

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 084**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/54 (2006.01)

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2013 PCT/DK2013/000084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2013 E 13817874 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2926139**

54 Título: **Método de diagnóstico de la galactosemia en un cribado neonatal**

30 Prioridad:

03.12.2012 DK 201200767

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

08.11.2018

73 Titular/es:

STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)

Artillerivej 5

2300 Copenhagen S, DK

72 Inventor/es:

COHEN, ARIEH SIERRA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 084 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

Método de diagnóstico de la galactosemia en un cribado neonatal

5 Campo de la invención

La invención desvela un método de diagnóstico de la galactosemia mediante la determinación de las concentraciones de GAL-1-P en muestras sanguíneas de neonatos tomadas antes de los 5-7 días de vida.

10 Antecedentes generales

15 La galactosemia es un error metabólico congénito potencialmente mortal. Está causada por una deficiencia en la enzima uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato (GALT). La GALT es importante en el metabolismo de la galactosa y cataliza una importante etapa en la conversión de la galactosa-1-fosfato (GAL-1-P) en glucosa-6-fosfato (GLC-6-P). En los pacientes con galactosemia, la conversión es muy baja o inexistente, dando lugar a unos niveles perjudiciales de GAL-1-P y de los metabolitos de la misma.

20 En muchos países, el cribado de la galactosemia es parte de los programas nacionales de cribado del recién nacido. Actualmente, una prueba de actividad enzimática (es decir, la prueba de Beutler) es el método predominante usado para el cribado de la galactosemia (Beutler E, Baluda MC. A simple spot screening test for galactosemia. J Lab Clin Med 1966; 68: 137-141). La principal ventaja de la prueba de Beutler es que mide la actividad enzimática en lugar de las concentraciones del metabolito. El principal inconveniente es que requiere que la actividad enzimática esté intacta. Las enzimas son sensibles al calor y pueden quedar inactivadas por un excesivo calor, dando lugar por lo tanto a falsos positivos. También, la prueba de Beutler requiere una muestra propia. No es posible aplicarla a otras pruebas de cribado.

25 También es posible usar metabolitos como biomarcadores en el cribado de la galactosemia. Previamente se ha descrito un cribado de la galactosemia basado en un biomarcador que usa una espectrometría de masas en el documento WO0210740. En resumen, se usan unos elevados niveles de monofosatos de hexosa como biomarcadores de la enfermedad. Esto se basa en el hecho de que la galactosemia da lugar a unos elevados niveles de GAL-1-P, que es un monofosfato de una hexosa. Idealmente, el cribado debería estar basado únicamente en la GAL-1-P. Sin embargo, en la espectrometría de masas (EM) no es posible diferenciar entre diferentes tipos de monofosatos de hexosa. Es posible usar una cromatografía de líquidos antes de la determinación del espectro de masas (CL-EM) con objeto de diferenciar entre ellos, pero en el cribado del recién nacido no es viable debido a que demanda un elevado rendimiento de la muestra. El fundamento del uso del monofosfato de hexosa total como biomarcador es que, en los pacientes con galactosemia, los niveles de la GAL-1-P están elevados por encima de los niveles de todos los demás monofosatos de hexosa. Una concentración anormal de los monofosatos de hexosa totales es definitivamente indicativa de una galactosemia. Esta metodología es eficaz en la detección de pacientes que están recibiendo alimentos que contienen galactosa. La leche materna, la leche de vaca y los lácteos contienen lactosa, que consiste en una unidad de galactosa y otra de glucosa unidas por un enlace 1,1-glucósido. Es rápidamente convertida en galactosa y glucosa en el tracto digestivo. Los neonatos con una dieta normal están por lo tanto expuestos a unos elevados niveles de galactosa, y si tienen galactosemia, sus niveles de GAL-1-P aumentarán drásticamente.

45 Sin embargo, al nacer hay presentes diversos tipos de monofosatos de hexosa a unos bajos niveles en los neonatos, predominantemente la GLC-6-P. La presencia de GLC-6-P causa un nivel de fondo en la medición de los monofosatos de hexosa totales, lo que a su vez tiene un efecto perjudicial sobre la especificidad y la sensibilidad del método de cribado. Para que el método del monofosfato de hexosa funcione apropiadamente, los niveles de GAL-1-P tienen que estar sustancialmente por encima de los niveles de GLC-6-P con objeto de ser capaces de detectar una muestra positiva. Aunque los niveles de la GAL-1-P están elevados al nacer en los pacientes con galactosemia, los niveles solo aumentan drásticamente después de varios días de ingerir alimentos que contienen galactosa. Normalmente se alcanza un estado estacionario después de entre 3 y 5 días tras el nacimiento. El hecho de que sea necesario que el niño haya ingerido una cantidad significativa de galactosa antes de tomar la muestra es un importante inconveniente en el cribado. En muchos países, las muestras para el cribado del recién nacido se toman antes de los 3 hasta 5 días, también algunos recién nacidos tienen problemas de alimentación y alcanzan los niveles de estado estacionario en un momento posterior.

60 El documento WO2003/0228704 describe el uso de una espectrometría de masas en tándem (EM/EM) para analizar las a-hidroxicetonas y los monofosatos de hexosa en manchas de sangre para el cribado del recién nacido.

Jensen et al., (2001; "Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: A retrospective study.", Clinical Chemistry 47: 8; 1364-1372) describe el análisis de los niveles totales de monofosfato de hexosa mediante una espectrometría de masas en tándem para la detección de la galactosemia.

65

El documento US2008/0274563 describe un método para la extracción de succinilacetona usando hidrazina, que a continuación se mide mediante una espectrometría de masas para detectar/diagnosticar trastornos metabólicos. Turgeon et al., (2008; Combined Newborn screening for succinylacetone, Amino acids and acylcarnitines in dried blood spots"; Clinical Chemistry 54: 4; 657-664) desarrollaron un nuevo ensayo para la detección de la tirosinemia de tipo I mediante la determinación de los niveles de acilcarnitinas, aminoácidos y succinil acetona en muestras neonatales mediante una espectrometría de masas en tándem.

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de GAL-1-P ya están elevados al nacer en los pacientes con galactosemia. Si el trasfondo creado por la presencia de GLC-6-P pudiera ser eliminado, sería posible el cribado de la galactosemia en recién nacidos. La presente invención proporciona un medio para empobrecer químicamente la GLC-6-P sin afectar a la GAL-1-P, haciendo que sea posible el cribado de la galactosemia usando una medición por espectroscopia de masas de la GAL-1-P independiente del momento de muestreo. Una ventaja adicional es que el cribado del recién nacido con una EM permite una multiplexación, es decir, es posible combinar varias pruebas de cribado en una muestra.

4. Sumario de la invención

La presente invención hace más específico el análisis de los niveles de GAL-1-P. La eliminación de los compuestos interferentes permite una determinación más específica, y por lo tanto más precisa, de los niveles de GAL-IP en el cribado del recién nacido para la galactosemia usando una espectrometría de masas. Esto tiene una gran importancia cuando se investigan muestras de niños que todavía no han alcanzado un estado estacionario de GAL-1P (es decir, antes de los 5-7 días de vida).

5. Divulgación detallada de la invención

La invención desvela un método para la determinación de las concentraciones de GAL-1-P en una muestra sanguínea temprana de neonatos mediante la modificación de los grupos carbonilo de los monofosfatos de hexosa. La modificación del grupo carbonilo se lleva a cabo mediante la reacción con una amina.

El grupo carbonilo es modificado preferentemente haciendo reaccionar los monofosfatos de hexosa de la muestra con una hidrazina. La hidrazina se elige entre N_2H_4 , monometil hidrazina, 1,1-dimetilhidrazina, 1,2-dimetilhidrazina, isoniazida, iproniazida, hidralazina, fenelzina, 2,4-dinitrofenilhidrazina o fenilhidrazina.

La divulgación también describe la modificación del grupo carbonilo mediante una reducción o una oxidación. La reducción del grupo carbonilo se consigue preferentemente mediante la adición de borhidrato de sodio a la muestra, y la oxidación del grupo carbonilo se consigue preferentemente haciendo reaccionar la muestra con ácido nítrico, o con reactivo de Tollen o de Fehling.

Las muestras de los neonatos normalmente se recogen 3-5 días después del nacimiento, pero según el presente método las muestras pueden ser recogidas justo después del nacimiento. La concentración de GAL-1-P en la muestra de sangre se mide preferentemente mediante una espectrometría de masas

La invención se basa en el empobrecimiento químico de todos los azúcares que no están modificados en la posición 1. Los azúcares simples están en equilibrio entre una forma lineal y una anular. Este equilibrio se basa en un proceso conocido como anomerización en el que el grupo hidroxilo de la posición 5 forma un enlace con el azúcar de la posición 1 creando un puente de oxígeno entre la posición del grupo ceto y la posición 1 (Figura 1). El grupo aldehído forma posteriormente un grupo hidroxilo. En la forma lineal, los azúcares son bastante más reactivos, puesto que el oxígeno del grupo ceto es mucho más reactivo que los otros oxígenos del carbohidrato, ya que están presentes como grupos hidroxilo. Cuando se añade un grupo funcional a un azúcar en la posición 1 (se modifica en la posición 1) ya no es posible que se convierta en la forma lineal y está bloqueado en la forma anular. Cuando un azúcar está bloqueado en la forma anular ya no tiene la reactividad del ceto.

En la invención se hace reaccionar un reactivo que reacciona principalmente con aldehídos y cetonas, pero no con grupos hidroxilo, con la muestra antes del análisis. Todos los azúcares que no estén modificados en la posición 1 reaccionarán y formarán otros compuestos.

Esto permite el empobrecimiento en la GLC-6-P sin afectar a los niveles de la GAL-1-P. Esto significa que la GLC-6-P ya no estará presente en la muestra después de la reacción. Por lo tanto, únicamente los monofosfatos de hexosa modificados en 1 contribuirán a la medición de los monofosfatos de hexosa totales. La invención utiliza el hecho de que el grupo carbonilo (es decir, el grupo aldehído o ceto) en los azúcares que están modificadas en la posición 1 están protegidos frente a reacciones químicas. La reacción química usada se dirige al grupo carbonilo sin afectar a los oxígenos de los grupos hidroxilo. Existen numerosas reacciones químicas bien conocidas que pueden ser utilizadas. Generalmente entran en las siguientes clases: reducción u oxidación del grupo carbonilo o reacciones con aminas que serán bien conocidas por la persona experta.

Reducción del grupo carbonilo, por ejemplo, una reducción con borhidrato de sodio. El NaBH_4 reducirá muchos carbonilos orgánicos, convirtiendo las cetonas y los aldehídos en alcoholes. Tanto las reacciones con hidruros metálicos como las adiciones organometálicas con aldehídos y cetonas reducirán el estado de oxidación del carbono del carbonilo, y pueden ser clasificadas como reducciones. Como puede apreciarse, se producen mediante el ataque de una especie nucleófila fuerte en el carbono electrófilo. Otras reducciones útiles de compuestos de carbonilo, tanto de alcoholes como de hidrocarburos, pueden tener lugar mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, se ha notificado que una hidrogenación (catalizadores de Pt, Pd, Ni o Ru), una reacción con diborano y una reducción con litio, sodio o potasio en disolventes hidroxílicos o amínicos convierten, todas, los compuestos de carbonilo en alcoholes. Sin embargo, generalmente se prefieren los hidruros metálicos complejos para dichas transformaciones ya que proporcionan unos productos más limpios con un elevado rendimiento.

Oxidación el grupo carbonilo, por ejemplo, con ácido nítrico, reactivo de Tollens o de Fehling. El átomo de carbono de un grupo carbonilo tiene un estado de oxidación relativamente alto. Esto se refleja en el hecho de que la mayor parte de las reacciones descritas hasta ahora no causan ningún cambio en el estado de oxidación (por ejemplo, la formación de un acetal y de una imina) o efectúan una reducción (por ejemplo, adiciones organometálicas y desoxigenaciones). La reacción de oxidación más habitual y característica es la conversión de los aldehídos en ácidos carboxílicos. Los agentes oxidantes preferidos son Ag^+ y Cu^{2+} como oxidantes.

Reacciones con aminas, por ejemplo, formación de una base de Schiff o reacciones con hidrazina. La reacción de aldehídos y cetonas con amoniaco o con aminas primarias forma derivados de imina, también conocidos como bases de Schiff, (compuestos que tienen una función $\text{C}=\text{N}$). Una amina preferida para modificar la posición 1 del grupo carbonilo (es decir, el grupo aldehído o ceto) en los azúcares es la hidrazina (N_2H_4), pero puede usarse un derivado de hidrazina: se conocen muchas hidrazinas sustituidas, y varias son naturales. Algunos ejemplos incluyen:

- la monometil hidrazina, en la que uno de los átomos de hidrógeno de la molécula de hidrazina se ha reemplazado por un grupo metilo (CH_3). Por la simetría de la molécula de hidrazina, no importa qué átomo de hidrógeno se sustituya.
- la 1,1-dimetilhidrazina (dimetilhidrazina asimétrica, UDMH) y la 1,2-dimetilhidrazina (dimetilhidrazina simétrica) son hidrazinas en las que dos átomos de hidrógeno son sustituidos por dos grupos metilo.
- la isoniazida, la iproniazida, la hidralazina y la fenelzina son compuestos cuyas moléculas contienen estructuras similares a la hidrazina.
- la 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) es usada habitualmente para ensayar cetonas y aldehídos en la química orgánica y clínica.
- la fenilhidrazina, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHNH}_2$, la primera hidrazina en ser descubierta.

Estas reacciones producen compuestos con una masa molecular diferente, y por lo tanto pueden ser fácilmente diferenciadas mediante una espectrometría de masas. Esto hace posible determinar unos elevados niveles de GAL-1-P independientemente de la exposición a la galactosa. La espectrometría de masas en tándem es usada ampliamente en el cribado del recién nacido debido al hecho de que puede analizarse una amplia variedad de compuestos simultáneamente en una única muestra. Esto hace posible el cribado de varias enfermedades en un único análisis. Cualquier reacción química que se introduzca en el cribado preferentemente no debería interferir con el análisis de otros analitos. Con objeto de conseguir esto, hemos elegido usar la hidrazina, aunque podría usarse cualquier reactivo específico del carbonilo para mejorar el cribado de la galactosemia por sí mismo.

En el cribado del recién nacido, la hidrazina es ampliamente usada para hacer posible el cribado de la tirosinemia. En este caso, la hidrazina se usa para liberar la succinil acetona unida a la proteína, de forma que pueda ser determinada mediante una espectrometría de masas. La razón de esta metodología es que en la tirosinemia se produce un exceso de succinil acetona. Unos elevados niveles sanguíneos de succinil acetona serían un atractivo biomarcador de la tirosinemia, sin embargo, la succinil acetona reacciona rápidamente con las proteínas que están presentes en grandes cantidades en la sangre. La succinil acetona forma enlaces covalentes con las proteínas. La hidrazina reacciona de tal forma que rompe el enlace con la proteína, liberando así la succinil acetona. De esta manera, la succinil acetona puede usarse como un biomarcador a pesar de reactividad hacia las proteínas. Este uso de la hidrazina es fundamentalmente diferente del que utilizamos en el cribado de la galactosemia. Usamos la hidrazina para reducir los niveles de los compuestos interferentes, mientras que la función de la hidrazina en el cribado de la tirosinemia es aumentar el nivel del biomarcador.

Se sabe que la hidrazina no interfiere con otros biomarcadores que son utilizados en el cribado del recién nacido. Por lo tanto, la hidrazina es un reactivo atractivo para el cribado de la galactosemia ya que mejora la sensibilidad y la selectividad del método sin interferir con otros analitos del cribado del recién nacido.

En la espectrometría de masas en tándem, los analitos se seleccionan en primer lugar según su proporción entre masa y carga. Posteriormente son fragmentados y se detectan fragmentos específicos. Las combinaciones de la proporción entre masa y carga y la masa de fragmento se conocen como transición. El uso de las transiciones permite la determinación específica de compuestos basándose en dos propiedades químicas, la masa molecular y el patrón de fragmentación. Dado que todos los monofosfatos de hexosa tienen la misma masa y el fragmento de la misma forma, no es posible diferenciar entre los diferentes monofosfatos de hexosa (HMP) únicamente mediante

una espectrometría de masas. Mediante el uso de la cromatografía de líquidos es posible separar los HMP antes de la espectrometría de masas. De esta manera es posible diferenciar entre varios HMP. Sin embargo, esto requiere tiempo y no es factible en el cribado del recién nacido. El empobrecimiento químico de todos los HMP que no están modificados en la posición 1 (la más importante, la GLC-6P) aumenta la especificidad del método sin la necesidad de una cromatografía.

La invención hace posible el cribado de la galactosemia mediante una espectrometría de masas usando el metabolito GAL-1-P como biomarcador de la enfermedad, independientemente del nivel de exposición a la galactosa. En los pacientes con galactosemia, los niveles de GAL-1-P están elevados. Sin embargo, sólo es después de una exposición a la galactosa que los niveles de la GAL-1-P aumentan bastante por encima de los niveles de la GLC-6P. Todos los HMP tienen la misma masa y el fragmento de la misma forma (es decir, tienen las mismas transiciones). Por lo tanto, la GLC-6P proporciona un trasfondo que enmascara la leve elevación presente antes de la exposición a la galactosa. La principal fuente de galactosa es la lactosa, que está presente en elevadas concentraciones en la leche y en los productos lácteos. La lactosa es rápidamente convertida en glucosa y galactosa cuando es ingerida. Los pacientes con galactosemia generalmente alcanzan un estado estacionario de GAL-IP después de entre tres y cinco días de exposición a la galactosa. Por lo tanto, salvo que se elimine la GLC-6P de la muestra, el cribado de la galactosemia mediante una espectrometría de masas usando GAL-IP solamente es factible usando muestras tomadas después de 5 días. Muchos programas de cribado toman la muestra antes de este momento. Además, los niños que no han sido expuestos a la galactosa (por ejemplo, los alimentados con un goteo de glucosa, los alérgicos a la leche) no pueden ser cribados.

Mediante la adición de un reactivo que reaccione con todos los HMP que no estén modificados en la posición 1, la señal de fondo causada por otros HMP se elimina. La reacción química causa un cambio en la masa de los compuestos y también cambia cómo se fragmentan. Esto significa que ya no proporcionarán una señal en la transición usada para los HMP. Esto hace posible el cribado de la galactosemia independientemente de la exposición a la galactosa, y por lo tanto, del momento de la muestra.

Leyendas de las figuras

- Figura 1: equilibrio entre una forma lineal y una angular de los azúcares simples
- Figura 2: reducción del grupo carbonilo de la galactosa
- Figura 3: oxidación del grupo carbonilo de la galactosa
- Figura 4: reacciones con aminas de la galactosa
- Figura 5: curva de calibración para la GAL-1-P

Ejemplo 1:

Muestras

Las muestras que se usan son manchas de sangre secas (DBS) sobre papel de filtro. También es posible usar suero, plasma o muestras sanguíneas completas. Los positivos que se usaron son DBS del biobanco de las muestras danesas de cribados del recién nacido, y representan todos los casos conocidos de galactosemia contenidos en el biobanco. Las muestras de cribado de los recién nacidos se tomaron en el día 6-7 hasta el final del año 2008. En 2009 la fecha del muestreo se cambió a entre 48 y 72 horas después del nacimiento. Afortunadamente, tres de las muestras son lo suficientemente recientes como para ser tomadas en el momento de muestra más temprano (marcada con un "*" en la tabla 1). Se analizaron las DBS de pacientes heterocigotos conocidos para la galactosemia, de posibles homocigotos para la galactosemia y de negativos para la galactosemia. Las DBS para los negativos eran tanto muestras normales como muestras de pacientes con otros trastornos.

Patrón

Se preparó una solución patrón de GAL-IP que contenía 57,1 mmol/l de GAL-IP en una solución salina (0,9 g/l de NaCl en agua). La solución se usó para preparar los calibradores.

Calibradores

Se recoge sangre en tubos venoject de 10 ml que contienen EDTA. La sangre se enfría con objeto de reducir la actividad de la GALT. Se añaden 280 µl del patrón a 1720 µl de la sangre enfriada, proporcionando una concentración final de GAL-1P de 8 mmol/l. Se realiza una serie de diluciones de 1 a 1 que dan como resultado sangre que contiene 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 mmol/l de GAL-IP. Se pipetea 75 µl de cada uno en papel de filtro convencional para el cribado del recién nacido. El intervalo de concentración de los calibradores se eligió para cubrir el intervalo que se encuentra normalmente en los neonatos con galactosemia, así como el que se encuentra en los neonatos normales. Los calibradores se dejan secar durante una noche a la temperatura ambiente. Después de secar, las muestras se almacenaron a 4 C.

Tampón de extracción

Se prepararon dos tampones de extracción diferentes, uno con y otro sin hidrazina. Ambos tampones de extracción consistían en un 80 % de metanol y un 20 % de agua que contiene 1,3 mmol/l de $^{13}\text{C}_6$ -GaMP. Podrían usarse otras proporciones de metanol-agua. Asimismo, también podría usarse acetonitrilo-agua, al igual que otros numerosos sistemas disolventes. Pueden usarse unas concentraciones que varían desde 1 hasta 30 mmol/l. Como la hidrazina se usa como el reactivo, la concentración exacta no es crucial, sólo es importante que se use en un exceso.

Extracción

Se perfora un disco de 3,2 mm de diámetro de una DBS en el pocillo de una placa de microtitulación. Se añaden 100 μl de tampón de extracción a cada pocillo. La cantidad exacta de tampón de extracción no es importante, sin embargo, es crucial que se añada la misma cantidad del patrón interno a cada muestra de un conjunto. Esto se asegura de una forma más fácil mediante la adición de la misma cantidad de tampón de extracción a los pocillos. Durante la extracción, la muestra se agita suavemente a la temperatura ambiente. Después de la extracción, el extracto es transferido a una placa nueva. La placa se incubaba a entre 40 y 50 $^{\circ}\text{C}$ durante al menos 45 minutos para permitir que tenga lugar la reacción de la hidrazina. En este punto, el extracto está listo para su análisis. En este ejemplo, todas las muestras se perforaron dos veces con objeto de asegurar unos resultados reproducibles. Se extrajo un conjunto de muestras con, y otro conjunto sin, tampón de extracción con hidrazina. Esto hace posible observar los efectos de la hidrazina.

Análisis

Las muestras fueron analizadas con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Water Quattro micro mass equipado con una bomba de 1525 μLC y un automuestreador 2777 C. El sistema se hizo funcionar en el modo de análisis por inyección de flujo usando una sonda de ionización de ESI. Se inyectaron 30 μl de muestra. Podría inyectarse cualquier volumen de extracto. Se monitorizaron las siguientes transiciones: 295,1/79,1 para la Gal-IP y 265,1/79,1 para la $^{13}\text{C}_6$ -Gal-1P.

Resultados

La curva de calibración era lineal a lo largo de la totalidad del intervalo de concentración, se muestran en la figura 5. Las concentraciones medias para los heterocigotos para la Gal-IP eran de 3,0 sin hidrazina y de 3,5 con hidrazina. Las concentraciones medias para los homocigotos para la Gal-1P eran de 1,4 sin hidrazina y de 1,5 con hidrazina. Las concentraciones medias para los negativos de la Gal-1P eran de 0,19 sin hidrazina y de 0,01 con hidrazina. Es bastante evidente que la adición de hidrazina reduce los niveles de los HMP en las mediciones de las muestras negativas sin afectar a los niveles de las positivas

En el documento WO0210740 se encontró que la concentración media de los HMP en muestras normales y en muestras de pacientes con otras enfermedades estaba en el intervalo de entre <0,10 y 0,94). Se encontró que las muestras de los pacientes con galactosemia estaban en el intervalo de entre 2,6 y 5,2 nmol/l. Estas muestras también se tomaron del biobanco danés del cribado del recién nacido. Sin embargo, todas las muestras usadas en el documento WO0210740 tenían un tiempo de muestreo de entre 5 y 7 días. Por lo tanto, todas las muestras de los pacientes con galactosemia deberían contener unos niveles en el estado estacionario. Averiguamos que los niveles sin tratamiento con hidrazina en las muestras de los pacientes que dan negativos para la galactosemia son comparables. Cuando se usa el tratamiento con hidrazina, los niveles de los HMP en las muestras de los pacientes sin galactosemia caen drásticamente, y son <0,1 nmol/l. Esto tiene una importancia fundamental para una de las muestras positivas que se tomó entre el día 2 y 3. La muestra Y38421 tenía una concentración de los HMP de 0,59 nmol/l (0,56 nmol/l con el tratamiento con hidrazina). Sin el tratamiento con hidrazina, esta muestra estaría ampliamente dentro del intervalo normal y no sería posible distinguirla de las muestras normales. Esto daría lugar a un falso negativo si la muestra fuera cribada usando una EM en tándem sin hidrazina. De hecho, tres muestras con una fecha de muestreo posterior también habrían sido mal clasificadas: PK93-1820225, PK96-1900262 y PK98-1610299. Todas están por debajo de los 0,94 nmol/l y están por lo tanto en el intervalo normal para los HMP cuando no se usa hidrazina. El uso de la hidrazina para empobrecer en otros compuestos de HMP distintos a la GAL-1P hace posible distinguir estas muestras como positivas. También es de interés que una de las muestras negativas (10DEC18R065) tenía una concentración de los HMP de 2,0 nmol/l sin el tratamiento con hidrazina, y por lo tanto sería considerada bastante por encima del intervalo normal. Después del tratamiento con hidrazina esta muestra tenía un nivel inmensurable de HMP. En este caso, la muestra habría sido un falso positivo sin el tratamiento con hidrazina, pero es correctamente asignada como negativo con el tratamiento con hidrazina.

ES 2 689 084 T3

Tabla 1

Muestras de pacientes	Sin hidrazina	Sin hidrazina	Tipo
	Conc. de HMP (mmol/l)	Conc. de HMP (mmol/l)	
PK86-980075	1,89	2,75	Positivo para Gal-1-P
PK89-1770190	3,17	3,25	
PK92-1470112	3,53	3,65	
PK93-1040522	4,44	5,14	
PK93-1820225	0,64	0,60	
PK94-1950070	2,92	3,20	
PK95-3180095	3,82	5,10	
PK96-1900262	0,83	0,62	
PK97-1130063	4,30	5,63	
PK98-1610299	0,49	0,36	
PK99-9080147	4,13	5,26	
PK00-9900138	3,23	2,92	
Y43751	5,06	5,54	
Z51831	2,83	3,34	
Y48128	4,30	6,05	
Y15197	4,80	5,36	
Y65662	1,08	1,21	
Y38421 *	0,59	0,56	
10FEB0SR152 *	4,18	4,38	
10OKT06R008 *	4,64	5,44	
Y48614	1,55	1,79	Heterocigoto para la Gal-1-P
Y55980	1,38	1,57	
Y62095	0,96	1,07	
Y62769	1,73	1,70	
10DEC18R065	2,00	-0,01	Negativo (positivo para otras enfermedades)
10DEC29R034	0,04	0,01	
11AUG03R127	0,05	0,07	
11DEC08R096	0,05	0,01	
11DEC20R343	0,06	0,01	
12JAN03R392	0,04	0,01	
12FEB03R060	0,04	0,01	
12FEB21R096	0,05	0,00	
12FEB21R458	0,05	-0,01	
12FEB21R459	0,05	0,01	
12FEB21R460	0,05	0,01	Negativo (negativo para otras enfermedades)
12FEB21R461	0,05	0,01	
12FEB21R462	0,10	0,03	
12FEB21R463	0,08	0,04	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la determinación de las concentraciones de GAL-1-P en una muestra sanguínea temprana de neonatos mediante la modificación de los grupos carbonilo que interfieren con los monofosfatos de hexosa que no están modificados en la posición 1 mediante la reacción con una hidrazina.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1 en la que la hidrazina se elige entre N₂H₄, monometil hidrazina, 1,1-dimetilhidrazina, 1,2-dimetilhidrazina, isoniazida, iproniazida, hidralazina, fenelzina, 2,4-dinitrofenilhidrazina o fenilhidrazina,
- 15 3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la muestra de los neonatos se recoge antes de los 5 días posteriores al nacimiento del neonato.
4. Un método según la reivindicación 3 en el que la concentración de GAL-1-P en la muestra de sangre se mide mediante una espectrometría de masas.

Figura 1

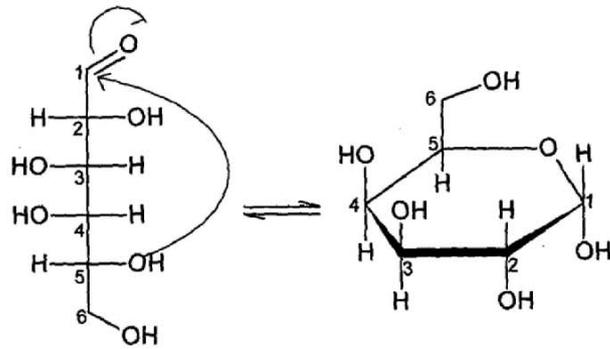


Figura 2

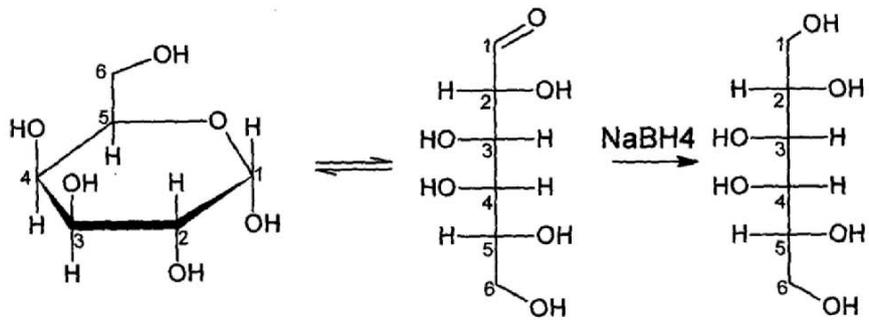
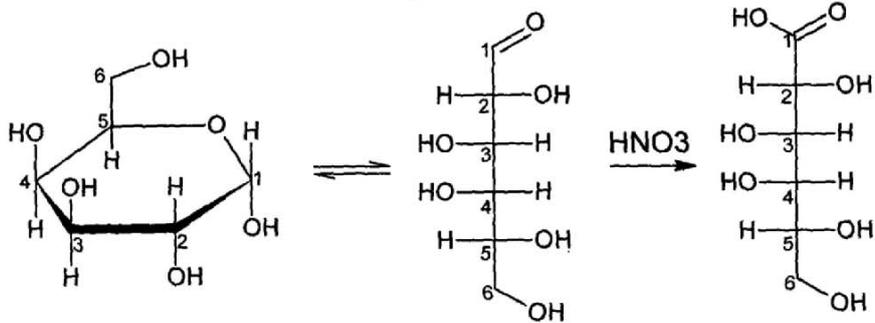


Figura 3



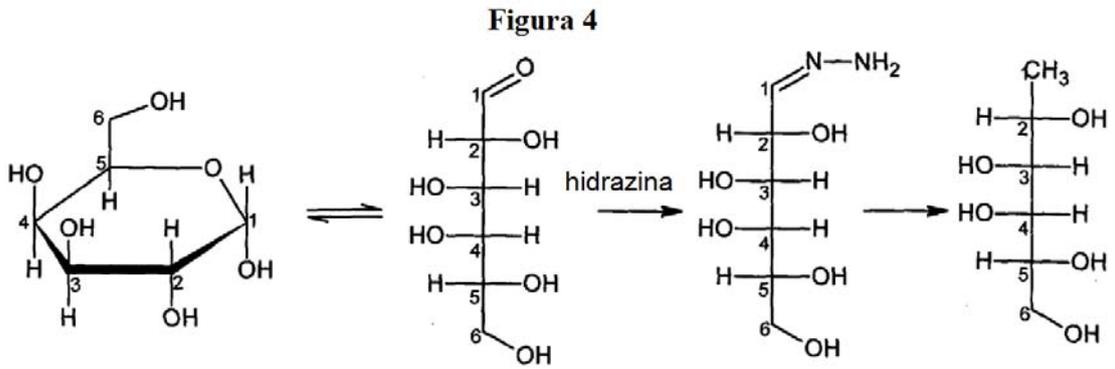


Figura 5

