, los componentes idénticos se indican con los mismos números de referencia en las figuras.

#### Descripción detallada de modos de realización de la invención

**[0018]** Por desorción e ionización láser asistida por matriz y desorción, debe entenderse que MALDI es una técnica de ionización suave que se basa en la capacidad que tienen los láseres para desorber las moléculas de analito de las superficies (técnica basada en desorción/ionización láser [LDI, por sus siglas en inglés]). La utilización de matriz ayuda a extraer una porción de muestra por medio de intensos pulsos de láser durante una duración corta. Los conocimientos fundamentales de MALDI requieren dos etapas (Hoffmann y Stroobant 2007 [En Mass Spectrometry: Principles and Applications, John Wiley & Sons Ltd]). En la primera, la muestra objeto de análisis se mezcla con una solución de matriz y se deja secar la mezcla, que da lugar a "cristales de matriz dopados con analitos". La segunda etapa se da dentro de la fuente de espectrometría de masas donde los pulsos de láser provocan el calentamiento, la sublimación y la ablación de los cristales de matriz. Las moléculas

de analito se arrastran hacia la pluma de la matriz, se ionizan y, a continuación, se transfieren (iones intactos en fase gaseosa) al espectrómetro de masas. La fuente MALDI se utiliza principalmente en combinación con un analizador de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) pero también podría combinarse con un analizador de masas cuadrupolo-trampa de iones-TOF (MALDI-QIT-TOF, por sus siglas en inglés), con un analizador de masas de resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier (MALDI-FT-ICR, por sus siglas en inglés), con un analizador de masas de trampa de iones lineal Orbitrap (MALDI-LTQ-Orbitrap, por sus siglas en inglés) y con un analizador de masas cuadrupolo Orbitrap (MALDI-Q-Orbitrap, por sus siglas en inglés).

**[0019]** Hasta hace poco, MALDI era exclusivamente una fuente iónica de vacío donde los iones se formaban en el interior del sistema de vacío del espectrómetro de masas ( $< 10^{-3}$  torr). Con la invención de MALDI a presión atmosférica (AP-MALDI, por sus siglas en inglés), la ionización tiene lugar a una presión atmosférica normal. El proceso de ionización es similar en ambas fuentes, pero difieren en algunos aspectos. Por ejemplo, AP-MALDI es una técnica de ionización más suave; los iones muestran menos fragmentación a una presión de fuente elevada (hasta varios torr). Además, la fuente AP-MALDI ofrece la ventaja de ser externa al espectrómetro de masas, lo que permite un cribado de alto rendimiento. Sin embargo, AP-MALDI es menos sensible que MALDI convencional. Los iones también pueden generarse a una presión inferior a la atmosférica ( $\sim 3,5$  torr): un caso intermedio entre MALDI convencional y AP-MALDI. Este método de presión intermedia ofrece una compensación entre una buena sensibilidad (MALDI) y una ionización suave (AP-MALDI).

**[0020]** Un analizador de masas de alta resolución, p.ej., FT-ICR, permite determinar la masa precisa. La precisión de la masa se expresa normalmente en partes por millón (ppm) e indica la desviación de la respuesta instrumental a partir de una masa monoisotópica conocida. Los instrumentos FT-ICR proporcionan la precisión de masa más alta ( $<1$  ppm). La identificación de compuestos pequeños desconocidos en muestras complejas requiere la determinación de las masas precisas de los compuestos. A partir de esta información, se calculan composiciones elementales posibles (o teóricas). Una tolerancia de errores en la masa pequeña ayuda a reducir el número de fórmulas candidatas o incluso a encontrar la fórmula molecular correcta de un compuesto desconocido. El término masa precisa se utiliza para definir la masa medida experimentalmente, mientras que la masa exacta define el valor verdadero calculado. En espectrometría de masas, la masa monoisotópica se utiliza, por lo general, para calcular la masa exacta de un compuesto; tiene en consideración la masa exacta del isótopo más abundante para cada elemento constituyente. Un espectrómetro de masas mide una relación masa/carga, m/z.

**[0021]** Por fluido biológico, se entiende cualquier fluido corporal humano o animal comprendidos, pero sin carácter limitativo, sangre, suero, plasma, orina, saliva o bilis.

**[0022]** Por mancha de fluido secado sobre un soporte, se entiende el muestreo de fluido biológico sobre cualquier tipo de soporte celulósico absorbente. El soporte podría ser un papel especialmente fabricado validado de conformidad con los requisitos de las normas consensuadas (características de absorción homogénea excelentes). Para algunas aplicaciones que requieren una separación de componentes de fluido biológico, el soporte podría ser también cualquier papel cromatográfico, tales como los que se utilizan para pruebas de diagnóstico rápido (tiras de papel).

**[0023]** Por espectro de masa, se debe entender un espectro obtenido cuando los iones (normalmente en un haz) se separan de acuerdo con las relaciones masa/carga (m/z) de las especies iónicas presentes. Este gráfico es una representación gráfica de m/z frente a la información de abundancia medida (Price 1991 [J Am Soc Mass Spectrom, 2, 336-348]).

**[0024]** Por modo de barrido completo, debe entenderse un método que describe la operación de un espectrómetro de masas en el que las corrientes iónicas se registran durante el espectro de masas completo.

**[0025]** Por pico, debe entenderse que un pico representa la intensidad de señal de un ion detectado en un espectro.

**[0026]** Por ionización, debe entenderse un proceso que produce un ion a partir de un átomo o molécula neutros (Price 1991 [J Am Soc Mass Spectrom, 2, 336-348]).

**[0027]** Por zona, debe entenderse que una zona representa una parte de una muestra por analizar (es decir, una mancha de sangre secada), siendo dicha parte suficientemente grande para obtener al menos un espectro de masa después de una etapa MALDI. Una zona puede ser sustancialmente circular, con un diámetro comprendido entre 1 y 15 mm. Cuando se transfiere al menos un compuesto desde una mancha de fluido secado sobre una membrana, una zona se refiere a la zona correspondiente de la mancha de fluido secado que se ha transferido sobre la membrana.

**[0028]** Por relación masa/carga, m/z, debe entenderse la cantidad adimensional formada mediante la división de

la masa de un ion por el número de cargas soportadas por el ion (Price 1991 [J Am Soc Mass Spectrom, 2, 336-348]).

5 **[0029]** Según un primer aspecto de la invención, se da a conocer un método para detectar al menos un compuesto presente en fluidos, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- a. suministrar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte,
- b. fijar al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte en una superficie conductora,
- 10 c. suministrar una solución acuosa u orgánica de un compuesto de absorción de luz ultravioleta,
- d. depositar dicho compuesto de absorción de luz ultravioleta en al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte fijada en dicha superficie conductora,
- e. someter al menos una zona de dicha mancha de fluido secado sobre un soporte a un proceso de desorción/ionización láser asistida por matriz para producir iones,
- 15 f. obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de dichos iones mediante un analizador de masas y,
- g. determinar la presencia del al menos un compuesto mediante el análisis del espectro de masa en modo de barrido completo.

20 **[0030]** La muestra de fluido puede proceder de un paciente recién nacido, un niño, un adulto o un animal. Cuando la muestra de fluido sea sangre, puede recogerse, por ejemplo, mediante una punción en un talón con una lanceta para sangre estéril, por ejemplo. Una gota de fluido obtenida se deposita sobre un soporte. Sin embargo, alternativamente, puede depositarse más de una mancha de fluido sobre un soporte, cada una separada espacialmente de las otras. El soporte puede ser cualquier tipo de soporte que permita un secado homogéneo del fluido en el soporte. Por ejemplo, el soporte puede ser un papel de filtro, un papel celulósico, una  
25 "tarjeta de Guthrie" o un papel Whatman 903. En un modo de realización alternativo, el fluido tiene que saturar ambos lados del soporte. En otro modo de realización alternativo, el soporte puede ser cualquier tipo de papel cromatográfico que permita la separación de los componentes del fluido. Por ejemplo, el soporte puede ser una tira de papel cromatográfico utilizada para una prueba de diagnóstico rápida. A continuación, se deja secar al aire la mancha de fluido depositada durante, normalmente, al menos dos horas a temperatura ambiente. A  
30 continuación, el soporte puede almacenarse en sobres sellados o recipientes que los protegerán de contaminantes. La mancha de fluido secado puede almacenarse durante un periodo comprendido entre al menos varias semanas y varios meses a una temperatura comprendida entre -20 °C y 23 °C, en función de la naturaleza del compuesto objeto de análisis. En un modo de realización preferido, la mancha de fluido secado es una  
35 mancha de sangre seca.

**[0031]** En un modo de realización alternativo, la etapa de suministrar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte comprende las etapas de:

- suministrar una muestra de fluido líquida,
- 40 • depositar al menos una gota de fluido de dicha muestra de líquido sobre al menos un soporte para formar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte.

**[0032]** La superficie de la mancha de fluido secado sobre el soporte puede tener un diámetro comprendido entre menos de unos milímetros y una docena de milímetros. Por ejemplo, el diámetro de la mancha de fluido secado puede oscilar entre 5 y 20 mm cuando se deposite una única gota. Dicho diámetro de mancha de fluido secado se obtiene con cualquier matriz de celulosa siempre que ésta tenga una composición homogénea y un grosor, velocidad de flujo y absorbencia uniformes, tales como las que se encuentran disponibles en el mercado (las tarjetas Whatman 903 o las tarjetas Whatman FTA DMPK, por ejemplo). En otro modo de realización, la superficie de la mancha de fluido secado sobre el soporte puede tener un tamaño de unos pocos milímetros de ancho y unos pocos centímetros de largo. Dicho tamaño de la mancha de fluido secado se obtiene con cualquier soporte de celulosa cromatográfico tras una etapa de separación cromatográfica.

**[0033]** A continuación, se fija al menos una parte de una mancha de fluido secado sobre un soporte o una parte de la membrana de transferencia sobre una superficie conductora. Por ejemplo, solo una parte de la mancha de fluido secado sobre un soporte o de la membrana de transferencia puede extraerse del soporte y fijarse sobre una superficie conductora. Por ejemplo, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la superficie de la mancha de fluido secado sobre un soporte puede extraerse del soporte y fijarse sobre una superficie conductora. Por ejemplo, una muestra de agujero perforado de los soportes puede colocarse directamente sobre una superficie conductora. En un modo de realización preferido, cuando se fije al menos una parte de una mancha de fluido secado sobre una superficie conductora, la parte fijada comprende al menos una zona central y una zona periférica de la mancha de fluido secado (siendo por lo general sustancialmente una mancha de fluido secado un disco, significa que la parte fijada comprende un sector circular delimitado por 2 radios y el perímetro de la mancha de fluido secado). Con dicha configuración, es posible analizar zonas que son más o menos periféricas en una mancha de fluido secado.

**[0034]** En un modo de realización alternativo, al menos un compuesto presente en una mancha de fluido secado puede transferirse sobre una membrana antes de la fijación sobre una superficie conductora. En el dicho método, después de suministrar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte, la etapa (b) del método

5

consiste en:

- la transferencia de al menos un compuesto de la mancha de fluido secado sobre una membrana,
- la fijación de al menos una parte de dicha membrana en una superficie conductora,

La técnica se basa en un método de transferencia a presión para transferir compuesto desde una mancha de fluido secado a la superficie de una membrana. Una membrana puede definirse como cualquier material de soporte de inmovilización adecuado para analizar más detalladamente compuestos biológicos transferidos sobre el mismo. Una membrana podría ser, pero sin carácter limitativo, un soporte de nitrocelulosa, de difluoruro de polivinilideno (PVDF), de polietileno o de nailon. La transferencia podría hacerse más fácil mojando previamente la membrana con un disolvente, tal como, pero sin carácter limitativo, acetona, etanol, metanol, propanol o una mezcla de los mismos. Además, el calor podría ayudar a realizar la transferencia. La transferencia podría realizarse manualmente o con un papel secante (térmico) o *blotter*.

10

15

**[0035]** La parte de la mancha de fluido secado sobre un soporte o la parte de la membrana de transferencia puede fijarse sobre una superficie conductora mediante la utilización de una cinta adhesiva conductora de doble cara, por ejemplo, una cinta de carbono conductora de doble cara. La superficie conductora proporciona una superficie plana conductora por medio de electricidad para mejorar el proceso de ionización y para evitar cargas electrostáticas que afecten a la formación de pluma de iones. La superficie conductora puede incluir plásticos, vidrio y metal; la superficie puede convertirse en conductora de diversas formas tales como, pero sin carácter limitativo, partículas de carbono, fibras de carbono y partículas de metal. Por ejemplo, una superficie conductora puede seleccionarse de entre el grupo que comprende, pero sin carácter limitativo, un portaobjetos de vidrio revestido de óxido de estaño e indio (ITO, por sus siglas en inglés), una placa de acero inoxidable o una placa revestida de oro, con un tamaño común que oscila entre 25 mm x 75 mm (portaobjetos de vidrio) y 81 mm x 123 mm (placa).

20

25

**[0036]** Un compuesto de absorción de luz ultravioleta se refiere a un material utilizado en MALDI-MS para preparar una muestra para su análisis (también conocido como una matriz o una solución de matriz). Este material es al menos un compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto en un disolvente orgánico y/o agua. Una solución acuosa u orgánica de un compuesto de absorción de luz ultravioleta depositado sobre una muestra absorbe energía de un láser y la transfiere a la muestra para desorber, volatilizar e ionizar un compuesto presente en la mancha de fluido secado sobre un soporte, por lo que se producen iones a partir de la muestra que, a continuación, se analizan en un espectrómetro de masas para producir información sobre un compuesto presente en una mancha de fluido secado. Dicho de otro modo, un compuesto de absorción de luz ultravioleta puede ser cualquier compuesto que permita la ionización, volatilización y desorción posterior de al menos un compuesto comprendido en una mancha de fluido secado sobre un soporte (o de al menos un compuesto transferido sobre una membrana) mediante un método MALDI.

30

35

40

**[0037]** El compuesto de absorción de luz ultravioleta se disuelve en agua o en al menos un disolvente orgánico, o una mezcla de agua y al menos un disolvente orgánico y agua. Por ejemplo, el disolvente orgánico puede ser, pero sin carácter limitativo, acetona, acetonitrilo, cloroformo, etanol, isopropanol, metanol, tetrahidrofurano y una mezcla de disolventes. Una solución de matriz normal comprendería la matriz a una concentración de 5-30 mg/ml en un disolvente que sea compatible con los compuestos objetivo que se han de analizar. En un modo de realización preferido, pueden utilizarse aditivos de matriz tales como citrato amónico, fucosa, espermina o espermidina para moderar la cationización no deseada.

45

**[0038]** En un modo de realización preferido, puede añadirse un ácido al compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto con el fin de mejorar la ionización. Por ejemplo, el ácido puede ser ácido fórmico, ácido trifluoroacético o ácido fosfórico, preferiblemente a 0,05 - 1 % v/v, ácido acético o ácido clorhídrico preferiblemente a una concentración que oscila entre 0,01 y 0,2 mol/L.

50

**[0039]** Se deposita al menos un compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto sobre al menos una parte del soporte que comprende una mancha de fluido secado o una membrana de transferencia fijada sobre una superficie conductora. La deposición del compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto puede llevarse a cabo mediante la vaporización del compuesto de absorción de luz ultravioleta con un aerógrafo manual, con un pulverizador automático (p. ej., una boquilla de pulverización automatizada o un nebulizador piezoeléctrico), un pulverizador neumático o una mezcla de los mismos. Tras la deposición del compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto, se forma una mezcla que comprende compuestos presentes en una mancha de fluido secado o una membrana de transferencia y la matriz de luz ultravioleta disuelta.

55

60

**[0040]** En un modo de realización preferido, el compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto se deposita como una capa homogénea sobre el soporte que comprende una muestra de fluido secado o una membrana de

transferencia. Al menos una parte de la mezcla hecha de compuestos en la mancha de fluido secado o la membrana de transferencia y la matriz de luz ultravioleta se desorbe y se ioniza mediante MALDI. El compuesto de absorción de luz ultravioleta absorbe energía del láser y transfiere la energía a los compuestos para que se desorban en la mancha de fluido secado, lo que da lugar a su volatilización e ionización, lo que produce iones que, a continuación, se analizan.

**[0041]** La última etapa de la detección y/o identificación de un compuesto se lleva a cabo mediante la obtención de un espectro de masa en modo de barrido completo de iones de compuestos de mancha de fluido secado mediante un analizador de espectrómetro de masas. El espectro de masa en modo de barrido completo puede ser una media de diversos espectros de masa en modo de barrido completo obtenidos en posiciones diferentes de la zona de mancha de fluido secado o la zona de membrana de transferencia.

**[0042]** La obtención de datos se controla por medio de un *software* de obtención de espectrómetro de masas después de establecer el modo (positivo o negativo), la escala de masa, la intensidad y frecuencia de láser, el número de disparos por espectro y cualquier otro parámetro del espectrómetro de masas, de conformidad con las recomendaciones específicas del fabricante. A continuación, se lleva a cabo un análisis de datos con un *software* de análisis de espectrómetro de masas; los espectros de masa se suavizan, se sustrae la línea base y se escogen los picos en el espectro de masa manual o automáticamente. Para la formación de imágenes, en primer lugar, se registra una imagen óptica. La obtención y el análisis de datos se controlan por medio de un *software* de formación de imágenes de MS específico; puede crearse un mapa de densidad iónica para cada señal presente en el espectro de masa medio de muestra completo.

**[0043]** En un modo de realización preferido, la determinación de la presencia de al menos un compuesto presente en fluidos se lleva a cabo mediante la selección de al menos un ion de relación masa/carga ( $m/z$ ) precisa correspondiente a al menos una relación masa/carga ( $m/z$ ) calculada de al menos un compuesto presente en la dicha mancha de fluido secado. Con dicha etapa, la presencia de un único compuesto conocido o de múltiples compuestos conocidos puede analizarse en un espectro de masa único. Un experto en la materia puede encontrar la masa exacta de compuestos conocidos en las tablas moleculares de referencia o en bases de datos en la red conocidas en la técnica.

**[0044]** En un modo de realización preferido, la última etapa del análisis, es decir, la obtención de espectros de masa de iones, se lleva a cabo mediante un analizador de masas de resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier (FT-ICR-MS, por sus siglas en inglés), un analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), un analizador de masas cuadrupolo-trampa de iones-tiempo de vuelo (QIT-TOF-MS, por sus siglas en inglés), un analizador de masas cuadrupolo Orbitrap (Q-Orbitrap-MS, por sus siglas en inglés) o un analizador de masas de trampa de iones lineal Orbitrap (LTQ-Orbitrap-MS, por sus siglas en inglés). En un modo de realización más preferido, se utiliza un instrumento de espectrometría de masas de transformada de Fourier (ICR u Orbitrap). Dicho instrumento proporciona una alta resolución, una escala de masa grande, alta sensibilidad y masa precisa para la determinación de la identidad de moléculas pequeñas.

**[0045]** En un modo de realización más preferido, el compuesto objeto de detección es un compuesto que tiene una relación masa/carga calculada inferior a 15000  $m/z$  o igual que esta cifra, preferiblemente comprendida entre 100  $m/z$  y 1500  $m/z$ . Cuando un compuesto tiene una relación masa/carga calculada inferior a 1500  $m/z$  o igual que esta cifra, es posible la identificación mediante masa precisa siempre que la precisión del espectrómetro de masas sea suficiente ( $< 1$  ppm).

**[0046]** En un modo de realización preferido, el compuesto objeto de detección se selecciona de entre el grupo que comprende nucleótidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, lípidos, urea, mio-inositol, estando presentes dichos compuestos en el metaboloma corporal, candidatos a medicamento y candidatos farmacéuticos. En un modo de realización más preferido, el compuesto objeto de detección es un compuesto de un metaboloma de fluido seleccionado (metaboloma de orina, metaboloma de plasma, metaboloma sanguíneo, metaboloma de suero, metaboloma de saliva, metaboloma de bilis) y en un modo de realización más preferido el compuesto objeto de detección es un compuesto del metaboloma sanguíneo. El metaboloma puede definirse como el conjunto completo de metabolitos de moléculas pequeñas que se encuentran en una muestra biológica. El metaboloma de fluido corporal puede comprender compuestos endógenos y compuestos exógenos. Por ejemplo, un compuesto endógeno objeto de análisis y/o identificación puede seleccionarse de entre el grupo que comprende: nucleótidos (p. ej., ribonucleótidos -mono, -di y trifosfato: monofosfato de adenosina, trifosfato de adenosina, trifosfato de adenosina, difosfato de uridina), aminoácidos (p. ej., L-prolina, L-fenilalanina, L-metionina, L-treonina, L-triptófano, L-glutamina) ácidos orgánicos (p. ej., ácido benzoico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido malónico, ácido úrico, ácido succínico), carbohidratos (p. ej., D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-glucopiranosina, N-acetil-D-glucosamina), lípidos (p. ej., colesterol, ácidos grasos libres, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteroides, glicolípidos, diacilgliceroles y triacilgliceroles) urea o mio-inositol. Por ejemplo, un compuesto exógeno objeto de análisis y/o identificación puede seleccionarse de entre el grupo que comprende candidatos a medicamento (durante ensayos preclínicos de un medicamento, por ejemplo),



moléculas farmacéuticas (durante un ensayo clínico o un seguimiento farmacoterapéutico), como dextrometorfano o amiodarona.

5 **[0047]** La figura 2 muestra un ejemplo de un perfil lipídico obtenido mediante el método de la presente invención en una mancha de sangre secada en modo iónico positivo. Hemo *b* y las especies de fosfatidilcolina dominan el espectro de masa medio. La tabla 1 enumera, de forma no exhaustiva, las diferentes clases de lípidos detectados en la muestra. La tabla 1 representa asignaciones de los picos detectados en los espectros de masa  
10 registrados en el modo iónico positivo de una mancha de sangre secada. Las asignaciones se han llevado a cabo a partir de la comparación con los datos de la literatura. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: CH, colesterol; LPC, lisofosfatidilcolina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; SM, esfingomielina; TAG, triacilglicerol.

Tabla 1: Lista no exhaustiva de compuestos detectados en una zona de una mancha de sangre secada.

|    | Especies moleculares  | <i>m/z</i> medida |
|----|---|-------------------|
| 1  | CH -H <sub>2</sub> O +H <sup>+</sup>  | 369,34801         |
| 2  | LPC16:0 +Na <sup>+</sup>  | 518,32653         |
| 3  | LPC18:2 +H <sup>+</sup>   | 520,33404         |
| 4  | LPC18:1 +H <sup>+</sup>   | 522,36076         |
| 5  | LPC18:0 +H <sup>+</sup>   | 524,36347         |
| 6  | PC 16:0/16:0 +H <sup>+</sup>  | 534,30498         |
| 7  | LPC18:0 +Na <sup>+</sup>  | 546,35966         |
| 8  | PC16:0/16:0 +Na <sup>+</sup>  | 557,15604         |
| 9  | LPC19:0 +Na <sup>+</sup>  | 560,31139         |
| 10 | SM16:0 +H <sup>+</sup>  | 703,57955         |
| 11 | SM16:0 +Na <sup>+</sup>   | 725,55982         |
| 12 | PE16:0/18:2 +Na <sup>+</sup>  | 738,45646         |
| 13 | PE16:0/18:1 +Na <sup>+</sup>  | 740,48319         |
| 14 | PC16:0/18:2 +H <sup>+</sup>   | 758,57001         |
| 15 | PC16:0/18:1 +H <sup>+</sup>   | 760,59193         |
| 16 | PE16:0/18:1 -H <sup>+</sup> +2Na <sup>+</sup>   | 762,58503         |
| 17 | PC16:0/18:2 +Na <sup>+</sup> - SM20:0 +Na <sup>+</sup>                                      | 780,55659         |
| 18 | PC16:0/20:4 +H <sup>+</sup> - PC16:0/18:1 +Na <sup>+</sup>                                  | 782,56410         |
| 19 | PS16:0/18:1 +H <sup>+</sup> +Na <sup>+</sup> - PC18:0/18:3 +H <sup>+</sup>                  | 784,58121         |
| 20 | PC18:0/18:2 +H <sup>+</sup>   | 786,59353         |
| 21 | PC18:1/20:4 +H <sup>+</sup> - PC18:0/18:2 +Na <sup>+</sup>                                  | 788,61065         |
| 22 | PC16:0/18:2 +K <sup>+</sup>   | 796,53504         |
| 23 | PC16:0/18:1 +K <sup>+</sup>   | 798,54255         |
| 24 | PC16:0/20:4 +Na <sup>+</sup>  | 804,55068         |
| 25 | PS16:0/18:1 +2Na <sup>+</sup> - PC16:0/22:6 +H <sup>+</sup> - PC 18:0/18:3 +Na <sup>+</sup> | 806,57260         |
| 26 | PC18:0/18:2 +Na <sup>+</sup> - PC 18:1/20:4 +H <sup>+</sup>                                 | 808,58011         |
| 27 | PC18:0/20:4 +H <sup>+</sup> - PC 18:0/18:1 +Na <sup>+</sup>                                 | 810,60683         |
| 28 | PC18:1/18:3 +K <sup>+</sup> - PC 16:0/20:4 +K <sup>+</sup>                                  | 820,52432         |
| 29 | PC18:1/18:2 + K <sup>+</sup>  | 822,54624         |
| 30 | PC18:0/18:2 + K <sup>+</sup>  | 824,56336         |
| 31 | PC16:0/22:6 + Na <sup>+</sup>   | 828,54477         |
| 32 | PC18:0/20:4 + Na <sup>+</sup>   | 832,57900         |

|    | Especies moleculares                          | m/z medida |
|----|---|------------|
| 33 | SM24:0 + Na <sup>+</sup>                      | 837,67943  |
| 34 | PI16:0/18:2 -H <sup>+</sup> +2Na <sup>+</sup> | 879,58264  |
| 35 | TAG C18/18/18:2                               | 906,21124  |
|    | Hemo <i>b</i>                                 | 617,18506  |

**[0048]** Como se puede observar, los fosfolípidos (lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina), los esfingolípidos (esfingomielina), el triacilglicerol y el colesterol son las principales especies observadas. Se ha demostrado que los lípidos plasmáticos son marcadores biológicos potenciales para diversas enfermedades, tales como la artritis reumatoide (Fuchs et al., 2005 [Clinical Biochemistry 38, 925-933] o las enfermedades cardiovasculares (Stübiger et al., 2012 [Atherosclerosis 224, 177-186]). La presente invención representa una técnica prometedora para la detección clínica de perfiles lipídicos en manchas de sangre secada para evaluar el estado patológico y/o la actividad de la enfermedad antes o después del tratamiento.

**[0049]** La figura 3 muestra el espectro medio de dos moléculas farmacológicas pequeñas. El dextrometorfano es un fármaco antitusivo (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO, masa monoisotópica neutra 271,19361) y la amiodarona (C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>I<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>, masa monoisotópica neutra 645,02368) es un agente antiarrítmico utilizado para diversos tipos de arritmias cardíacas. El ion de [M+H<sup>+</sup>] dextrometorfano (masa medida 272,20012 m/z) y el ion de [M+H<sup>+</sup>] amiodarona (masa medida 646,03071 m/z) se indican con un asterisco.

**[0050]** La figura 4 muestra una mancha de sangre secada (fig. 4a) de la que se han transferido compuestos sobre una membrana de PVDF (fig. 4b). La membrana de PVDF se ha humedecido previamente en MeOH durante 10 segundos y, a continuación, se ha aplicado sobre la mancha de sangre secada durante 2 minutos; los compuestos se transfieren a 180 °C con un hierro. La membrana se tinte con negro de Amido 10B (0,1% en MeOH:H<sub>2</sub>O, 45:55) durante 30 segundos y se enjuaga dos veces en H<sub>2</sub>O destilado (30 segundos). Se utiliza negro de Amido 10B para tinte proteínas y/o lípidos. La vista ampliada de la zona 750-800 m/z muestra algunas clases de lípidos. La anotación de espectro de masa (14-23) corresponde a las asignaciones de lípidos de la tabla 1.

**[0051]** En un modo de realización preferido, se deposita una mezcla de calibración sobre una superficie conductora donde se fija una mancha de fluido secado sobre un soporte o una membrana de transferencia; y se deposita un compuesto de absorción de luz ultravioleta sobre al menos una parte de la mezcla de calibración y sobre al menos una parte de la mancha de fluido secado sobre un soporte. El compuesto de absorción de luz ultravioleta puede ser el mismo que el depositado sobre la muestra de mancha de fluido secado. Una mezcla de calibración puede ser una mezcla de compuestos casera o comercial preenvasada (de Sigma, Bruker, AB Sciex, por ejemplo) con relaciones masa/carga conocidas. La mezcla de calibración se utiliza para calibrar el dispositivo de MS. La mezcla de calibración se escoge en relación con la naturaleza del compuesto objeto de análisis y/o de identificación. Por ejemplo, cuando el compuesto objeto de identificación y/o análisis tiene una relación masa/carga calculada comprendida entre 100 m/z y 1500 m/z, la mezcla de calibración comprende compuestos con una relación masa/carga calculada comprendida entre 100 m/z y 1500 m/z o consiste en los mismos. Pueden utilizarse moléculas pequeñas comunes, péptidos o una mezcla de ambos.

**[0052]** Con este modo de realización, el resultado del método se mejora en gran medida puesto que la muestra objeto de análisis y la mezcla de calibración se preparan en las mismas condiciones. Puesto que el análisis de muestras depende en gran medida de la precisión de la medición, el hecho de tener una mezcla de calibración conocida preparada de la misma manera que la muestra permite calibrar de manera fiable la escala m/z del analizador de masas.

**[0053]** En consecuencia, en un modo de realización más preferido, el método comprende las etapas siguientes:

- someter al menos una zona de la mezcla de calibración a una desorción/ionización láser asistida por matriz para producir iones de calibración,
- obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de iones de calibración mediante un analizador de masas,
- utilizar el espectro de masa de dichos iones de calibración para calibrar la escala m/z del espectrómetro de masas,

donde las dos primeras etapas se llevan a cabo antes o después de la etapa de someter a MALDI al menos una zona de una mancha de fluido secado sobre un soporte o una membrana de transferencia para producir iones. Dicho de otro modo, una etapa de desorción/ionización y una etapa de obtención de espectros de masa de iones de calibración correspondientes a compuestos presentes en la mezcla de calibración se llevan a cabo antes o

después de la etapa similar llevada a cabo sobre el soporte que comprende la mancha de fluido secado y la mezcla de compuesto de absorción de luz ultravioleta. En este modo de realización, el dispositivo MALDI y/o el dispositivo de MS se calibra por medio de un método de calibración externo y el análisis del compuesto presente en una mancha de fluido secado se mejora en gran medida.

5 **[0054]** En un modo de realización preferido, la calibración también podría realizarse mediante la utilización de moléculas internas de relaciones masa/carga, presentes en gran cantidad en fluidos, tales como la molécula hemo *b* (C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>FeN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, masa monoisotópica neutra 616,177298) en sangre. Esta corrección se realiza después de la obtención de datos mediante un método de calibración interno suministrado por el *software* de análisis de datos de espectrómetro de masas.

10 **[0055]** En un modo de realización más preferido del presente método, el compuesto de absorción de luz ultravioleta es una matriz cristalina seleccionada de entre el grupo que comprende ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, por sus siglas en inglés); isómeros de ácido dihidroxibenzoico (DHB, por sus siglas en inglés); ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA, por sus siglas en inglés); ácido nicotínico; ácido picolínico (PA, por sus siglas en inglés); ácido trans-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico); 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP, por sus siglas en inglés); 2,6-dihidroxiacetofenona (DHA, por sus siglas en inglés); ácido 3-hidroxi-picolínico (HPA, por sus siglas en inglés); 3-aminoquinolina; ácido trans-3-indoleacrílico (IAA, por sus siglas en inglés); ditranol (DIT, por sus siglas en inglés); 1,8,9-trihidroxi-antraceno; ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzoico (HABA, por sus siglas en inglés); 6-aza-2-tiotimina (ATT, por sus siglas en inglés); 3-amino-4-metil-5-nitropiridina (AMNP, por sus siglas en inglés); 5-amino-1-naftol (5,1-ANL, por sus siglas en inglés); 5-hidroxi-1-naftol (5,1-HNL, por sus siglas en inglés); o una mezcla de los mismos .

25 **[0056]** Los compuestos de absorción de luz ultravioleta también pueden comprenderse en matrices iónicas sólidas, obtenidas de la mezcla de matrices cristalinas ácidas tales como CHCA, SA o DHB con diferentes bases como anilina o N,N-dimetilanilina o en matrices iónicas líquidas, tales como CHCA/2-amino-4-metil-5-nitropiridina; 4-nitrobencil alcohol (NBA, por sus siglas en inglés). También podría utilizarse la matriz basada en porfirina (p. ej., 10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina F20TTP) o matrices inorgánicas (metal fino o un óxido metálico en suspensiones de glicerol).

30 **[0057]** En un modo de realización más preferido, la invención también da a conocer un método para determinar la distribución espacial de al menos un compuesto en una mancha de fluido secado o en una membrana de transferencia donde el dicho método comprende las etapas adicionales de:

- 35
- obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de iones en al menos dos zonas presentes en una mancha de fluido secado, estando una primera zona más próxima al centro de dicha mancha de fluido secado en relación con una segunda zona,
  - seleccionar un ion de relación masa/carga (m/z) precisa correspondiente a una relación masa/carga calculada de al menos un compuesto por detectarse en la dicha mancha de fluido secado,
  - determinar una distribución espacial de al menos un compuesto en la mancha de fluido secado.
- 40

**[0058]** En este modo de realización, es posible determinar la localización espacial de al menos un compuesto en una mancha de fluido secado o sobre una membrana de transferencia. El MALDI/MS genera espectros de masa de iones a partir de un compuesto presente en una mancha de fluido secado sobre un soporte que puede correlacionarse con una distribución espacial de un compuesto en el soporte.

45 **[0059]** La localización física de un compuesto o compuestos puede ser muy importante cuando los análisis se lleven a cabo mediante desorción directa. Se ha demostrado que la migración cromatográfica de compuestos presentes en sangre cuando la sangre se muestrea sobre un soporte celulósico puede estar relacionada con diversos factores (nivel de hematocrito, volumen de mancha de sangre o propiedades de difusión). En consecuencia, se necesita un método rápido, con pocas etapas, que permita realizar un análisis de distribución espacial de al menos un compuesto presente en una mancha de fluido secado sobre un soporte o en una membrana de transferencia. En la presente invención, se propone una etapa de localización mediante formación de imágenes en la muestra de fluido secado sobre un soporte o en una membrana de transferencia para dirigir el análisis de detección. Por lo tanto, este enfoque de método único permite llevar a cabo fácilmente tanto la detección como la visualización de un compuesto o compuestos sin ninguna selección previa de compuestos. Cuando se deposita una muestra de fluido sobre un papel cromatográfico y se lleva a cabo una etapa de separación de la muestra de fluido sobre el papel cromatográfico, pueden hacerse análisis sobre una parte limitada de la muestra de fluido secado (por ejemplo, sobre una parte limitada a un rango específico de peso molecular). En este caso, una zona central es una zona situada en el centro del papel cromatográfico y una segunda zona que está más cerca del borde del papel cromatográfico.

**[0060]** La distribución espacial de los compuestos puede registrarse mediante la formación de imágenes FT-ICR MS en una mancha de fluido secado sobre un soporte celulósico. Un ejemplo de dicha formación de imágenes

puede verse desde la figura 5(c) hasta la figura 5(f). Se aplicó una solución de matriz de CHCA (5mg/ml) en acetona/agua (0,1 % TFA) 7:3 v/v mediante pulverización (ImagePrep, Bruker Daltonic). El FT-ICR, SolariX, equipado con un imán de 9,4 Tesla (Bruker Daltonics), se dirigió en modo iónico positivo. Como se puede observar, se muestran las distribuciones espaciales de 4 compuestos diferentes: (c) el compuesto de interés se distribuye exclusivamente en la zona central; (d) el compuesto de interés se distribuye más en la zona periférica; (e) el compuesto de interés se distribuye exclusivamente en la zona periférica; (f) el compuesto de interés se distribuye de manera homogénea (f).

**[0061]** Para la formación de imágenes se registra, en primer lugar, una imagen óptica. La obtención y el análisis de datos se controlan por medio de un *software* de formación de imágenes de MS específico; se crea un mapa de densidad iónica para cada señal presente en el espectro de masa medio de muestra completo. Con el método de la invención, es posible obtener una resolución espacial de 5  $\mu\text{m}$  mediante la utilización de una fuente de formación de imágenes MALDI con microsonda de escaneo a presión atmosférica (AP-SMALDI, por sus siglas en inglés) y mediante la utilización de un método de aplicación de matriz con un pulverizador neumático. Por consiguiente, la formación de imágenes se lleva a cabo mediante la combinación de un análisis de masa precisa y una resolución espacial superior al mismo tiempo.

**[0062]** En un modo de realización más preferido o en un modo de realización alternativo, la invención da a conocer un método donde el dicho método se lleve a cabo en al menos dos manchas de fluido secado distintas. Las al menos dos manchas de fluido secado distintas pueden ser manchas de fluido secado obtenidas a partir de una muestra de fluido única procedente de una única persona o animal, u obtenidas a partir de muestras de fluido obtenidas en distintos momentos procedentes de una única persona o animal (es decir, antes o después de un tratamiento), u obtenidas de dos personas o animales diferentes con el fin de comparar el análisis y/o la identificación de un compuesto en ambas personas o en ambos animales. Con este método, es posible determinar la distribución espacial de al menos un compuesto en una pluralidad de manchas de fluido secado sobre una pluralidad de soportes o en una pluralidad de membranas de transferencia a partir de una pluralidad de manchas de fluido secado.

**[0063]** En consecuencia, en un modo de realización más preferido, el método comprende el suministro de al menos dos manchas de fluido secado, donde la etapa de obtención de un espectro de masa en modo de barrido completo del método se lleva a cabo en al menos dos zonas de cada manchas de fluido secado distintas suministradas, comprendiendo dicho método asimismo la etapa de:

- comparación de la distribución espacial del al menos un compuesto objeto de detección entre las distintas manchas de fluido secado suministradas.

#### Ejemplos:

Detección de lípidos a partir de una muestra de mancha de sangre secada sobre un soporte celulósico (Tabla 1, figura 2).

**[0064]** Se suministró una mancha de sangre de un ser humano y se depositó sobre un soporte celulósico (Whatman 903). Se corta del soporte celulósico una muestra de la mancha de sangre secada sobre el soporte celulósico y se fija sobre un portaobjetos de vidrio conductor revestido de ITO (Bruker Daltonics) mediante la utilización de una cinta de carbono adhesiva conductora de doble cara (SPI supplies). Se deposita una mezcla de calibración (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics) cerca de la muestra de la mancha de sangre secada sobre un soporte celulósico y se deja secar al aire. El compuesto de absorción de luz ultravioleta es el DHB-2,5. Se disuelve el DHB a una concentración de 20 mg/ml en metanol/0,2 % TFA (50:50 vol/vol). El DHB disuelto se pulveriza con un dispositivo ImagePrep (Bruker Daltonics). El proceso de pulverización es un proceso de múltiples etapas: la primera etapa comprende 12 ciclos de pulverización de DHB disuelto a una potencia de pulverización de  $25 \pm 30$  % (escala desde 0 a 100 % de la potencia máxima disponible de pulverización con su modulación de potencia, lo que significa en este caso que la potencia de la pulverización osciló entre un 0 y un 55 %) a lo que siguió un tiempo de secado de 50 segundos entre cada ciclo de pulverización. A continuación de esta etapa, se produce una etapa de secado de 30 s. Más adelante, se aplicaron tres etapas subsiguientes a una potencia de pulverización de  $25 \pm 30$  %, con números de ciclos de pulverización crecientes (etapa 2; entre 8 y 12 ciclos, etapa 3; entre 16 y 32 ciclos y etapa 4: entre 36 y 60 ciclos). El número de ciclos entre cada fase de secado completa también estaba en aumento (cada dos ciclos para la etapa 2, cada cuatro ciclos para la etapa 3 y cada 6 ciclos para la etapa 4). Tras depositarse el compuesto de absorción de luz ultravioleta y secarse, se carga el portaobjetos de vidrio revestido de ITO en un aparato MALDI-FT-ICR (SolariX 9.4 T, Bruker Daltonics). La muestra se ioniza en modo positivo con una potencia de láser de 25 % y con una frecuencia láser de 1000 Hz. La escala de masa se estableció entre 57,75 y 1500 m/z. La masa cuadrupolo 1 se estableció en 650 m/z y se acumuló una media de 30 espectros de masa. La calibración externa dio lugar a una precisión de masa de  $<0,15$  ppm en estas condiciones. Dos dímeros ( $[2\text{DHB}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  y  $[2\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ ) y dos trímeros ( $[3\text{DHB}-3\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  y  $[3\text{DHB}-2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ ) de DHB así como el péptido hemo b y bradiquinina 1-7 (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics) se utilizaron como calibradores externos. Los espectros de masa se analizaron con

DataAnalysis 4.0. Se sustrajeron los picos procedentes de la matriz o el soporte celulósico del espectro de masa medio. La asignación de picos de lípido se ha llevado a cabo a partir de la comparación con los datos de la literatura. Con el método de la invención, se identificaron al menos 35 lípidos presentes en un metaboloma de sangre.

5

Detección de compuestos farmacológicos pequeños exógenos a partir de muestra de mancha de sangre secada sobre un soporte celulósico (Figura 3).

[0065] Se prepararon soluciones madre (1 mmol/L) de dextrometorfano y amiodarona en H<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O-metanol (1:1, v/v), respectivamente. Las soluciones de trabajo se prepararon mediante la disolución de las soluciones madre a una concentración de 500, 100 y 20 pmol/L con sangre humana entera en blanco. Se colocaron alícuotas de soluciones de trabajo de sangre (25 µl) sobre papel celulósico Whatman 903 con una pipeta y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se almacenaron las muestras de mancha de sangre secada a -20 °C en una bolsa de plástico sellada con desecante hasta el análisis. Se cortó muestra del soporte celulósico de manchas de sangre secada sobre el soporte celulósico y se fijó sobre un portaobjetos de vidrio conductor revestido de ITO (Bruker Daltonics) mediante la utilización de una cinta de carbono adhesiva conductora de doble cara (SPI supplies). El compuesto de absorción de luz ultravioleta era CHCA. Se disolvió el CHCA a una concentración de 5 mg/ml en acetonitrilo/0,2 % TFA (70:30 vol/vol). El CHCA disuelto se pulverizó con un dispositivo ImagePrep (Bruker Daltonics). El proceso de pulverización es un proceso de múltiples etapas: la primera etapa comprende 12 ciclos de pulverización de DHB disuelto a una potencia de pulverización de 20 ± 20 % (escala desde 0 a 100 % de la potencia máxima disponible de pulverización con su modulación de potencia, lo que significa en este caso que la potencia de la pulverización osciló entre 0 y 55 %) a lo que siguió un tiempo de secado de 20 segundos entre cada ciclo de pulverización. A continuación, se aplicaron tres etapas subsiguientes a una potencia de pulverización de 22 ± 22 %, 19 ± 19 % y 20 ± 20 %, respectivamente, con números de ciclos de pulverización crecientes (etapa 2; entre 6 y 18 ciclos, etapa 3; entre 12 y 40 ciclos y etapa 4: entre 30 y 60 ciclos). El número de ciclos entre cada fase de secado completa también estaba en aumento (cada dos ciclos para la etapa 2, cada cuatro ciclos para la etapa 3 y cada 6 ciclos para la etapa 4). Tras depositarse el compuesto de absorción de luz ultravioleta y secarse, se cargó el portaobjetos de vidrio revestido de ITO en un aparato MALDI-FT-ICR (Solarix 9.4 T, Bruker Daltonics). La muestra se ionizó en modo positivo con una potencia de láser de un 50 % y con una frecuencia láser de 1000 Hz. La escala de masa se estableció entre 200 y 800 m/z. La masa cuadrupolo 1 se estableció en 300 m/z y se acumuló una media de 15 espectros. La calibración externa dio lugar a una precisión de masa de <1 ppm en estas condiciones. Un monómero ([CHCA+Na]<sup>+</sup>), tres dímeros ([2CHCA-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, [2CHCA+H]<sup>+</sup> y [2CHCA+Na]<sup>+</sup>) y un trímero ([3CHCA+Na]<sup>+</sup>) de CHCA se utilizaron como calibradores externos. Los espectros de masa se analizaron con DataAnalysis 4.0. Como se puede observar, la detección de compuestos farmacológicos pequeños se llevó a cabo en una mancha de sangre secada de acuerdo con el método de la invención, lo que supuso un análisis rápido y fiable de la presencia de un compuesto farmacológico.

[0066] La presente invención se ha descrito de conformidad con modos de realización específicos, que son ilustrativos de la invención y no deben interpretarse como limitativos. Más generalmente, los expertos en la materia observarán que lo que se ha mostrado y/o descrito anteriormente en particular no limita la presente invención. Los números de referencia en las reivindicaciones no limitan su alcance de protección. La utilización de los verbos "comprender", "incluir", "componerse de" o cualquier otra variante, así como sus respectivas conjugaciones, no excluye la presencia de elementos distintos a los indicados. La utilización de los artículos "un", "una" o "el", "la" que preceden a un elemento no excluye la presencia de una pluralidad de dichos elementos.

[0067] La invención también puede describirse como sigue: Se da a conocer un método para la detección y/o cuantificación de al menos una molécula presente en fluidos biológicos mediante un análisis MALDI-MS de una mancha de fluido secado sin la presencia de ninguna etapa de digestión o etapa de extracción de líquido, que permite analizar también la distribución física de al menos una molécula en una mancha de fluido secado.

50

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de al menos un compuesto presente en fluidos, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
  - a. suministrar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte,
  - b. fijar al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte en una superficie conductora,
  - c. suministrar una solución acuosa u orgánica de un compuesto de absorción de luz ultravioleta,
  - d. depositar dicho compuesto de absorción de luz ultravioleta en al menos una parte de dicha mancha de fluido secado sobre dicho soporte fijada en dicha superficie conductora,
  - e. someter al menos una zona de dicha mancha de fluido secado sobre un soporte a un proceso de desorción/ionización láser asistida por matriz para producir iones,
  - f. obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de dichos iones mediante un analizador de masas y,
  - g. determinar la presencia del al menos un compuesto mediante el análisis del espectro de masa en modo de barrido completo.
2. Un método según la reivindicación 1, donde la etapa (b) consiste en:
  - la transferencia de al menos un compuesto de la mancha de fluido secado sobre una membrana,
  - la fijación de al menos una parte de dicha membrana en una superficie conductora.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, donde la etapa de suministrar una mancha de fluido secado sobre un soporte comprende las etapas de:
  - suministrar una muestra de fluido biológico,
  - depositar al menos una gota de fluido de dicha muestra de fluido sobre al menos un soporte para formar al menos una mancha de fluido secado sobre un soporte.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (g) se lleva a cabo mediante la selección de al menos un ion de relación masa/carga ( $m/z$ ) precisa correspondiente a una al menos una relación masa/carga ( $m/z$ ) calculada de al menos un compuesto presente en la dicha zona de mancha de fluido secado.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de dichos iones se lleva a cabo mediante un analizador de masas de resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier, un analizador de masas de tiempo de vuelo, un analizador de masas cuadrupolo-trampa de iones-tiempo de vuelo, un analizador de masas cuadrupolo Orbitrap o un analizador de masas de trampa de iones lineal Orbitrap.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto objeto de detección es un compuesto con una relación masa/carga calculada inferior a 1500  $m/z$  o igual que dicha cantidad.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se deposita una mezcla de calibración sobre dicha superficie conductora y donde el compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto se deposita sobre al menos una parte de dicha mezcla de calibración antes de la etapa (e).
8. Un método según la reivindicación 7, que comprende las etapas de:
  - h. someter al menos una zona de la mezcla de calibración a un proceso de desorción/ionización láser asistida por matriz para producir iones de calibración,
  - i. obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de dichos iones de calibración mediante un analizador de masas,
  - j. utilizar el espectro de masa de dichos iones de calibración para calibrar la escala  $m/z$  del espectrómetro de masas,
 donde las etapas (i) a (j) se llevan a cabo antes o después de la etapa (e).
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto de absorción de luz ultravioleta se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA); isómeros de ácido dihidroxibenzoico (DHB); ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA); ácido nicotínico; ácido picolínico (PA); ácido trans-3-metoxi-4-hidroxicinámico (ácido ferúlico); 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP); 2,6-dihidroxiacetofenona (DHA); ácido 3-hidroxi-picolínico (HPA); 3-

aminoquinolina; ácido trans-3-indoleacrílico (IAA); ditranol (DIT); 1,8,9-trihidroxi-antraceno; ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzoico (HABA); 6-aza-2-tiotimina (ATT); 3-amino-4-metil-5-nitropiridina (AMNP); 5-amino-1-naftol (5,1-ANL); 5-hidroxi-1-naftol (5,1-HNL); o una mezcla de los mismos.

- 5 **10.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la solución de la etapa (c) también comprende un ácido, seleccionándose el ácido de entre el grupo que consiste en ácido fórmico, ácido trifluoroacético o ácido fosfórico preferiblemente a 0,05 - 1 % v/v, ácido acético o ácido clorhídrico preferiblemente a una concentración que oscila entre 0,01 - 0,2 mol/L.
- 11.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo dicho método la etapa de:
- 10 k. obtener un espectro de masa en modo de barrido completo de iones en al menos dos zonas presentes en una mancha de fluido secado, estando una primera zona más próxima a un centro de dicha mancha de fluido secado en relación con una segunda zona,
- 15 l. seleccionar un ion de relación masa/carga (m/z) precisa correspondiente a una relación masa/carga calculada de al menos un compuesto objeto de detección en la dicha mancha de fluido secado,
- m. determinar una distribución espacial de al menos un compuesto en la mancha de fluido secado.
- 12.** Un método según la reivindicación 11, donde se suministran al menos dos manchas de fluido secado y donde la etapa (k) se lleva a cabo en al menos dos zonas de cada mancha de fluido secado diferente suministrada, comprendiendo dicho método también la etapa de:
- 20 n. comparar la distribución espacial del al menos un compuesto objeto de detección entre las distintas manchas de fluido secado suministradas.
- 13.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha superficie conductora se selecciona entre el grupo que consiste en un portaobjetos de vidrio revestido de óxido de estaño e indio (ITO), una placa de acero inoxidable o una placa revestida de oro.
- 25 **14.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (d) del método se lleva a cabo mediante la pulverización de dicho compuesto de absorción de luz ultravioleta disuelto mediante un aerógrafo manual, una pulverización automática, una pulverización neumática o una mezcla de los mismos.
- 30 **15.** Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto objeto de detección se selecciona de entre el grupo que comprende nucleótidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, lípidos, urea, mioinositol, estando presentes dichos compuestos en el metaboloma corporal, candidatos a medicamento y candidatos farmacéuticos.

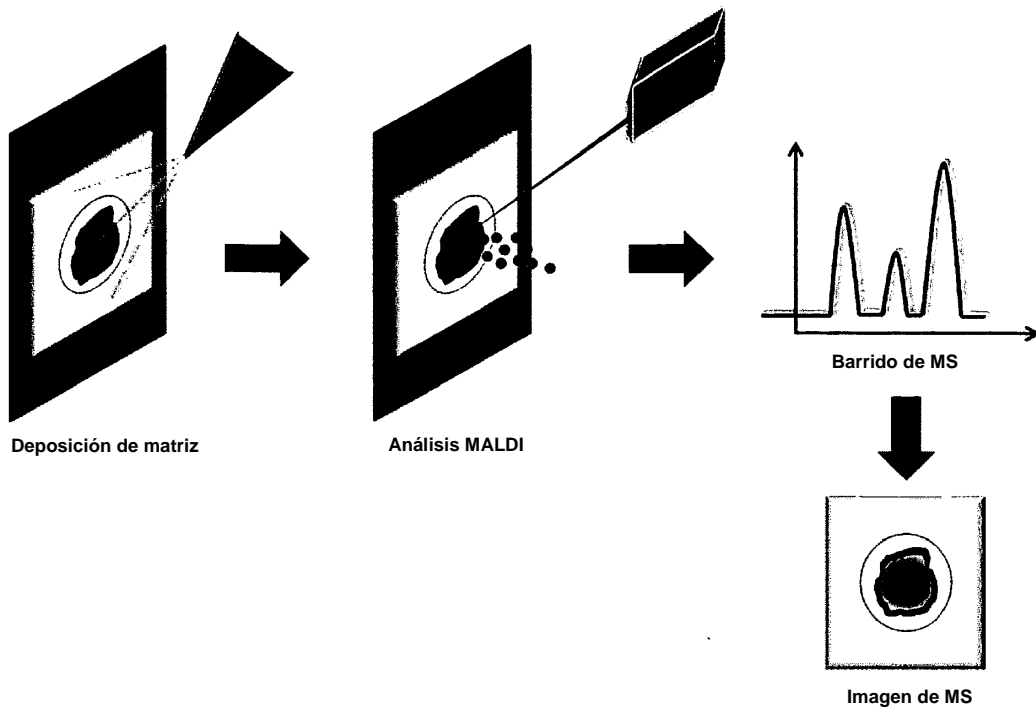


Fig. 1



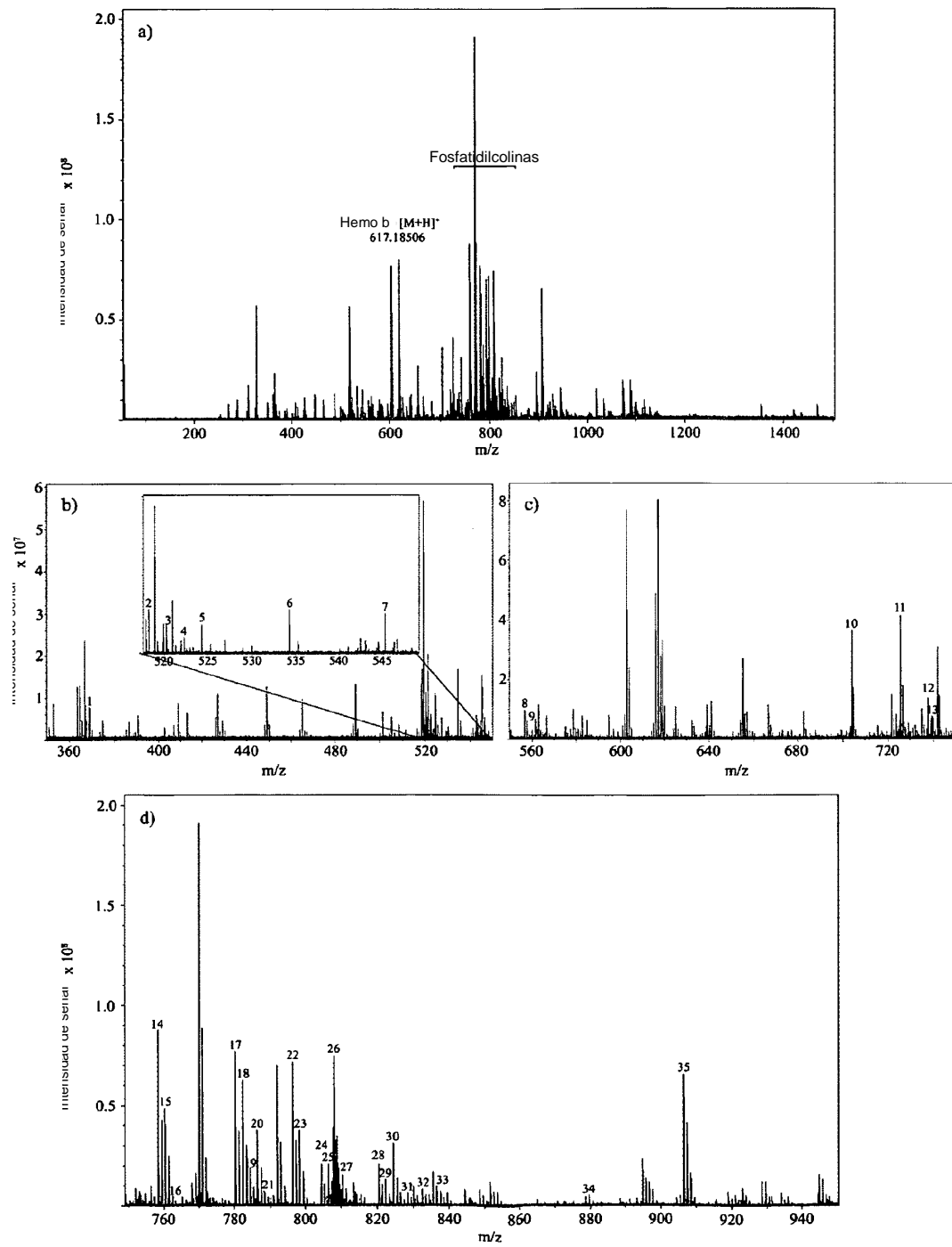


Fig. 2

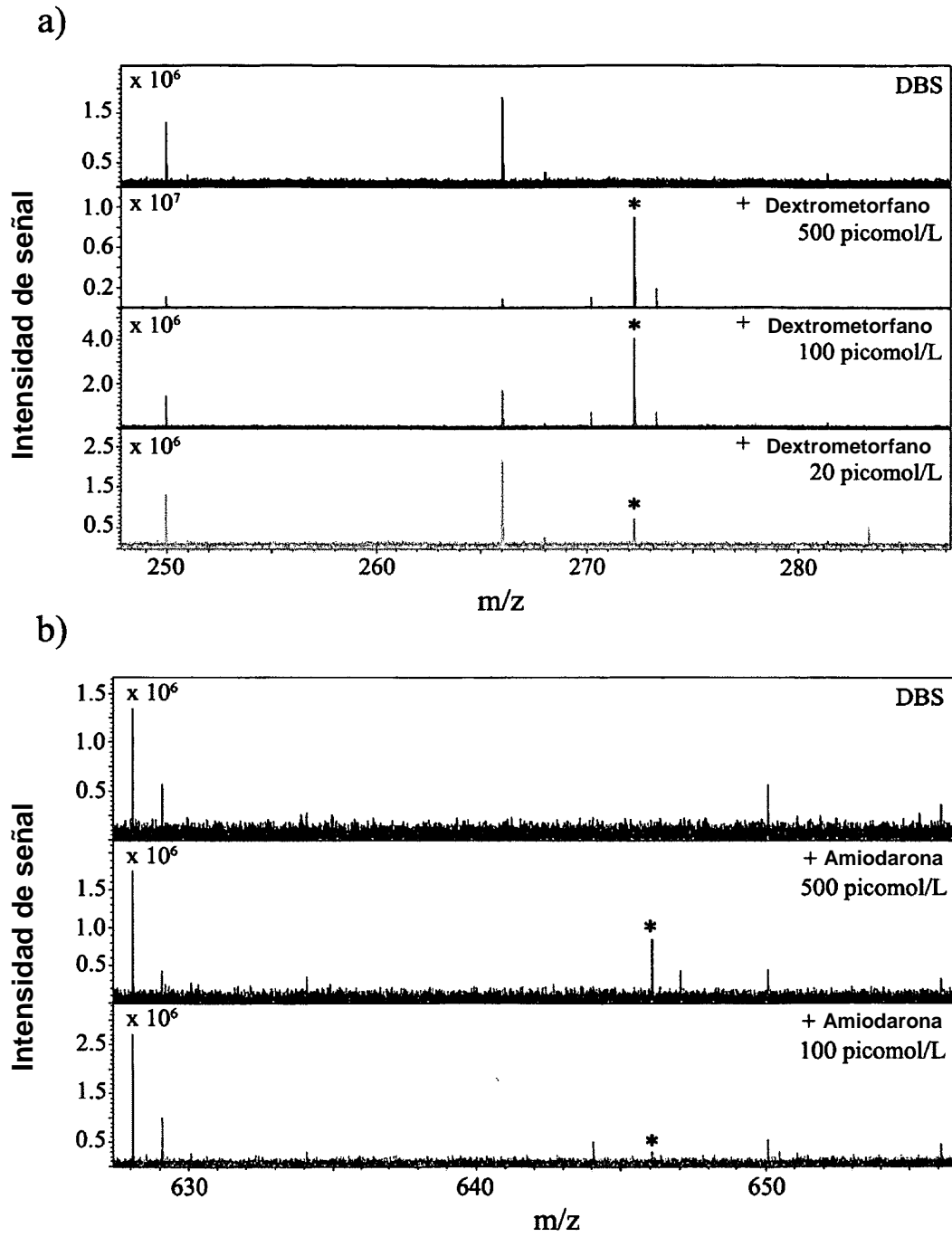


Fig. 3

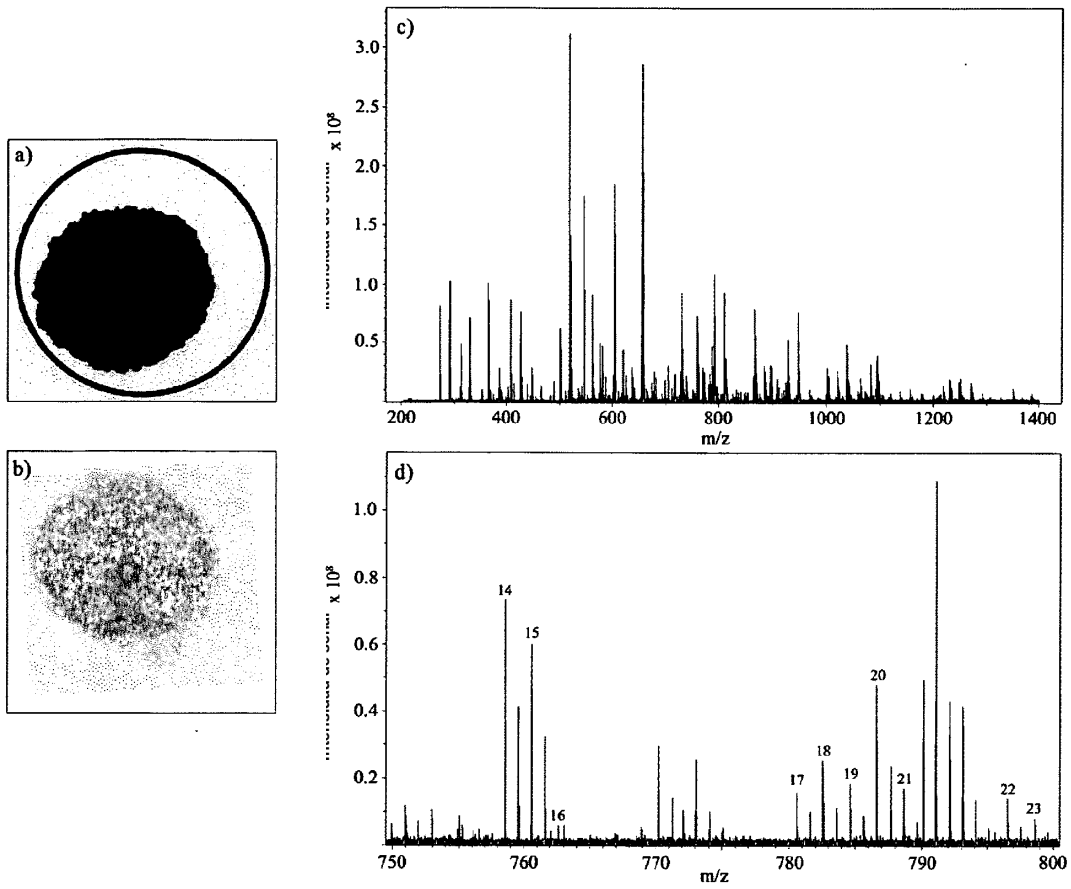


Fig. 4

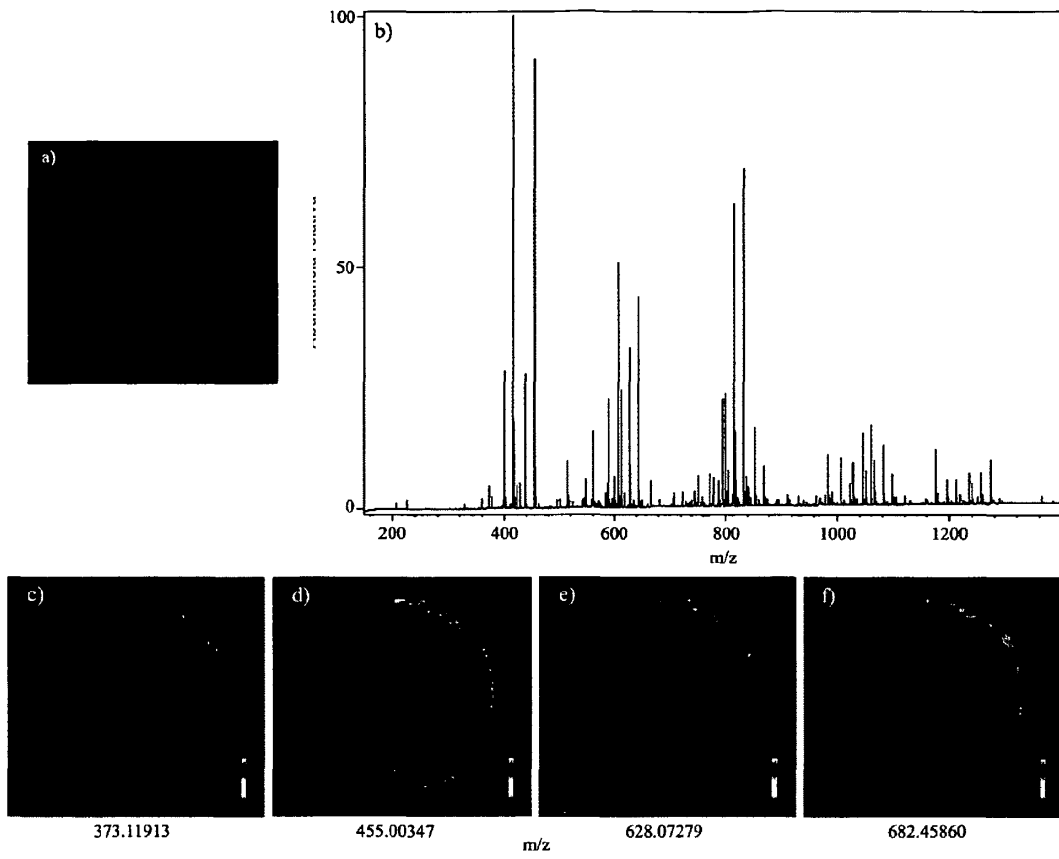


Fig. 5