

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 480**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2015 PCT/GB2015/052491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2015 E 15760235 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3186640**

54 Título: **Procedimiento para la detección de anomalías en hemoglobina**

30 Prioridad:

**29.08.2014 GB 201415367**

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

**31.03.2020**

73 Titular/es:

**MAP IP HOLDING LIMITED (100.0%)  
28 Morley Drive  
Ely, CB6 3FQ, GB**

72 Inventor/es:

**ILES, RAYMOND KRUSE;  
ILES, JASON KRUSE;  
ABBAN, THOMAS;  
DOCHERTY, SUZANNE MARGARET ELIZABETH y  
NAASE, MAHMOUD**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 751 480 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de anomalías en hemoglobina

5 El procedimiento describe cribado rápido de muestras de sangre completa, pinchazo y tarjetas de mancha de sangre, sometidas a espectrometría de Masas MALDI-TOF siguiendo:

1) lisis en agua desionizada destilada (o congelación) y dilución masiva en el intervalo de 1/10 a 1/8.000 en o bien H<sub>2</sub>O desionizada destilada o 0,1 % de TFA en H<sub>2</sub>O desionizada destilada. El espectro resultante se examina como iones individualmente cargados en el intervalo de Masa/carga de 1.500 m/z a 16.200 m/z; pero preferentemente los iones doblemente cargados de 7.550 a 8.200 m/z.

2) Incubación con formalina tamponada con citrato seguido de lisis en agua desionizada destilada (o congelación) y dilución masiva en el intervalo de 1/10 a 1/8.000 en o bien H<sub>2</sub>O desionizada destilada o 0,1 % de TFA en H<sub>2</sub>O desionizada destilada. El espectro resultante se examina como iones individualmente cargados en el intervalo de Masa/carga de 15.000 m/z a 100.000 m/z.

El espectro se genera usando preferentemente ácido sinapínico como matriz y los espectros característicos son indicativos de la presencia de una hemoglobinopatía y pueden cribar/diagnosticar todas las enfermedades de células falciformes, alfa y beta talasemias.

## Antecedentes

Las hemoglobinopatías son el grupo más grande de trastornos monogénicos humanos hereditarios por todo el mundo y son debido a mutaciones en uno o más de los genes codificadores de las proteínas globina que forman el complejo hetero-tetramérico  $\alpha_2\beta_2$  que se une a oxígeno en los glóbulos rojos-hemoglobina. La alteración estructural resultante en los pacientes (Hb) puede ser clínicamente leve, incluso oculta, para ser la causa de la morbilidad crónica grave e incluso muerte neonatal.

Dentro de los países árabes las hemoglobinopatías son las enfermedades genéticas más comunes; con índices de portador informados de 1-11 % para  $\beta$ -talasemia, 1-58 % para  $\alpha$ -talasemia y 0,3-30 % para el rasgo de las células falciformes.

En la India, las hemoglobinopatías más comunes son el rasgo de las células falciformes, Hb D y Hb E. Se estimó que, en el año 2.000, con una población de 1.000 millones y una tasa de nacimiento de 25 por mil, habría aproximadamente 45 millones de portadores y aproximadamente 15.000 bebés nacidos en la India cada año con hemoglobinopatías.

La hemoglobina en sí misma debería ser un complejo heterotetramérico que contiene dos productos de la proteína globina del gen alfa asociados con dos proteínas globina del gen beta. La genética y la bioquímica de proteína de las proteínas globina constituyentes son complejas: el locus de la  $\beta$ -globina humana de cinco genes localizados en una región corta del cromosoma 11, responsable de la creación de las partes beta de la Hemoglobina. Este locus no solamente contiene el gen para el gen de la globina beta ( $\beta$ ) expresado clásico sino también de la globina delta ( $\delta$ ), gamma-A ( $\text{A}\gamma$ ), gamma-G ( $\text{G}\gamma$ ), y épsilon ( $\text{E}$ ). El grupo del gen de la  $\alpha$ -globina humana se encuentra en el cromosoma 16 y contiene los genes Alfa 1 ( $\alpha_1$ ) y Alfa 2 ( $\alpha_2$ ) y Zeta ( $\zeta$ ) de la globina expresados (véase la Figura 1) pero recientemente se ha identificado un nuevo gen de la  $\alpha$ -globina nombrado Hb Mu ( $\mu$ ). Cuando la vida humana avanza desde la vida fetal temprana al embarazo avanzado, nacimiento y bebé/adulto el emparejamiento del gen alfa y beta cambia para igualar la circunstancia de la vida *in utero* y *extra utero*.

Por ejemplo, el embrión muy temprano produce combinaciones de Hb  $\xi_2\epsilon_2$  (Gower);  $\alpha_2\epsilon_2$  (Gower II) y  $\xi_2\gamma_2$  (Portland) por las células madre de los glóbulos rojos en el saco vitelino durante el primer trimestre de embarazo. Esto rápidamente es reemplazado por  $\alpha_2\gamma_2$  (HbF), producido por las células madre de los glóbulos rojos del hígado fetal durante el segundo y tercer trimestre. Después del nacimiento esto cambia a predominantemente  $\alpha_2\beta_2$  (HbA), algo de  $\alpha_2\delta_2$  (HbA2) y cantidades traza de HbF (véase la Figura 1).

No sorprendentemente las diversas hemoglobinopatías identificadas se fijaron como características del complejo de hemoglobina hetero-tetramérica distinta de la característica de una proteína globina aislada. En la enfermedad de células falciformes la hemoglobina Hb S está donde el gen  $\beta$  de la globina tiene una mutación de cambio de aminoácido específica  $\beta_6\text{Glu-Val}$  en la posición 6 de la proteína globina  $\beta$  y se denomina S $\beta$ ; y la Hb hetero-tetramérica es  $\alpha_2\text{S}\beta_2$ . El rasgo de las células falciformes que tiene un complejo de  $\beta$  normal y S $\beta$  dentro de los glóbulos rojos constituyen moléculas de hemoglobina como resultado de la heterocigosidad y con frecuencia pasa desapercibido. La Hemoglobina C (HbC) es una variante estructural de la hemoglobina normal (HbA) causada por una sustitución de aminoácido en la posición 6 de la cadena de  $\beta$ -globina ( $\beta_6\text{Glu-Lys}$ ). Es una de las mutaciones de hemoglobina anormales más prevalentes mundialmente junto a la hemoglobina S, la cual se da en la misma posición (HbS;  $\beta_6\text{Glu-Val}$ ), y la hemoglobina E (HbE,  $\beta_6\text{Glu-Lys}$ ). En los individuos de heterocigotos HbC (AC), este rasgo es asintomático. La homocigosidad (CC) causa anemia hemolítica clínicamente leve, debido a la solubilidad reducida

de los glóbulos rojos lo cual puede conducir a la formación de cristal. HbC es principalmente de significancia clínica cuando se hereda en combinación con HbS (enfermedad de hemoglobina C-falciforme). Las talasemias surgen debido a la mutación que previene la expresión de o bien el gen de la  $\beta$ -globina ( $\beta$ -talasemia) o los genes de la alfa-globina ( $\alpha$ -talasemia). Como consecuencia surge emparejamientos de Hb hetero- y homotetramérica inusuales.

5 En las  $\beta$ -talasemias hay síntesis reducida de la globina  $\beta$  ( $\beta^+$ -talasemia) o ausencia de síntesis de globina  $\beta$  ( $\beta^0$ -talasemia). Las formas clínicamente leves de  $\beta$ -talasemia son denominadas talasemia intermedia. También hay una  $\delta\beta$ -talasemia que surge de la fusión génica y se disminuye la producción de tanto cadenas  $\beta$  como  $\delta$ . La inestabilidad en la síntesis de la cadena de globina con más cadenas de  $\alpha$ -globina que beta conduce a la precipitación de  $\alpha$ -globina en los glóbulos rojos, lo cual conduce a la destrucción prematura de la célula en la médula ósea o la sangre periférica. La  $\alpha$ -globina en exceso es muy dañina a la célula; generando especies de oxígeno reactivo (ROS) que destruyen las proteínas celulares, los lípidos y los ácidos nucleicos en los precursores del glóbulo rojo. Además, la hemoglobina  $\alpha$  tetramérica es estructuralmente inestable, con una tendencia a desnaturalizarse tras la oxidación, que rellena el citoplasma y la membrana celular con cadenas de  $\alpha$ -globina precipitadas, hemo libre, porfirinas e hierro, los cuales propagan más la producción de ROS. Las células eritroides tienen rutas proteolíticas para degradar  $\alpha$ -globina libre en exceso, pero estas rutas se pueden sobrecargar.

20 En las  $\alpha$ -talasemias hay la pérdida de expresión de los genes de globina  $\alpha$ ; pero puesto que los seres humanos tienen cuatro copias génicas (dos sobre cada cromosoma parental, véase la Figura 1) hay una mayor capacidad de tolerancia. Sin embargo esto también significa una capacidad igualmente mayor para portadores y como consecuencia cuando se da esto ha surgido una mayor incidencia de  $\alpha$ -talasemia dentro de las poblaciones definidas. Por tanto, esta afección se da muy frecuentemente en Asia; desde la India a China, incluyendo el sudeste de Asia, y también se da en el Oriente Medio y África.

25 3 genes alfa funcionales - los pacientes son portadores silenciosos sin síntomas o señales ( $\alpha$ -talasemia mínima  $\alpha$ -/ $\alpha\alpha$ ).

30 Solamente 2 genes alfa funcionales - los pacientes son portadores silenciosos,  $\alpha$ -talasemia menor o rasgo de  $\alpha$ -talasemia pero con frecuencia tienen microcitosis. Los dos genes se pueden dar o bien en el mismo cromosoma (tipo cis) o en cada uno de los pares (tipo trans).  $\alpha\alpha$ -/ $(\alpha^0$  talasemia) o  $\alpha$ -/ $\alpha$ - ( $\alpha^+$  talasemia). El rasgo de la  $\alpha^0$  talasemia tipo cis tiende a encontrarse en individuos de descendencia asiática, mientras que la  $\alpha^+$  talasemia de tipo trans tiende a aparecer en individuos de descendencia africana. Si una madre es un portador de  $\alpha^0$  talasemia, su embarazo es de riesgo para el síndrome de la hidropesía fetal de Bart, mientras que el peor resultado posible de un embarazo de una madre con  $\alpha^+$  talasemia es una afección mucho más leve, enfermedad de Hb-H.

35 Solamente 1 gen alfa funcional ( $\alpha$ -/ $-$ ). Da lugar a un exceso de  $\beta$ -globina, el exceso de  $\beta$ -globina forma tetrámeros y se depositan como  $\beta_4$  (HbH). HbH no es estable y es térmicamente lábil, los pacientes son anémicos y hay esplenomegalia.

40 No genes alfa funcionales causa muerte fetal temprana: El exceso de cadenas de  $\gamma$ -globina conduce a la deposición de tetrámeros compuestos de cuatro cadenas gamma:  $\gamma_4$  (Hb de Bart). Sin las cadenas de  $\alpha$ -globina, no puede haber HbF o hemoglobina adulta (HbA, HbA2) y el resultado es hidropesía fetal con parto de un niño muerto. Existe un riesgo incrementado de toxemia de embarazo y de hemorragia posparto en la madre portadora de  $\alpha^0$  talasemia.

45 Mutación Constant Spring de hemoglobina. Un caso inusual del estado de portador silencioso es el individuo que porta la mutación Constant Spring de hemoglobina. Esto es una  $\alpha$ -globina anormal alargada debido a una mutación del codón de terminación. Los individuos que tienen esta mutación tienen índices de glóbulos rojos normales, pero pueden tener niños que tienen la enfermedad de Constant Spring de HbH si el otro progenitor tiene rasgo de  $\alpha$ -talasemia.

50 Por tanto, las características fisicoquímicas y la genética molecular de las proteínas globina/genes específicos es la bases del ensayo molecular para las hemoglobinopatías.

55 Las masas moleculares de la globina  $\alpha$  es de 15.128 y la globina  $\beta$  15.868; una diferencia de algunos 740 Da. Por tanto, los complejos homotetraméricos de Hb y sus hemo (60.000 a 68.000 Da) y los trímeros (aproximadamente 47.500 Da) y dímeros derivados (30.000 a 35.000 Da), de globina  $\alpha$  o  $\beta$  variará en masa en 2.960, 2.220 y 1.480 Da respectivamente. Estas resoluciones de masa están dentro del alcance de la espectrometría de masas MALDI-ToF. Normalmente el proceso de la espectrometría de masas MALDI-ToF disocia tales complejos de hemoglobina en los monómeros libres. El tratamiento con formalina normalmente "fija" una proteína formando entrecruzamientos internos por las cadenas laterales de resto de lisina formando un puente de metilo con un hidrógeno libre de un enlace de amida adyacente. Sin embargo, la formalina solamente se entrecruza entre las proteínas si están naturalmente en proximidad muy cercana unas a otras y los grupos laterales de aminoácido correctos se alinean en proximidad cercana. Eso es el caso del complejo tetramérico de la Hemoglobina. Por tanto, el pretratamiento de la sangre completa con una solución de formalina, tal como solución salina formal tamponada con citrato "fijará" el complejo de Hb de modo que no se disocia más y se resuelve por MALDI-ToF MS como m/z característica de los

complejos tetra, tri y diméricos. Por tanto, el patrón de masa característico de cualquier talasemia particular, entonces, se puede mapear y usar como una herramienta de diagnóstico/cribado para Talasemias como se describe en el presente documento.

5 Kleinert y col. (2008) *Clinical Chemistry* 54:69-76 describe el uso de la espectrometría de masas para identificar hemoglobinopatías analizando moléculas de globina individualmente cargadas. Hachani y col. (2011) *Proteomics - Clinical Applications* 5:405-414 describe el uso de la espectrometría de masas para cribar las enfermedades de células falciformes analizando la globina individualmente cargada. El documento WO 2012/166055 describe el uso de la espectrometría de masas para identificar alfa-talasemia analizando moléculas de globina individualmente cargadas. Troxler y col. (2012) *Advances in Clinical Chemistry* 57:1-28 describe el uso de la espectrometría de masas para analizar las cadenas de Hb examinando los espectros alrededor de 15.000 Da para detectar moléculas individualmente cargadas.

15 Zanella-Cleon y col. (2009) *Clinical Biochemistry* 42:1.807-1.817 revisa el análisis por MS de hemoglobina para detectar diversas enfermedades, sugiriendo que las muestras se someten a digestión triptica, en vez de análisis de moléculas de globina completa.

20 La presente solicitud proporciona un procedimiento de detección de una hemoglobinopatía que comprende someter una muestra sanguínea obtenida de un sujeto a espectrometría de masas de espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-ToF MS), en donde el espectro se examina para los iones doblemente cargados de proteínas globina en el intervalo de 5.000-8.200 m/z.

25 “Análisis espectral de masas directo” significa que los datos generados del análisis espectral de masas se usan en el procedimiento, y no en la masa deducida de los componentes presentes en la muestra. La hemoglobinopatía como se usa en el presente documento se refiere a cualquier afección causada por una mutación genética que da como resultado la expresión o estructura anormal de una de las moléculas de globina en la molécula de hemoglobina. Los ejemplos de hemoglobinopatías incluyen, pero no se limitan a, anemia de células falciformes,  $\alpha$ -talasemia,  $\beta$ -talasemia, HbAG, HbA/Enfield, HbH, HbAF, HbS, HbC, HbE, HbD-Punjab, HbO-Arab, HbG-Philadelphia, Hb Constant Spring, Hb Hasharon, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, HbM, y Hb Kansas. Las hemoglobinopatías preferidas son la anemia de células falciformes,  $\alpha$ -talasemia,  $\beta$ -talasemia, HbC, HbE, HbAG, HbA/Enfield, HbH y HbAF.

35 La muestra sanguínea puede ser una muestra de sangre completa recogida usando procedimientos de flebotomía convencionales. Por ejemplo, la muestra se puede obtener a través de venopunción o como una muestra por pinchazo, tal como una punción capilar o pinchazo en el talón. La muestra sanguínea puede ser una mancha de sangre seca capturada sobre papel de filtro u otro material adecuado para capturar la mancha de sangre.

La muestra sanguínea puede ser una muestra no tratada. Como alternativa, la muestra sanguínea se puede diluir o procesar (concentrar, filtrar, etc).

40 La muestra sanguínea preferentemente se mezcla con o bien un agente de lisis para lisar los glóbulos rojos o inicialmente un agente de entrecruzamiento tal como formalina citrada durante hasta 24 horas antes de la lisis. Otros agentes de lisis adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. El agente de lisis se puede mezclar con la muestra a una concentración adecuada tal como 1/1 (es decir, 1 parte de sangre por 1 parte de agente de lisis), 1/5, 1/10 o 1/20 o mayor. Si la muestra sanguínea es una mancha de sangre seca, el material de captura de la mancha de sangre sobre el cual se seca la muestra se puede colocar en o bien un agente de lisis o formalina citrada para reconstituir la muestra. Como alternativa, la mancha de sangre se puede reconstituir en un tampón adecuado antes de la fijación con formalina seguido de lisis o lisis directa. Los tampones adecuados y los otros agentes de entrecruzamiento de proteína son conocidos por los expertos en la técnica. Un agente de lisis preferido es agua destilada desionizada. Como alternativa, la muestra se puede congelar para lisar las células.

50 El agente de entrecruzamiento preferido es solución salina formal tamponada con citrato. La muestra se mezcla preferentemente con el agente que contiene formalina a una concentración de 1/5 (es decir, 1 parte de sangre por 5 partes de solución salina formal citrada). La muestra se deja reaccionar durante un periodo adecuado para permitir que las moléculas de globina de los glóbulos rojos lleguen a estar fijadas. Por ejemplo, la mezcla se puede dejar durante 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24 horas o más. La muestra preferentemente se deja durante un mínimo de 6 horas.

60 Preferentemente la muestra sanguínea se diluye, preferentemente después de la lisis. La etapa de dilución purifica eficazmente la Hb de otros componentes de la sangre para el análisis espectral de masas ya que la Hb es la proteína más abundante. La muestra sanguínea se puede diluir 1/10 (es decir, una parte de muestra en 10 partes de diluyente), 1/166, 1/333, 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/2.500, 1/8.000 o más. Lo más preferentemente la muestra se diluye 1/2.000 es decir, una parte de muestra sanguínea en 2.000 partes de diluyente. Preferentemente el diluyente es 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua desionizada destilada, o agua desionizada destilada.

65 Preferentemente, la muestra sanguínea no se procesa entre la fijación, la lisis y la dilución. En otras palabras la muestra sanguínea solamente se lisa y se diluye; o se fija, se lisa y se diluye. Tal procesamiento incluye concentrar

las proteínas de interés, por ejemplo, Hb; aislar Hb, por ejemplo, por HPLC o tratamiento con un agente químico para alterar o romper los enlaces intramoleculares. En particular, la muestra preferentemente no se trata con un agente de reducción. Más preferentemente la muestra no se trata con ditionitriol (DTT).

5 Preferentemente, el procedimiento puede comprender comparar los patrones de espectro resultantes de dicho análisis espectral de masas directo de una muestra con los patrones espectrales de masas obtenidos del análisis espectral de masas directo de una muestra sanguínea de un control sano normal para determinar si dichos patrones de dicha muestra son indicativos de una hemoglobinopatía. Como se usa en el presente documento un "control sano normal" es un sujeto que no tiene una hemoglobinopatía.

10 Preferentemente, las diferencias en los patrones del espectro de masas se determinan por un procedimiento cuantitativo automatizado que puede distinguir entre un espectro de masas de una muestra sanguínea de un control sano normal y el patrón espectral de masas de una muestra sanguínea de un sujeto con una hemoglobinopatía.

15 Como se usa en el presente documento, un "procedimiento cuantitativo automatizado" se refiere al procesamiento de los datos de salida directos de un espectrómetro de masas al que se somete la muestra mediante un programa informático.

20 Los procedimientos de generación de espectros de masas, tales como MALDI-ToF MS, comúnmente no son técnicas cuantitativas. Por ejemplo, el eje Y en estos espectros es un indicador de "fuerza relativa" del pico de masa dentro del espectro, pero no entre los picos de masa en una muestra frente a otra muestra. Para superar esto, la normalización necesita volver el valor del eje Y comparable entre los espectros de la muestra. Por tanto, el espectro obtenido del análisis espectral de masas directo preferentemente se normaliza. El espectro se somete a procesamiento de datos que da como resultado un índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa de los espectros de masas. Esto convierte el espectro de masas cualitativo en un valor cuantitativo. La normalización es el procedimiento de producción de una estructura de datos para reducir la repetición y las inconsistencias de los datos. Diversas técnicas de normalización son posibles. Los procedimientos de normalización típicos incluyen porcentajes del área total a un punto dado, cuadrado de la diferencia y diferencias de la relación. El porcentaje de la diferencia se calcula como

30 
$$\text{Porcentaje de la diferencia} = (Y1 - Y_{\text{ref}} / Y_{\text{ref}} \times 100 \%)$$

En donde  $Y_{\text{ref}}$  es el valor de Y mínimo del espectro, e Y1 es el valor de Y para cada punto.

35 El cuadrado de la diferencia se calcula como

$$\text{Cuadrado de la diferencia} = (Y1 - Y_{\text{ref}})^2$$

40 La diferencia de la relación se calcula como

$$\text{Diferencia de la relación} = (\text{Relación 1} - \text{Relación 2})$$

Por tanto los datos de los espectros de masas se manipulan para proporcionar una medida cuantitativa del cambio cualitativo mostrado en los espectros

45 Preferentemente, el modelo espectral se crea mediante un procedimiento de procesamiento de datos que da como resultado un índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa del espectro de masas dentro de un intervalo establecido. Esto vuelve todos los espectros comparables de modo que la media y la variabilidad centil en cada valor de masa dado se puede modelar. Preferentemente, el intervalo está entre aproximadamente 6.000-700.000 m/z.

50 Para las formas monovalentes de las globinas el intervalo examinado es de 6.000-17.000 m/z, más preferentemente 7.500-16.200 m/z. Se puede medir las moléculas cargadas solas y/o cargadas doble de las globinas de los glóbulos rojos. Para los iones individualmente cargados, se examina el espectro en el intervalo de masa/carga de 15.000 m/z a 16.200 m/z. Para los iones doblemente cargados, se examina el espectro en el intervalo de masa/carga de 5.000-8.200 m/z, preferentemente 6.000 a 8.100 m/z, más preferentemente 7.550 a 8.200 m/z o 7.550 a 8.100 m/z. La tabla de a continuación presenta la posición de los picos correspondientes a las diversas globinas correspondientes a los iones doblemente cargados.

Cadena de globina	M/Z de $[M=2H]^{2+}$ Basado en las secuencias publicadas y la escisión pos-traducción conocida
A	7.564 m/z
$\mu$	7.743 m/z
$\xi$	7.753 m/z
$\theta$	7.754 m/z

(Continuación)

Cadena de globina	M/Z de [M=2H] <sup>2+</sup> Basado en las secuencias publicadas y la escisión pos-traducción conocida
β	7.934 m/z
Δ	7.963 m/z
Gγ	7.999 m/z
Aγ	8.005 m/z
ε	8.102 m/z

Para las formas multivalentes de las globinas el intervalo examinado es de 30.000-700.000 m/z.

- 5 Un índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa de los espectros de masas dentro de un intervalo dado se puede calcular usando el área bajo la curva de los espectros de masa. Luego, esto se puede usar para calcular la intensidad relativa.

10 El área bajo la curva de los espectros de masas se calcula dividiendo el espectro de masa en una pluralidad de clases de un número dado de m/z. Como se usa en el presente documento, "Clase" tiene su significado estadístico normal, por ejemplo, de ser uno de una de serie de intervalos de valor numérico en el que se clasifican los datos en el análisis estadístico. Por ejemplo, las clases pueden ser 100 m/z, 50 m/z, 25 m/z, 10 m/z o 5 m/z en tamaño. A menor tamaño de la clase usada, mayor refinado es el procedimiento.

15 La intensidad relativa (valor del Eje Y) se puede calcular por el procedimiento del "cuadrado de la diferencia" y, por lo tanto, un valor de Y comparable dado por cada clase. En este procedimiento, el valor de Y mínimo del espectro (Yref) se sustrajo del valor de Y en cada clase y se calculó el cuadrado de la diferencia. La fórmula usada para calcular el cuadrado de la diferencia =  $(Y1-Yref)^2$  y el cuadrado calculado de la diferencia, a continuación, se denominó "intensidad relativa".

20 La intensidad relativa en cada clase de masa en una muestra se puede capturar usando pruebas estadísticas comercialmente disponibles tales como MATLAB®, Stats Direct™ y Origin 8™.

25 Una vez que el espectro se ha sometido a un procedimiento de procesamiento de datos que da como resultado un índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa del espectro de masas, los niveles de las globinas presentes se pueden determinar midiendo la altura relativa de los picos correspondientes a las diversas globinas. Preferentemente el intervalo está entre aproximadamente 6.000-700.000 m/z. Para las formas monovalentes de las globinas el intervalo examinado es de 5.000-8.200 m/z, preferentemente 6.000-17.000 m/z, más preferentemente 7.500-16.200 m/z. Para los iones doblemente cargados, se examina el espectro en el intervalo de masa/carga de 5.000-8.200 m/z o 6.000 a 8.100 m/z, más preferentemente 7.550 a 8.100 m/z o 7.550 a 8.200 m/z.

35 Preferentemente, el espectro obtenido del análisis espectral de masas directo de la muestra se compara con un modelo espectral de referencia de masa esperada entre aproximadamente 6.000-7.000 m/z o 6.000-100.000 m/z determinado a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de controles sanos normales. El "modelo espectral de referencia" es la masa esperada dentro de un intervalo establecido, determinado a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de controles sanos normales. Preferentemente el intervalo está entre aproximadamente 6.000-700.000 m/z. Para las formas monovalentes de las globinas el intervalo examinado es de 6.000 - 17.000 m/z, preferentemente 7.500-16.200 m/z, más preferentemente 5.000-8.200 m/z.

40 Para los iones doblemente cargados, se examina el espectro en el intervalo de masa/carga de 5.000-8.200 m/z o 6.000 a 8.100 m/z, más preferentemente 7.550 a 8.100 m/z o 7.550 a 8.200 m/z. Preferentemente el modelo espectral de masa esperada entre aproximadamente 5.000-8.200 m/z o 6.000-8.100 m/z se determina a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de controles sanos normales.

45 Preferentemente, el modelo espectral se crea mediante un procedimiento de procesamiento de datos que da como resultado un índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa de los espectros de masas dentro de un intervalo establecido. Esto vuelve todos los espectros comparables de modo que la media y la variabilidad centil en un valor de masa dado se puede modelar. Preferentemente el intervalo está entre aproximadamente 6.000-7.000 m/z. Más preferentemente el intervalo es de 5.000-8.2000 m/z o 6.000 a 8.1000 m/z,

50 lo más preferentemente 7.550 a 8.100 m/z o 7.550 a 8.200 m/z.

55 Preferentemente, el espectro obtenido del análisis espectral de masas directo de la muestra se compara con un modelo de enfermedad, de masa esperada entre aproximadamente 6.000-300.000 m/z determinado a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de sujetos con una hemoglobinopatía. Un modelo de "enfermedad" paralelo, se genera a partir del índice estadísticamente determinado normalizado de la proporción relativa de los espectros de masas dentro de un intervalo establecido creado a partir de muestras sanguíneas obtenidas de un sujeto que se sabe que tiene una hemoglobinopatía. Preferentemente el intervalo está entre aproximadamente 6.000-700.000 m/z. Más preferentemente el intervalo es de 5.000-8.2000 m/z o 6.000 a 8.1000

m/z, lo más preferentemente 7.550 a 8.100 m/z o 7.550 a 8.200 m/z. Después de aplicar las técnicas de normalización se comparan el valor espectral de las muestras obtenidas de controles sanos normales y aquellas de sujetos que padecen una hemoglobinopatía. La presencia de una hemoglobinopatía causa un cambio en el patrón de los picos en el espectros normalizado, debido a un cambio en la masa causado por la mutación dentro de las proteínas globina.

Los sujetos con anemia de células falciformes tienen un pico para S $\beta$  a 7.920 m/z claramente resuelto a partir de  $\beta$ -globina a 7.934 m/z y C $\beta$  aproximadamente 7.933 m/z. Por tanto, la presencia de un pico para S $\beta$  a 7.920 m/z es indicativo de anemia de células falciformes.

En la muestra sanguínea de un sujeto con hemoglobina fetal persistente hereditaria, HbAF, la intensidad de  $\beta$ -globina a 7.934 m/z se reduce notablemente y el pico correspondiente a A $\gamma$  a 8.005 m/z se eleva notablemente. También se puede ver la elevación de la línea base de globinas  $\delta$  y G $\gamma$  a 7.965 y 7.996 m/z. Por tanto, la presencia de un pico correspondiente a A $\gamma$  a 8.005 m/z es indicativo de HbAF. En HbAG hay una mutación en  $\alpha$ 68Asn-Lys. Esto causa picos adicionales a 7.612 y 7.645 m/z que pueden representar las alfa-globinas fetales  $\xi$  y la  $\mu$  recientemente descubierta. También puede haber una elevación de G $\gamma$  a 7.963. Por tanto, la presencia de picos a 7.612 y 7.645 m/z, opcionalmente junto con una elevación de G $\gamma$  a 7.993 m/z puede ser indicativo de HbAG.

HbA/Enfield es una mutación de  $\alpha$ 89His-Glu. Los sujetos con esta afección tienen picos adicionales a 7.612 y 7.645 m/z que pueden representar las alfa-globinas fetales  $\xi$  y la  $\mu$ -globina recientemente descubierta. También puede haber una elevación de  $\delta$  a 7.963 y G $\gamma$  a 7.993 m/z. Por tanto, la presencia de picos a 7.612 y 7.645 m/z, opcionalmente junto con una elevación de  $\delta$  a 7.963 y G $\gamma$  a 7.993 m/z puede ser indicativo de HbA/Enfield.

En particular, la relación del valor espectral normalizado de las muestras obtenidas de controles sanos normales y aquellas de sujetos que padecen una hemoglobinopatía se pueden comparar y el análisis estadístico se puede llevar a cabo de manera que diversas medidas, por ejemplo, media, desviación típica, asimetría, cuartil superior e inferior, mediana, curtosis así como el 95º centil y el 5º centil se pueden calcular.

La diferencia en la intensidad relativa en cada clase de masa entre las muestras obtenidas de controles sanos normales y aquellas de sujetos que padecen una hemoglobinopatía se puede capturar usando pruebas estadísticas comercialmente disponibles tales como MATLAB®, Stats Direct™ y Origin 8™.

El modelo espectral de referencia y el modelo de enfermedad, a continuación, se comparan por representación gráfica para identificar los “puntos calientes”, es decir, los puntos de diferencia entre los dos modelos. Esto puede ser una disminución o un incremento en el tamaño de un pico, o la aparición de un pico. A continuación, los puntos de diferencia se pueden usar para determinar la presencia de una hemoglobinopatía. Preferentemente esto se hace usando un algoritmo adecuado.

El análisis de los espectros de masas se puede calcular fácilmente usando un programa informático adecuado. Un ordenador también se puede programar con el algoritmo adecuado para proporcionar un indicio de la presencia de una hemoglobinopatía.

Preferentemente, el análisis espectral de masas llevado a cabo es espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-ToF MS).

Cuando se usa un agente de entrecruzamiento, el porcentaje de abundancia relativo de los tetrámeros, pentámeros y trímeros presentes en comparación con los dímeros se puede utilizar para diagnosticar la presencia de una hemoglobinopatía. Hay dos formas de tetrámero presentes - el S-tetrámero que contiene solamente las proteínas globina y el L-tetrámero que contiene la hemo así como las globinas. Una abundancia relativa media del S-tetrámero fijado en comparación con el dímero fijado  $\geq 10$ , preferentemente  $\geq 15$  y/o una abundancia relativa media del L-tetrámero fijado en comparación con el dímero fijado  $\geq 6$ , preferentemente  $\geq 10$  es indicativo de la presencia de una hemoglobinopatía. Una vez que se alcanza este resultado el paciente puede someterse más a investigación para identificar la hemoglobinopatía específica presente.

También se describe un procedimiento de detección de una hemoglobinopatía que comprende:

- a) obtener una muestra sanguínea de un sujeto.
- b) Dilución y lisis; o fijación, dilución y lisis de dicha muestra.
- c) Someter la muestra a análisis espectral de masas directo
- d) Examinar los patrones resultantes de dicho análisis para determinar si dichos patrones de dicha muestra de un sujeto son indicativos de una hemoglobinopatía

Preferentemente los patrones de espectro resultantes a partir del análisis se comparan con los patrones espectrales de masas obtenidos de una muestra sanguínea de un control sano normal.

En esta memoria, el verbo “comprender” tiene su significado de diccionario normal, para denotar la inclusión no exclusiva. Es decir, el uso de la palabra “comprender” (o cualquiera de sus derivados) para incluir una característica o más, no excluye la posibilidad de también incluir características adicionales. La palabra “preferible” (o cualquiera

de sus derivados) indica una característica o más que es preferida pero no esencial.

Todas o alguna de las características descritas en esta memoria (incluyendo cualquiera de las realizaciones acompañantes, resumen y dibujos), y/o todas o alguna de las etapas de cualquier procedimiento o proceso así descrito, se puede combinar en cualquier combinación, excepto combinaciones en donde al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente exclusivas.

Cada característica descrita en esta memoria (incluyendo cualquiera de las reivindicaciones acompañantes, resumen y dibujos), se puede reemplazar por características alternativas que sirven al mismo propósito, equivalente o similar, a menos que se indique expresamente lo contrario. Por tanto, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita es un ejemplo solamente de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A continuación, la solicitud se describirá en los siguientes ejemplos que se refieren a las siguientes figuras.

La Figura 1 muestra una representación esquemática simplificada de los genes de beta y alfa-globina funcionalmente expresados encontrados en seres humanos (se omiten los pseudogenes conocidos dentro de los grupos de genes).

La Figura 2 muestra un espectro de sangre completa con HbA .

La Figura 3 muestra un espectro de HbAS.

La Figura 4 muestra un espectro de HbAC.

La Figura 5 muestra un espectro de HbAC.

La Figura 6 muestra un espectro de HbAE.

La Figura 7 muestra un espectro de HbF.

La Figura 8 muestra un espectro de HbH.

La Figura 9 muestra un espectro de HbAG.

La Figura 10 muestra un espectro de HbA/Kenya.

La Figura 11 muestra la comparación tabulada de los espectros para las muestras fenotípicamente normales y anormales.

La Figura 12 muestra el patrón espectral de masas entre 30.000 a 70.000 m/z de HbA purificada fijada con formalina y HbA de sangre completa fijada con formalina.

La Figura 13 muestra un espectro de muestra sanguínea de enfermedad de células falciformes (SSD) fijada con formalina.

La Figura 14 muestra la comparación tabulada de espectros fijados con formalina para muestras fenotípicamente normales y anormales.

## Ejemplo 1

### Procedimiento

#### Procesamiento de muestra

La dilución óptima para la sangre completa está entre 1/1.000 y 1/2.000 en o bien ddH<sub>2</sub>O o 0,1 % de TFA en ddH<sub>2</sub>O después de una lisis inicial de la muestra con ddH<sub>2</sub>O (1:1 v/v). Esta etapa dilucional purifica efectivamente la Hb de otros componentes de la sangre para el análisis espectral de masas ya que la Hb es la proteína más abundante. Además, la dilución en ddH<sub>2</sub>O (o 0,1 % de TFA/ddH<sub>2</sub>O) disocia las proteínas globina constituyentes para el análisis resuelto por espectrometría de masas MALDI-ToF.

Las diluciones mayores de 1/8.000 dan como resultado señal espectral de masas progresivamente más débil.

#### Análisis espectral de masas MALDI ToF

Las matrices óptimas son ácido sinapínico (SA), ácido ferúlico (FA) y ácido alfa 4-ciano hidroxicinámico (CHCA). El ácido sinapínico, que es la matriz preferida, se mezcla o se usa como capa de revestimiento previo con una gota mezclada de muestra diluida 1/1.000 a 1/8.000 (óptima 1/2.000). Las placas de MALDI de acero (384 pocillos) se prepararon pipeteando 0,5 µl de solución de matriz (ácido sinapínico - 20 mg/ml disuelto en 50/50 v/v de acetonitrilo (ACN)/ddH<sub>2</sub>O y 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA)) y se dejó secar. Se mezcló 0,5 µl de muestra con SA y se aplicó sobre la matriz seca. Esto se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis por MALDI TOF MS.

El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas MALDI de Shimadzu Axima plus: el láser de nitrógeno de pulso ( $\lambda_{\text{max}}=337$  nm), se disparó a 75 a 80 % de unidades arbitrarias de energía. Los iones se aceleraron por un tubo lineal de 1,2 m de un campo eléctrico de 20 kV hacia abajo y se detectó por un detector de placa de micro-canal a una tasa de muestreo de 500 MHz. Los espectros se generaron sumando 20-30 disparos de láser. Un modo lineal positivo con extracción retrasada se usó para adquirir los espectros.

El instrumento se calibró internamente por lo cual se aplicó una muestra diluida 1/1.000 de sangre con 10 pmoles/ul de Citocromo C (1:2, v/v). La calibración en dos puntos generada era en  $[M+H]^+ = 12.361$  m/z y  $[M+2H]^{2+} = 6.181$  m/z.

- 5 Se recogió y se analizó una región espectral de masas de entre 6.000 y 17.000 m/z y en particular el intervalo de 6.000 a 8.100 m/z o 6.000 a 8.200 m/z examinado para las proteínas globina doblemente cargadas.

Estos se caracterizan tanto con respecto a la asignación de masa centroide como la intensidad de pico relativo o bien como altura de pico normalizada comparativa o área de pico normalizada en el intervalo espectral examinado.

10

## Resultados

### Identificación de globinas

- 15 La mejor resolución se consiguió en el intervalo de m/z 6.000 a 8.200 correspondiente a iones  $[M=2H]^{2+}$ .

Asignación de pico a las cadenas de globina	M/Z de $[M=2H]^{2+}$
A	7.564 m/z, $\pm 5$ m/z
Aductos de acetilo y carbonilo de $\alpha$ -globina	7.594 m/z, $\pm 5$ m/z
$\alpha$ glicada	7.645 m/z, $\pm 5$ m/z
Aducto de Matriz (SA) de $\alpha$ -globina	7.671 m/z, $\pm 5$ m/z
$S\beta$	7.921 m/z
$\beta$	7.936 m/z, $\pm 5$ m/z
$\Delta$	7.965 m/z, $\pm 5$ m/z
G $\gamma$	7.996 m/z, $\pm 5$ m/z
A $\gamma$	8.005 m/z, $\pm 5$ m/z
$\beta$ glicada	8.017 m/z, $\pm 5$ m/z
Aducto de matriz (SA) de $\beta$ -globina	8.039 m/z $\pm 5$ m/z
Marcador 8.088 m/z posiblemente $\epsilon$ -globina	8.088 m/z $\pm 5$ m/z

### Patrones espectrales de muestra patológica

- 20 Como descubrimiento general, en todas las muestras en las que estaba presente una hemoglobinopatía se veían picos correspondientes a o bien genes de globina mutada o fetal. Esto no era el caso para una muestra sanguínea de no afectados.

- 25 Una muestra de Hb adulta normal revela picos para  $\alpha$ -globina y  $\beta$ -globina con otras globinas encontradas en HbA2 y HbF ( $\delta$ , G $\gamma$  y A $\gamma$ ) apenas detectada (Figura 2).

Hb S - Enfermedades de células falciformes (Figura 3 y 4)

- 30 La muestra sanguínea de un paciente con rasgo de las células falciformes (HbAS) reveló picos de una  $\alpha$ -globina normal y formando aducto con SA y un pico para S $\beta$  a 7.920 m/z claramente resuelto a partir de  $\beta$ -globina a 7.934 m/z y C $\beta$  aproximadamente 7.933 m/z. La elevación de la línea base de las globinas  $\delta$  y G $\gamma$  a 7.965 y 7.996 m/z era evidente ya que era un nuevo pico a 8.203 m/z.

- 35 HbAC (Figura 5)

La muestra sanguínea de un paciente que porta rasgo de HbC mostró picos de una  $\alpha$ -globina normal sola y formando aducto con SA. La elevación de la línea base de las globinas  $\delta$  y G $\gamma$  a 7.965 y 7.996 m/z era evidente, pero la  $\beta$ -globina a 7.934 m/z no se resolvió a partir de C $\beta$  aproximadamente 7.933 m/z.

- 40 HbAE (Figura 6)

Las muestras sanguíneas de un paciente que porta rasgo de HbE mostró picos de una  $\alpha$ -globina normal sola y formando aducto con SA. La elevación de la línea base de las globinas  $\delta$  y G $\gamma$  a 7.965 y 7.996 m/z era evidente, pero la  $\beta$ -globina a 7.934 m/z no se resolvió a partir de  $\beta^E$  también aproximadamente 7.933 m/z.

45

HbAF (Figura 7)

- 50 La muestra sanguínea de hemoglobina fetal persistente hereditaria, HbAF, mostró picos de una  $\alpha$ -globina normal sola y formando aducto con SA. La intensidad de  $\beta$ -globina a 7.934 m/z se redujo notablemente y A $\gamma$  a 8.005 m/z se elevó notablemente. También se vio la elevación de la línea base de las globinas  $\delta$  y G $\gamma$  a 7.965 y 7.996 m/z.

#### Enfermedad de HbH ( $\alpha$ -/--) $\alpha$ -talasemia (Figura 8)

La muestra sanguínea de HbH reveló picos de una  $\alpha$ -globina normal sola y formando un aducto con SA a 7.564 y 7.667 m/z. La  $\beta$ -globina era evidente a 7.934 m/z y la elevación de la línea base de las globinas G $\gamma$  y A $\gamma$  a 7.996 y 8.017 m/z era evidente.

#### Mutaciones de $\alpha$ - y $\beta$ -globina expresadas (Figura 9 y 10)

HbAG es causada por la mutación en la  $\alpha$ -globina en  $\alpha$ 68Asn-Lys. Se vio una  $\alpha$ -globina a 7.564 m/z, la  $\alpha$  formando aducto con SA a 7.667 m/z pero se vieron picos adicionales a 7.612 (desconocidos) y 7.645 m/z ( $\alpha$ -globina glicada). La  $\beta$  globina a 7.933 m/z estaba acompañada de una elevación de G $\gamma$  a 7.993 m/z. El fenotipo HbA/Kenya es una fusión de G $\gamma$  y  $\beta$  mostrada igualmente. Se vio una  $\alpha$ -globina a 7.564 m/z,  $\alpha$  formando aducto con SA a 7.667 m/z pero picos adicionales a 7.961 m/z, que coinciden con el pico para  $\delta$  a 7.963 m/z, probablemente representan la fusión de globina  $\beta$ . La globina  $\beta$  a 7.933 m/z estaba acompañada de una elevación de G $\gamma$  a 7.993 m/z.

#### Comparación de muestras fenotípicamente normales y anormales (Figura 11)

Se examinaron 9 muestras de sangre fenotípicamente normal y 9 muestras de sangre fenotípicamente anormal adicionales (una enfermedad de células falciformes HBS homocigota, una enfermedad de células falciformes HBSC heterocigota, 2 rasgos de alfa talasemia fenotípicas, una beta-talasemia y un rasgo de beta-talasemia y enfermedad HbE).

Una característica de todas las hemoglobinopatías y los portadores es proporciones elevadas de  $\delta$ -globina,  $\gamma$ -(G y A) globinas y marcador 8.088 m/z (posiblemente  $\epsilon$ -globina), en comparación con individuos no afectados. Además la relación de  $\beta$ -globina y  $\alpha$ -globina es menor en afectados y portadores en comparación con las muestras de sangre fenotípicamente normal para individuos no afectados. Esto probablemente refleja el cambio en transcripciones que surge del grupo de gen de beta-globina para expresar además globinas  $\delta$  y fetales como se demuestra.

El homocigoto  $^S\beta^S\beta$  clásico es detectable por un cambio de masa en el pico de beta-globina predominante a 7.921 m/z, mientras la enfermedad de células falciformes  $^S\beta^C\beta$  muestra un pico de 7.921 m/z inferior significativo pero el pico dominante a 7.936 m/z de globina  $\beta$ ( $^C\beta$ ) similar a un portador de células falciformes. Sin embargo la enfermedad de células falciformes  $^S\beta^S\beta$  tiene  $\delta$  y  $\gamma$ -globinas elevadas y masas marcadoras (es decir, 8.088 m/z posiblemente  $\epsilon$ -globina).

Las muestras de tanto beta-talasemia fenotípica como rasgo de beta-talasemia se caracterizaron por picos aberrantes elevados a 8.088 m/z (posible  $\epsilon$ -globina),  $\delta$ -globinas elevadas moderadas y relación de  $\beta/\alpha$  globina reducida. Este patrón era similar para la enfermedad HbE pero se vio una elevación más marcada de  $\delta$ -globina.

Ambas muestras fenotípicas del rasgo de alfa-talasemia demostró picos aberrantes elevados a 8.088 m/z (posible  $\epsilon$ -globina), globinas  $\delta$  y  $\gamma$  elevadas.

#### Ejemplo 2 - Ejemplos fijados con formalina

##### Procedimiento

##### Procesamiento de muestra

Se mezcla muestra de sangre completa 1 parte por cinco partes con solución salina formal tamponada con citrato durante un mínimo de seis horas. A continuación, esto se diluye entre 1/166 y 1/333 en o bien ddH<sub>2</sub>O o 0,1 % de TFA en ddH<sub>2</sub>O. Esta etapa dilucional purifica eficazmente la Hb de otros componentes de sangre para el análisis espectral de masas ya que la Hb es la proteína más abundante.

Las diluciones mayores de 1/8.000 dan como resultado señal espectral de masas progresivamente más débil.

##### 55 **Análisis espectral de masas MALDI ToF**

Las matrices óptimas son ácido sinapínico (SA), ácido ferúlico (FA) y ácido alfa 4-ciano hidroxicinámico (CHCA). El ácido sinapínico, que es la matriz preferida, se mezcla o se usa como capa de revestimiento previo a una gota mezclada de muestra diluida 1/1.000 a 1/8.000 (óptima 1/2.000). Las placas de MALDI de acero (384 pocillos) se prepararon pipeteando 0,5  $\mu$ l de solución de matriz (ácido sinapínico - 20 mg/ml disuelto en 50/50 v/v de acetonitrilo (ACN)/ddH<sub>2</sub>O y 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA)) y se dejó secar. Se mezcló 0,5  $\mu$ l de muestra con SA y se aplicó sobre la matriz seca. Esto se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora antes del análisis por MALDI TOF MS.

El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo usando un espectrómetro de masas MALDI de Shimadzu Axima plus: el láser de nitrógeno de pulso ( $\lambda_{max}$ =337 nm) se disparó a 80 a 100 % de unidades arbitrarias de

energía. Los iones se aceleraron por un tubo lineal de 1,2 m de campo eléctrico de 20 kV hacia abajo y se detectó por un detector de placa de micro-canal a una tasa de muestreo de 500 MHz. Los espectros se generaron sumando 20-30 disparos de láser. Un modo lineal positivo con extracción retrasada se usó para adquirir los espectros.

- 5 Se recogió y se analizó una región espectral de masas de entre 30.000 y 70.000 m/z. Estos se caracterizan tanto con respecto a la asignación de masa centroide como la intensidad de pico relativo o bien como altura de pico normalizada comparativa o área de pico normalizada en el intervalo espectral examinado.

### 10 **Patrones espectrales de muestra**

- 10 Como descubrimiento general, se encontraron picos correspondientes a globinas monoméricas separadas, dímeros, trímeros y tetrámeros y complejos tales como pentámeros. Los picos individuales o la distribución de masa de los picos anchos que corresponden a dímeros composicionales, trímeros, tetrámeros y complejo mayor corresponden a las representaciones de masa relativa de los diversos emparejamientos de globina, es decir, para dímeros,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\alpha\delta$ ,  $\alpha A\gamma$ ,  $\alpha G\gamma$ , etc. Igualmente la distribución de masa compleja grande dentro de los picos anchos representa la composición relativa de combinaciones de complejo trimérico, tetramérico, pentamérico y otros de las globinas individuales.

- 20 HbA fijada con formalina y muestras de sangre completa (Figura 12)

- 20 Una muestra de HbA adulta purificada normal revela picos para la  $\alpha$ -globina y la  $\beta$ -globina con otras globinas encontradas en HbA2 y HbF ( $\delta$ ,  $G\gamma$  y  $A\gamma$ ) no detectadas. Se detectó emparejamiento oligomérico específico de globinas dímeros máximo central de 31.396 m/z correspondiente a  $\alpha$ - $\beta$  globina; trímeros máximo central de 47.308 m/z correspondiente a  $\alpha\alpha\beta$  y  $\alpha\beta\beta$ ; tetrámeros máximo central de 62.858 m/z correspondiente a  $\alpha\beta\beta\beta$ ; y un complejo de pentámeros que incluye un máximo de masa acéntrica a 77.732 m/z correspondiente a  $\alpha\alpha\alpha\alpha$ .

- 25 Sangre completa, fijada con formalina y, a continuación, lisada reveló igualmente las globinas monoméricas (15.000 a 17.000 m/z), los dímeros de Hb (31.000-33.000 m/z), los trímeros de Hb (45.000-45.800 m/z), los tetrámeros de Hb (61.000-64.000 m/z) y los tetrámeros más cuatro unidades prostéticas de hemo (66.000-68.000 m/z).

- 30 Comparación de muestras fenotípicamente normales y anormales (Figura 13 y 14)

- 35 Se examinaron 9 muestras de sangre fenotípicamente normal y 9 muestras de sangre fenotípicamente anormal adicionales (una enfermedad de células falciformes HBS homocigota, una enfermedad de células falciformes HBSC heterocigota, 2 rasgos de alfa-talasemia fenotípicos, una beta-talasemia y un rasgo de beta-talasemia y enfermedad HbE).

- 40 Una característica de todas las hemoglobinopatías es un perfil alterado en las relaciones de la intensidad relativa de globinas diméricas fijadas con formalina y tetrámero/oligómeros (Figura 13). Esto es la enfermedad de células falciformes más drástica (véase la Figura 14) pero también se ven en beta- y alfa-talasemia incluyendo el rasgo que tiene doble la relación de tetrámero/oligómeros en comparación con los no afectado.

### Discusión

- 45 El principal problema que enfrenta los laboratorios clínicos en la identificación de hemoglobinopatías es que los resultados son con frecuencia presuntos en lugar de definitivos así hay una necesidad de o bien confirmar o diferenciar los resultados positivos de un ensayo con otro ensayo. Para cribar completamente una población o confirmar un diagnóstico específico se usa una conglomeración de varios procedimientos para las pruebas de degeneración falciforme, examen microscópico de frotis sanguíneo, electroforesis de Hb, electroforesis de capilares y cromatografía líquida de alta resolución. Esto es todo muy costoso en el volumen de muestra, el tiempo requerido y los recursos. Hay una necesidad de ensayos que sean más rápidos y más rentables específicamente si se introduce un reglamento de investigación nacional.

### Conclusión

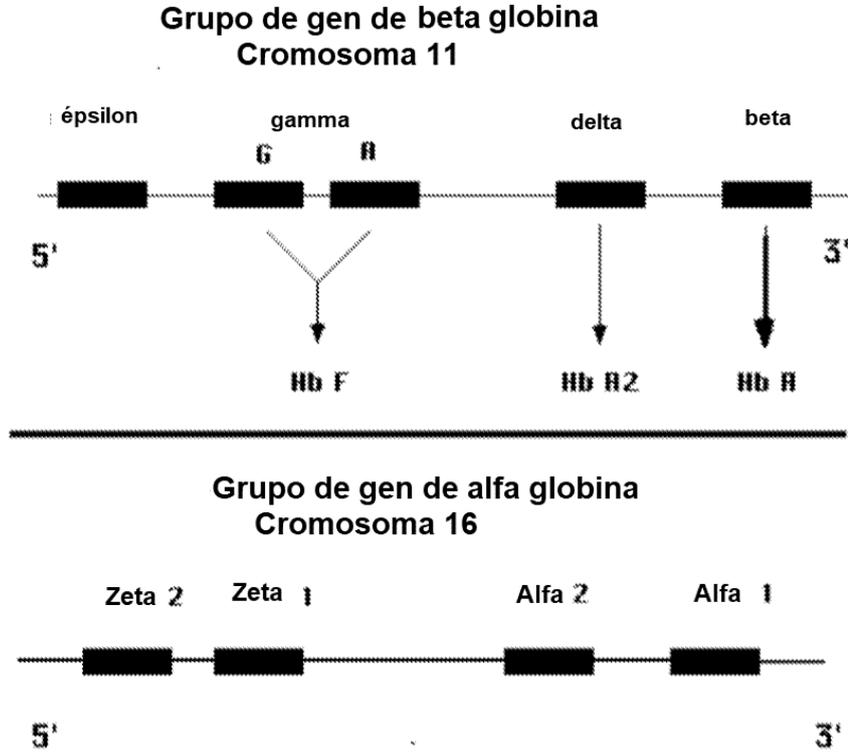
- 55 El pinchazo y las manchas de transferencia se pueden investigar rápidamente para la célula falciforme y otras hemoglobinopatías potenciales por espectrometría de masas MALDI-ToF. Las muestras se lisan y se diluyen 1/1.000 o más en agua. Los iones doblemente cargados de las globinas constituyentes son suficientemente y reproduciblemente resueltos por MALDI-ToF MS para revelar m/z característica de S $\beta$ . Además, otras hemoglobinopatías se caracterizan mediante la detección de señal de m/z elevada de globinas fetales. Estas globinas fetales se pueden expresar, bajo condiciones de estrés, en un intento de compensar la expresión del gen de  $\alpha$  y  $\beta$  globina defectuosa y actuar como un biomarcador de hemoglobinopatía. Sin embargo, se fija por formalina u otro agente de entrecruzamiento adecuado y, a continuación, se lisa el emparejamiento tetramérico, dimérico constituyente y cualquier otro agrupamiento oligomérico de las globinas (ilustrados están los trímeros y los pentámeros) se revelan y pueden indicar emparejamiento oligomérico de globina  $\alpha$  o  $\beta$  en exceso e inusual

característico de  $\alpha$  y  $\beta$  Talasemias.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento de detección de una hemoglobinopatía que comprende someter una muestra sanguínea obtenida de un sujeto a espectrometría de masas de espectrometría de desorción/ionización por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-ToF MS), en el que el espectro se examina para los iones doblemente cargados de proteínas globina en el intervalo de 5.000-8.200 m/z.
- 10 2. Un procedimiento de la reivindicación 1 en el que la muestra sanguínea se mezcla con un agente de lisis antes del análisis por espectrometría de masas, preferentemente en el que el agente de lisis comprende formalina.
3. Un procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que la muestra se diluye antes del análisis por espectrometría de masas.
- 15 4. Un procedimiento de cualquier reivindicación precedente en el que la hemoglobinopatía se selecciona de anemia de células falciformes,  $\alpha$ -talasemia,  $\beta$ -talasemia, HbAG, HbA/Enfield, HbH, HbAF, HbS, HbC, HbE, HbD-Punjab, HbO-Arab, HbG-Philadelphia, Hb Constant Spring, Hb Hasharon, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, HbM, y Hb Kansas.
- 20 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el espectro obtenido de la espectrometría de masas se normaliza.
- 25 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende comparar los patrones resultantes de dicha espectrometría de masas de dicha muestra con los patrones espectrales de masas obtenidos de la espectrometría de masas de una muestra sanguínea de un control sano normal para determinar si dichos patrones de dicha muestra son indicativos de una hemoglobinopatía.
- 30 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el espectro obtenido de la espectrometría de masas de la muestra se compara con un modelo espectral de referencia de masa esperada entre 5.000-8.200 m/z determinada a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de controles sanos normales.
- 35 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el espectro obtenido de la espectrometría de masas de la muestra se compara con un modelo de enfermedad, de masa esperada entre 5.000-8.200 m/z determinada a partir del análisis estadístico de una colección de muestras sanguíneas de sujetos con una hemoglobinopatía.

Figura 1 Representación esquemática de los principales genes  $\beta$  y  $\alpha$  funcionales de la hemoglobina humana.



Hemoglobinas embrionarias	Hemoglobina fetal	Hemoglobinas adultas
Gower I - zeta2epsilon2 Gower II - alfa2epsilon2 Portland - zeta2gamma2	Hemoglobina F - alfa2gamma2	Hemoglobina A - alfa2beta2 Hemoglobina A2 - alfa2delta2

Figura 2. Espectro de sangre completa HbA normal

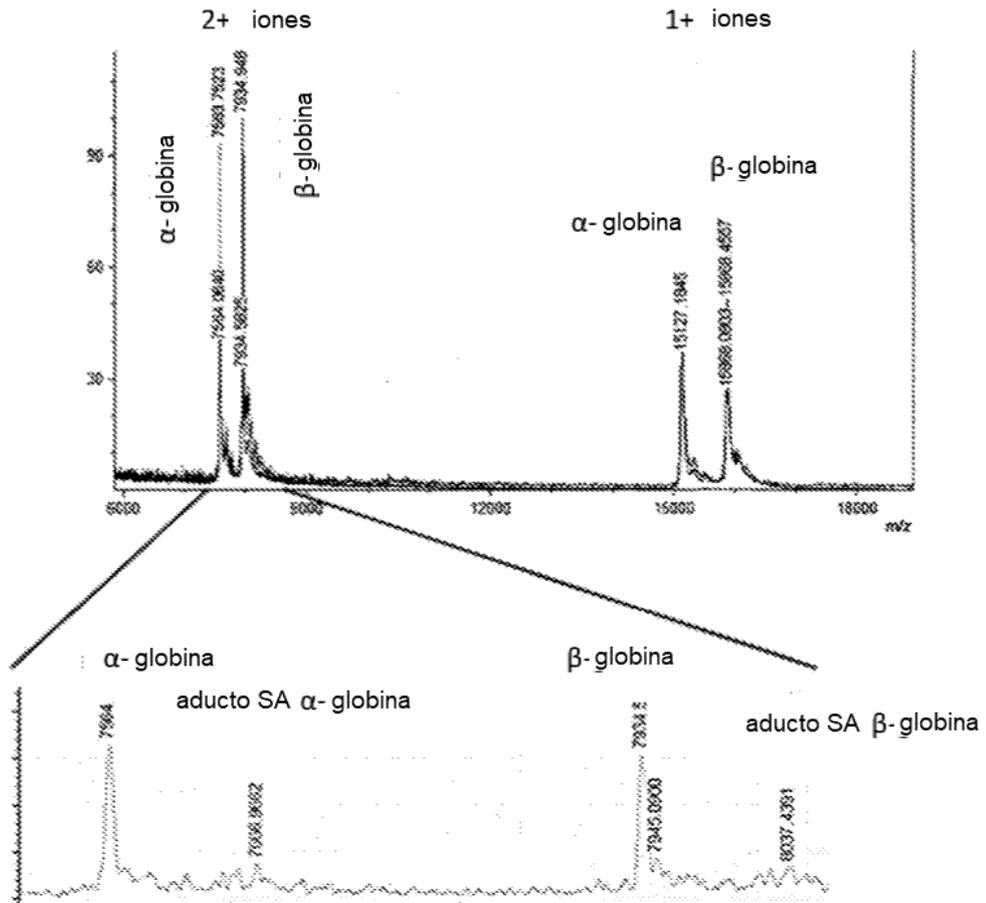


Figura 3. Espectro de HbAS

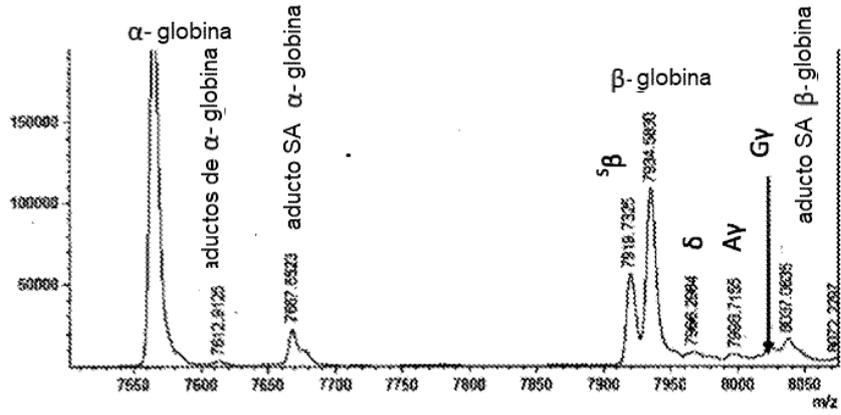


Figura 4. Espectro de HbSC

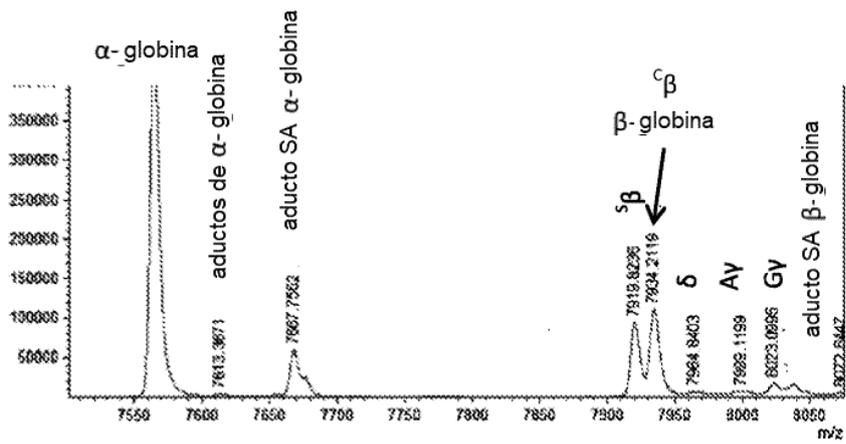


Figura 5. Espectro de HbAC

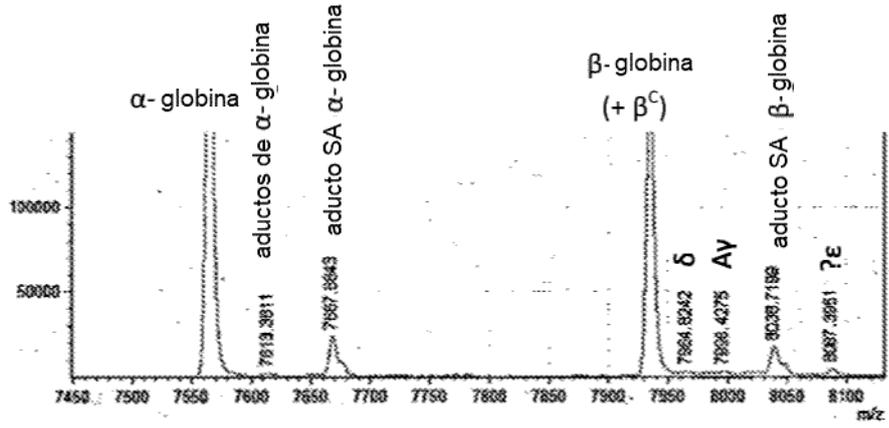


Figura 6. Espectro de HbAE

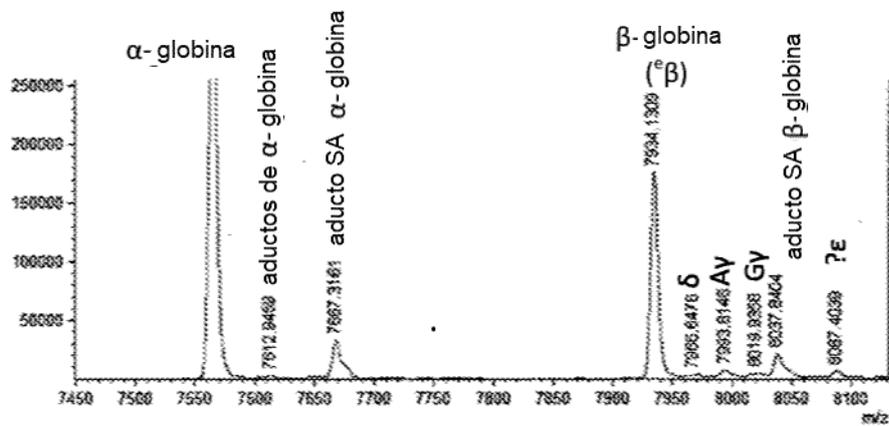


Figura 7. Espectro de HbF

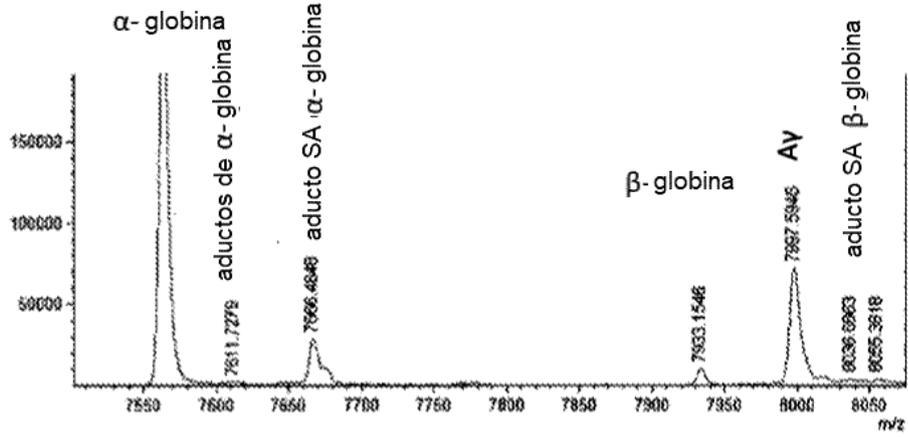


Figura 8. Espectro de HbAH

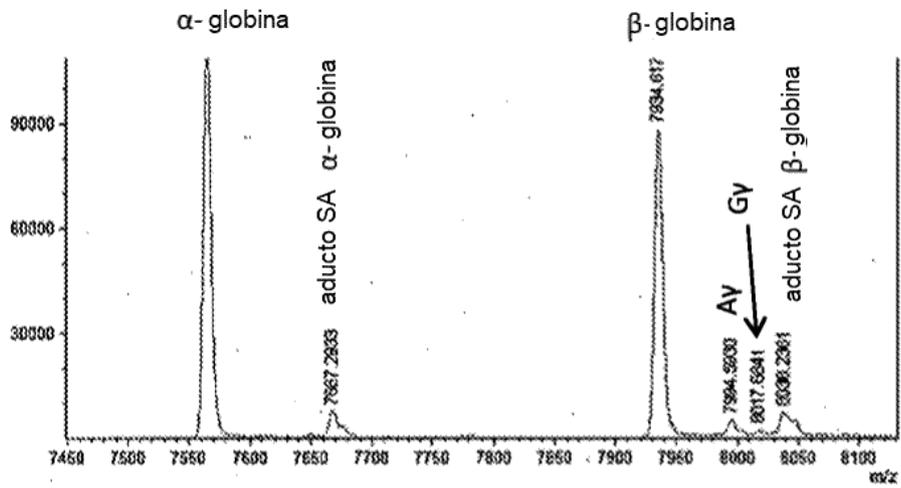


Figura 9. Espectro de HbAG

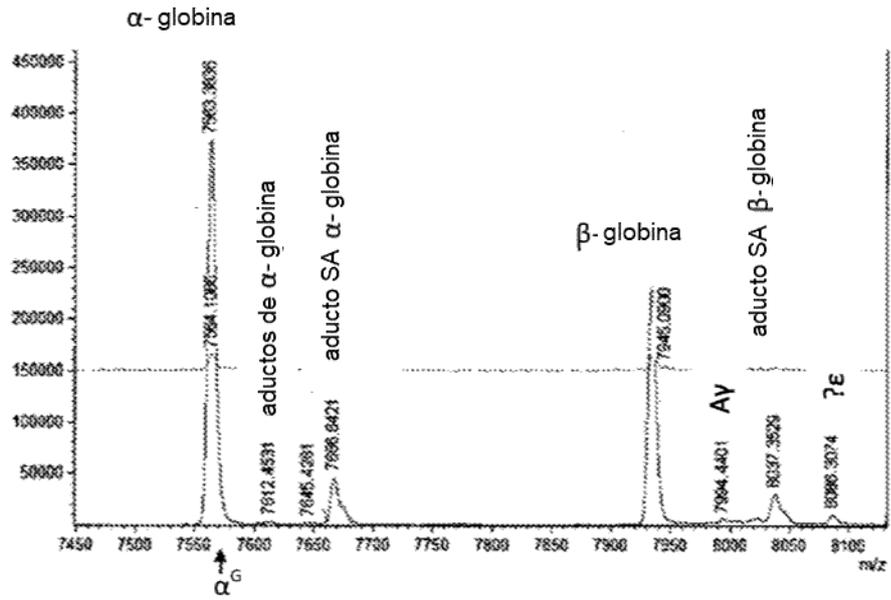


Figura 10. Espectro de fenotipo HbA/Kenya

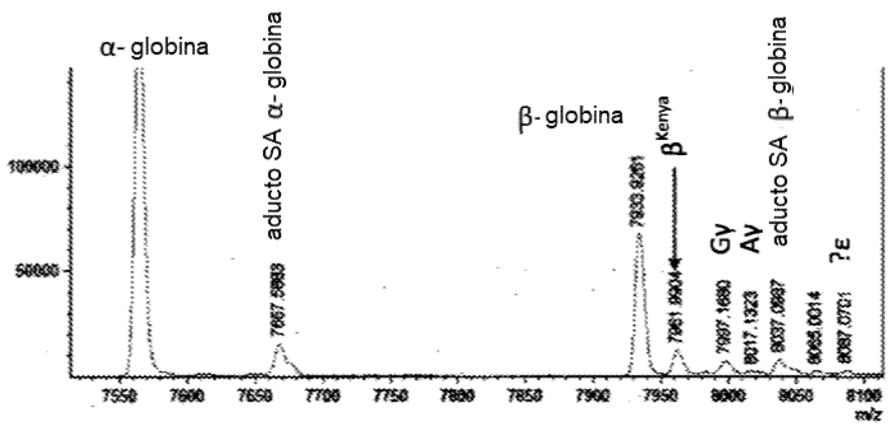


Figura 11. Tabla compendio del análisis de pico espectral 7.500 a 8.200 m/z y porcentaje de abundancia relativo

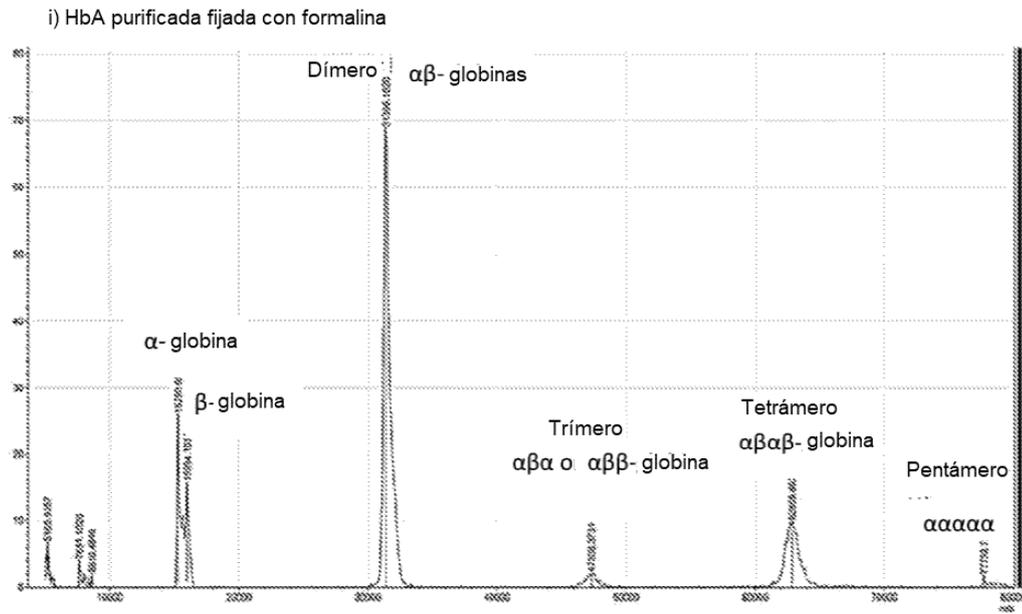
A) - Muestras de sangre fenotípicamente normal

Pico asignado	m/z	Cntrl-1	Cntrl-2	Cntrl-3	Cntrl-4	Cntrl-5	Cntrl-6	Cntrl-7	Cntrl-9	Cntrl-9	Promedio	SD
Relativo a $\alpha$ -globina												
$\alpha$ -globina	7564	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Acetilo/Carb $\alpha$ -globina	7594	0	0	0	1,8	1,9	5,8	5	3,9	4	2,49	2,26
$\alpha$ Glc-globina	7645	1,78	1,6	1,4	3	2	1	2,8	1,96	0,5	1,78	0,79
aducto SA $\alpha$ -globina	7671	10,9	11,2	12,6	11,6	10,6	10,7	10	11,7	15	11,59	1,48
$\beta$ -globina	7936	70,9	53,8	85,9	91,3	69,9	90,2	84	81,2	76,4	78,18	11,93
Relativo a $\beta/\beta$ -globina												
$^5\beta$ -globina	7921	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
$\beta$ -globina	7936	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
$\delta$ -globina	7965	3	0	0	5,2	2,7	6,2	9,2	5	6	4,14	3,02
$^6\gamma$ -globina	7999	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0,22	0,44
$^A\gamma$ -globina	8005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	0,00
$\beta$ Glc-globina	8017	2,56	3,4	2	4,4	2,7	2,1	3,4	5,2	2,56	3,15	1,07
aducto SA $\beta$ -globina	8039	10,25	12	16,3	14	11,2	11,1	13	15	18,6	13,49	2,75
? $\epsilon$ -globina	8088	2,56	3,4	0	0	1,8	0	0	0	0	0,58	1,21

**B) - Muestras de sangre fenotípicamente anormales**

Pico asignado	m/z	SCD		Rasgo de Beta-talasemia	Beta-talasemia	Enfermedad HbE	Rasgo Alfa-talasemia	Rasgo Alfa-talasemia	Promedio	SD
		HbS	HbSC							
Relativo a $\alpha$ -globina										
$\alpha$ -globina	7564	100	100	100	100	100	100	100	100	
Acetilo/carb- $\alpha$ -globina	7594	2,12	1,8	2,7	0	5	5,9	5	3,2	2,14
$\alpha$ G1c -globina	7645	1	1,8	2,2	1,98	2,5	2,4	2,7	2,1	0,57
aducto SA $\alpha$ -globina	7671	11	12	11,9	12,2	10,6	12,8	12,1	11,8	0,75
$\beta$ -globina		60	43,9	66,6	63,1	47,75	66,3	59	58,1	8,92
Relativo a $\beta/\beta$ -globina										
$^{\delta}$ $\beta$ -globina	7921	100	13,4	0	0	0	0	0	0	
$\beta$ -globina	7936	0	100	100	100	100	100	100	100	
$\delta$ -globina	7965	7,1	6,3	6,18	5,6	13,3	9	8,3	8,0	2,64
$^{\epsilon}$ $\gamma$ -globina	7999	0	7,7	0	0	0	0	4,5	1,7	3,12
$^{\Lambda}$ $\gamma$ -globina	8005	21,4	0	0	0	0	0	0	3,1	8,09
$\beta$ G1c-globina	8017	0	9,1	6	4,7	5,88	3,96	6,25	5,1	2,78
aducto SA $\beta$ -globina	8039	14,2	14,7	12,9	12,5	13,3	10,9	16,7	13,6	1,84
? $\epsilon$ -globina	8088	7,14	7	5,6	16,3	5,8	7,5	11,6	8,7	3,89

Figura 12. Sangre fijada con formalina



ii) Sangre completa fijada con formalina y a continuación lisada

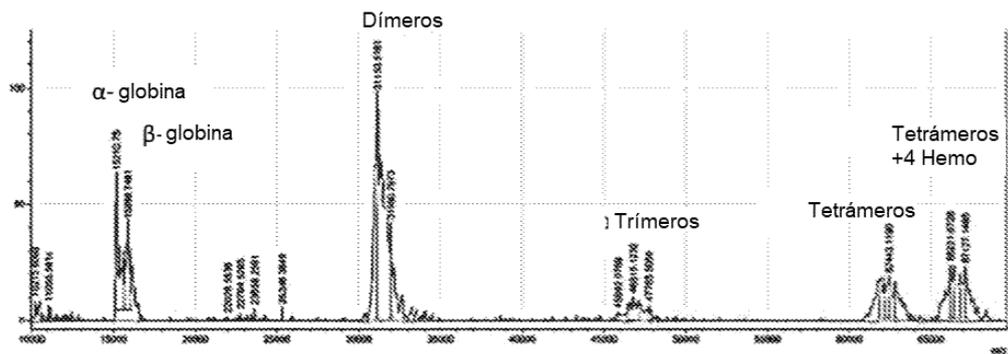


Figura 13. Espectro de sangre completa fijada con formalina y lisada Enfermedad de células falciformes

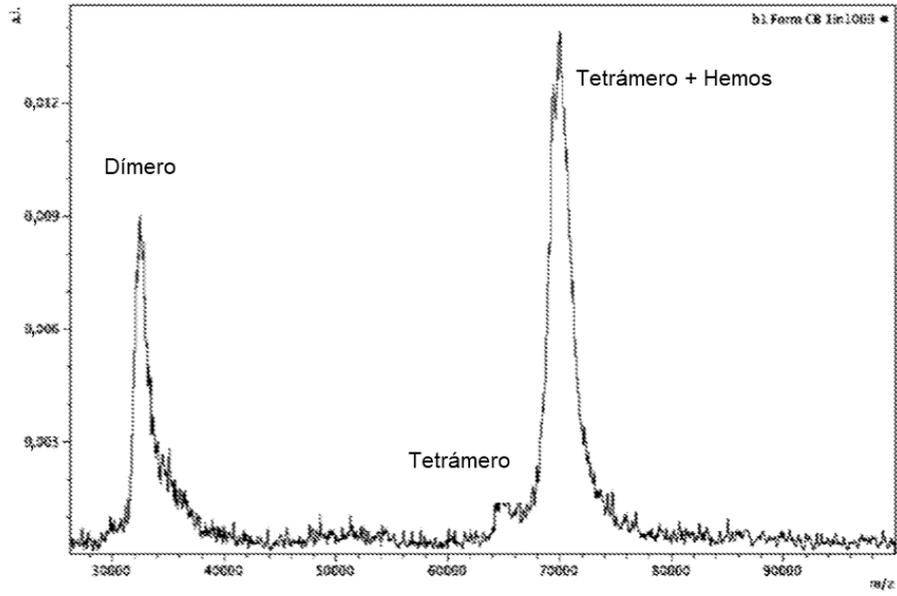


Figura 14 - Tabla compendio de análisis de pico espectral 30.000 a 10.000 m/z de sangre fijada con formalina (❖) y porcentaje de abundancia relativo -

**A) Muestras de sangre fenotípicamente normal**

Pico asignado	m/z	Cntrl-1	Cntrl-2	Cntrl-3	Cntrl-4	Cntrl-5	Cntrl-6	Cntrl-7	Cntrl-9	Cntrl-9	Promedio	SD
Relativo a ❖ dímero												
❖ Dímero	32480	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
❖ Trímero	49000	9,6	5,6	1	1	6,5	5	7	5,6	7,5	<b>5,42</b>	<b>2,85</b>
❖ s-tetrámero	64670	0,3	2,8	12	8,2	4,3	2	6	2,8	5	<b>4,82</b>	<b>3,56</b>
❖ L-tetrámero	69550	0,6	7	6	4	1,3	1	0	1,3	1	<b>2,47</b>	<b>2,55</b>

**B) - Muestras de sangre fenotípicamente anormales**

Pico asignado	m/z	SCD	HbS	SCD	HbSC	Rasgo Beta-talasemia	Beta-talasemia	Enfermedad HbE	Rasgo Alfa-talasemia	Rasgo Alfa-talasemia	Promedio	SD
Relativo a ❖ dímero												
❖ Dímero	32480	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
❖ Trímero	49000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<b>1,0</b>	<b>2,85</b>
❖ s-tetrámero	64670	13,3	16,8	20	23,3	10	18,5	15	16,7	15	<b>16,7</b>	<b>3,56</b>
❖ L-tetrámero	69550	155,5	44,73	40	4,1	14,4	4,1	17,8	40,1	17,8	<b>40,1</b>	<b>2,55</b>