



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0811536-2 B1



(22) Data do Depósito: 05/05/2008

(45) Data de Concessão: 11/08/2020

(54) Título: MÉTODO PARA DETECTAR UMA CETONA BIOLOGICAMENTE ATIVA E MÉTODO PARA EXTRAÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 31/185; A61K 31/41.

(30) Prioridade Unionista: 04/05/2007 US 11/744,789.

(73) Titular(es): PERKINELMER HEALTH SCIENCES, INC.; AZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA MEYER DI FIRENZE.

(72) Inventor(es): BLAS CERDA; ALEX CHERKASSKIY; YIJUN LI; GIANCARLO LA MARCA.

(86) Pedido PCT: PCT US2008062694 de 05/05/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/137868 de 13/11/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/11/2009

(57) Resumo: DETECÇÃO DE SUCCINILACETONA. A presente invenção refere-se, entre outras coisas, à detecção e/ou medição de succinilacetona e um ou mais analisados biológicos adicionais usando espectrometria de massa.

"MÉTODO PARA DETECTAR UMA CETONA BIOLOGICAMENTE ATIVA E MÉTODO PARA EXTRAÇÃO".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para o Pedido U.S. Número de
5 Série 11/744.789, depositado em 4 de maio de 2007, os conteúdos dos
quais são incorporados aqui através de referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES

Espectrometria de massa é útil para detecção e medição de uma
ampla variedade de metabólitos, a presença ou quantidade dos quais pode
10 ser indicativa de certas condições ou distúrbios. Desta forma, espectrometria
de massa pode ser usada, por exemplo, para diagnosticar numerosos dis-
túrbios metabólicos associados com alterados níveis de metabólitos. Tal
distúrbio metabólico é tirosinemia hereditária, Tipo I (HT1), que é causado
por uma deficiência de fumarilacetoacetato hidrolase (FAH) e está associado
15 com níveis aumentados de tirosina e succinilacetona. HT1 é um distúrbio da
infância que causa insuficiência hepática, crises neurológicas dolorosas, ra-
quitismos, e hepatocarcinoma. Se não tratado, a morte tipicamente ocorre
em menos de 2 anos de idade, com algumas formas crônicas permitindo
sobrevivência até 12 anos de idade. É atualmente possível tratar HT1 com
20 NTBC (ou Nitisinone), se tratamento é iniciado no princípio da vida. Desta
forma, há um maior incentivo para identificar pacientes afetados por HT1
através de análise do recém-nascido ou até análise pré-natal.

SUMÁRIO

Succinilacetona é o marcador primário para a detecção precoce
25 de HT1. No entanto, succinilacetona é uma cetona muito reativa que forma
conjugados com proteínas. Os métodos descritos aqui podem ser usados
para extrair succinilacetona de uma amostra sob condições que permitem
concomitantemente extração de outros metabólitos, tais como aminoácidos,
carnitina livre, ou acilcarnitinas. Por exemplo, condições de extração severas
30 (tais como acidez extrema e alta temperatura) podem ser evitadas.

Os métodos descritos aqui podem ser usados para detectar e/ou
medir succinilacetona e um ou mais analitos biológicos adicionais usando

espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa tandem). Tais métodos são úteis em diagnose e para geração de perfis metabólicos para a detecção/diagnose de distúrbios metabólicos tais como amino acidopatias (por exemplo, tirosinemia tipo I).

5 Em um aspecto, a descrição fornece um método para extração. O método inclui as etapas de: contato de uma amostra com uma solução de extração, a solução de extração compreendendo um monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada e uma base forte, em que o contato da amostra com uma solução de extração produz um extrato compreendendo: (i) succinilacetona derivada, (ii) um ou mais aminoácidos, (iii) carnitina livre, (iv) uma
10 ou mais acilcarnitinas, ou (iv) formas derivadas de qualquer de (ii), (iii), ou (iv) da amostra, e em que a concentração de uma succinilacetona derivada no extrato reflete a concentração de succinilacetona na amostra, e em que as concentrações de um ou mais aminoácidos, carnitina livre, uma ou mais
15 acilcarnitinas, ou formas derivadas dos mesmos no extrato reflete suas respectivas concentrações na amostra. O método pode também incluir a etapa de pós-contato da amostra com a solução de extração, analisando a amostra usando espectrometria de massa tandem. O contato pode derivar pelo menos uma molécula de succinilacetona a ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propionico (MPP). O monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada pode
20 ser metanol, etanol, propanol, ou isopropanol. Uma base forte pode ser hidrazina, uma hidrazina modificada (por exemplo, acil-hidrazinas, aril-hidrazinas, alquil-hidrazinas, reagentes de Girard-P e Girard-T), ou hidroxilamina.

25 Em algumas modalidades, uma amostra pode ser uma amostra biológica tal como uma mancha de sangue seca. A amostra pode ser aquela obtida de um ser humano recém-nascido. A amostra pode ser aquela obtida de um indivíduo suspeito de, ou um risco de desenvolvimento, um distúrbio metabólico tal como tirosinemia tipo I.

30 Em algumas modalidades, uma solução de extração pode conter água, um ácido orgânico, e/ou um ou mais padrões internos. Por exemplo, uma solução de extração pode conter entre cerca de 5% a cerca de 30% de

água ou entre cerca de 20% a cerca de 25% de água. O ácido orgânico pode ser ácido oxálico, por exemplo, em uma concentração de cerca de 5 mM. Os padrões internos podem incluir pelo menos um isótopo de átomo pesado tal como ^2H , ^{15}N , ou ^{13}C . Um ou mais dos padrões internos podem ser, ou
5 conter, succinilacetona, um aminoácido, carnitina livre, uma acilcarnitina, ou forma derivada de quaisquer dos acima mencionados.

Em algumas modalidades, o método pode incluir as etapas de pós-contato de uma amostra com uma solução de extração, evaporando uma amostra resultando em uma primeira amostra evaporada. O método
10 pode além disso incluir as etapas de pós-evaporação de uma amostra, contactando uma primeira amostra evaporada com uma solução de álcool alquílico compreendendo um álcool alquílico e um ácido. O método pode também incluir as etapas de: pós-contato de uma amostra com uma solução de álcool alquílico, evaporando uma solução resultando em uma segunda amostra
15 evaporada e/ou reconstituição de uma segunda amostra evaporada. Reconstituição de uma segunda amostra evaporada pode incluir contato de uma segunda amostra evaporada com um solvente. O álcool alquílico pode ser metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, t-butanol, ou pentanol. O ácido pode ser ácido clorídrico (HCl). O solvente pode incluir acetonitrila,
20 isopropanol, ou uma mistura de água com isopropanol ou acetonitrila.

Em outro aspecto, a descrição fornece método para extração, cujo método inclui as etapas de: contato de uma amostra com uma solução de extração, uma solução de extração compreendendo um monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada e uma base forte, em que o contato da a-
25 mostra com uma solução de extração produz um extrato compreendendo (i) uma cetona biologicamente ativa derivada, (ii) um ou mais aminoácidos, (iii) carnitina livre, (iv) uma ou mais acilcarnitinas, e/ou (v) formas derivadas de qualquer de (ii), (iii), ou (iv) da amostra, e em que uma concentração de uma cetona biologicamente ativa derivada no extrato reflete uma concentração de
30 uma cetona biologicamente ativa na amostra, e em que as concentrações de um ou mais aminoácidos, carnitina livre, uma ou mais acilcarnitinas, ou formas derivadas dos mesmos no extrato reflete suas respectivas concentra-

ções na amostra. O monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada pode ser metanol, etanol, propanol, ou isopropanol. Uma cetona biologicamente ativa pode ser, por exemplo, succinilacetona ou um esteroide. Esteroides incluem, mas não são limitados a, de-hidroepiandrosterona (DHEA) de testosterona, sulfato de de-hidroepiandrosterona, adrostenediona, 17-hidroxi-progesterona (17-OHP), pregnenolona de 17-hidróxi, cortisol, 11-desoxicortisol, corticosterona, aldosterona, estradiol, corticosterona de 18-OH, pregnenolona, progesterona, cortisona, terta-hidrocortisol, 11-desoxicorticosterona, creatinina, 17-Cetoesteroides, colesterol, vitamina B, ou vitamina A. A base forte pode ser quaisquer das bases fortes descritas aqui. A solução de extração pode também incluir água.

Em outro aspecto, a descrição apresenta um método para detecção de succinilacetona. O método inclui as etapas de: contato de uma amostra com uma solução de extração compreendendo um monoálcool de C1-3 linear ou ramificado e uma base forte; derivação de succinilacetona na amostra; e avaliação da succinilacetona derivada na amostra derivada usando espectrometria de massa tandem. A forma derivada de succinilacetona pode ser succinilacetona para ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propriônico (MPP). A base forte pode ser qualquer descrita aqui.

Em outro aspecto, a descrição fornece um método para detecção de succinilacetona, cujo método inclui as etapas de contato de uma amostra com uma solução de extração compreendendo um monoálcool de C1-3 linear ou ramificado e hidrazina; derivação de succinilacetona para ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propriônico (MPP) na amostra; e avaliação de MPP na amostra derivada usando espectrometria de massa tandem. O método pode também incluir avaliação da amostra por um ou mais analitos adicionais (por exemplo, quaisquer dos analitos adicionais descritos aqui) com MPP na mesma injeção da amostra. O monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada pode ser metanol, etanol, propanol, ou isopropanol.

Em outro aspecto, a descrição fornece um método para detecção de succinilacetona. O método pode incluir as etapas de: contato de uma amostra com uma solução de extração contendo um solvente orgânico sob

condições que não fixam substancialmente proteínas; derivação de succinilacetona para ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propriônico (MPP) na amostra; e avaliação de MPP e um analito adicional (ou derivado do mesmo) na amostra derivada usando espectrometria de massa tandem. A solução de extração pode conter cerca de 5% de água. A solução de extração pode conter cerca de 85% de um monoálcool de C₁₋₃ linear ou ramificado tal como metanol, etanol, propanol, ou isopropanol. Succinilacetona pode ser derivada com hidrazina ou hidrazina derivada.

Em algumas modalidades, o método pode incluir as etapas de determinação se um indivíduo, de quem a amostra foi derivada, tem, ou está em risco de desenvolver, tirosinemia hereditária tipo I, com base na detecção de succinilacetona na amostra. Depois determinação que um indivíduo tem, ou está em risco de desenvolver, tirosinemia hereditária tipo I, o método pode incluir administração ao indivíduo de um inibidor de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase.

Em ainda outro aspecto, a descrição apresenta um método para detecção de uma cetona biologicamente ativa. O método pode incluir as etapas de: contato de uma amostra com uma solução de extração compreendendo um C₁₋₃ monoálcool linear ou ramificado e uma base forte; derivação de uma cetona biologicamente ativa na amostra; e avaliação de uma cetona biologicamente ativa derivada na amostra derivada usando espectrometria de massa tandem. A cetona biologicamente ativa pode ser succinilacetona ou um esteroide tal como quaisquer dos esteroides descritos aqui. O monoálcool de cadeia C₁₋₃ linear ou ramificada pode ser metanol, etanol, propanol, ou isopropanol. A solução de extração pode também incluir água.

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos descritos aqui, uma amostra pode ser uma amostra biológica tal como uma amostra de sangue seca (uma mancha de sangue seca). A amostra pode ser de um ser humano recém-nascido. A amostra pode também incluir pelo menos um isótopo de átomo pesado que é incluído na amostra antes da análise espectroscópica de massa.

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos descritos

aqui, a avaliação pode incluir análise de succinilacetona derivada junto com um ou mais analitos adicionais (por exemplo, analitos biológicos tais como um ou mais aminoácidos, carnitina livre, ou acilcarnitinas) de uma injeção de amostra em um espectrômetro de massa tandem. Por exemplo, succinilacetona derivada pode ser analisada junto com um ou mais (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, 10, 11, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 28, ou 30) analitos adicionais da mesma injeção de amostra (em um espectrômetro de massa tandem).

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos descritos aqui, a amostra é aquela que não foi previamente extraída.

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos descritos aqui, contato da amostra com a solução de extração resulta na extração de (i) succinilacetona derivada (SA) e (ii) um ou mais aminoácidos, carnitina livre, uma ou mais acilcarnitinas, ou formas derivadas dos mesmos de uma amostra sem alteração das relações destes analitos presentes na amostra. Por exemplo, um extrato obtido de uma amostra contendo SA, tirosina, e carnitina livre em uma relação de aproximadamente 5:1:2 conteria succinilacetona derivada, tirosina (ou tirosina derivada), e carnitina livre (ou carnitina livre derivada) em uma relação de aproximadamente 5:1:2.

Em ainda outro aspecto, a descrição apresenta um *kit* para detecção de succinilacetona. O *kit* pode incluir succinilacetona derivada compreendendo pelo menos um isótopo de átomo pesado; e instruções de como detectar a succinilacetona derivada. O *kit* pode também incluir uma base forte tal como hidrazina. A base forte pode ser fornecida em uma concentração de menos do que cerca de 0,1%. A hidrazina pode ser dicloridrato de hidrazina. O *kit* pode também incluir um ou mais padrões internos, cada padrão interno contendo: (i) um aminoácido, carnitina livre, ou uma acilcarnitina e (i) pelo menos um isótopo de átomo pesado. O *kit* pode também incluir pelo menos uma mancha de sangue seca compreendendo uma quantidade conhecida de uma ou mais de succinilacetona, um aminoácido, carnitina livre, ou uma acilcarnitina. A succinilacetona derivada pode ser ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propriônico (MPP).

Em outro aspecto, a descrição fornece um *kit* para detecção de uma cetona biologicamente ativa. O *kit* pode incluir uma cetona biologicamente ativa derivada de interesse contendo pelo menos um átomo de isótopo pesado e instruções de como detectar a cetona biologicamente ativa derivada.

Muitos espectrômetros de massa possuem acuidades de massa a alta resolução. Por exemplo, no caso de um íon separadamente carregado, esta faixa corresponde a 0,6 m/z . Variações menores (por exemplo, variações na calibração) em um espectrômetro de massa podem resultar em sinais de m/z do íon que não coincidem com aqueles estabelecidos aqui, mas o sinal de m/z correspondente àqueles descritos pode ser facilmente identificado e usado, por exemplo, por contrabalanço por compensação em calibração.

Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporados por meio de referência em sua totalidade.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é um diagrama esquemático representando a trilha de catabolismo de tirosina.

A figura 2 é um diagrama esquemático representando uma reação necessária para extrair e derivar succinilacetona de uma amostra biológica.

A figura 3 é um diagrama esquemático de um método de extração e derivação de succinilacetona antes da injeção e detecção/medição através de espectrometria de massa tandem.

A figura 4 é um diagrama esquemático de um método de extração e derivação de succinilacetona, e extração e esterificação de analitos adicionais antes da injeção e detecção/medição através de espectrometria de massa tandem.

A figura 5 é um espectro de massa tandem (Perda neutra de 46 varreduras) adquirido usando o método descrito na figura 3 de succinilacetona derivada e outros aminoácidos não-derivados. Aminoácidos são designa-

dos por código de três letras, por exemplo, alanina é "ala," e o sinal de relação de massa para carga (m/z) específico para um íon filho de um aminoácido individual é indicado por seta. "IS" refere-se a padrão interno. O eixo do X representa o m/z e o eixo do Y representa a abundância relativa (porcentagem) de cada íon na amostra.

A figura 6 é um espectro de massa tandem (Perda neutra de 102 varreduras) de uma mancha de sangue extraída representando analitos exemplares que podem ser detectados e/ou medidos junto com succinilacetona quando uma amostra é processada de acordo com o método descrito na figura 4.

A figura 7 é uma série de espectros (Perda neutra de 46 varreduras) adquiridos com o método descrito na figura 3. Os espectros representam a medição de níveis de succinilacetona e tirosina em manchas de sangue secas de recém-nascidos sadios e de um recém-nascido confirmado como possuindo tirosinemia tipo I. O eixo do X representa o correspondente m/z e as alturas dos picos representam a abundância relativa dos analitos.

A figura 8 são um par de gráficos de barra e uma tabela representando a medição de níveis de succinilacetona e tirosina em manchas de sangue secas obtidas de um recém-nascido confirmado como possuindo tirosinemia tipo I em 25 horas e 15 dias, quando comparado a um recém-nascido sadio ("true neg"). O eixo do Y do gráfico de barra da figura 8A representa o nível de succinilacetona em μM (esquerda). O eixo do Y do gráfico de barra da figura 8B representa o nível de tirosina em μM (direita).

A figura 9 é um gráfico de linha representando a estabilidade relativa de hidrato de hidrazina e dicloridrato de hidrazina. O eixo do X representa o número de dias e o eixo do Y representa a quantidade (porcentagem) de hidrato de hidrazina (diamantes) ou dicloridrato de hidrazina (quadrados) restantes em cada momento.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Succinilacetona pode ser detectada através de espectrometria de massa por modificação de succinilacetona em uma amostra para uma forma mais estável. São descritos aqui métodos e composições para realiza-

ção de tais modificações e para tratamento concomitante de uma amostra de uma maneira que permita a extração de succinilacetona e outros analitos (por exemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, e carnitina livre) de uma amostra em uma etapa única de modo que as concentrações de succinilacetona e os outros analitos no extrato reflitam suas respectivas concentrações na amostra. Também descritos são métodos para detecção e/ou medição de succinilacetona (succinilacetona derivada) e um ou mais analitos adicionais usando espectrometria de massa. Os métodos descritos aqui podem ser usados, entre outras coisas, para diagnose de um ou mais distúrbios metabólicos em um indivíduo tal como amino acidopatias (por exemplo, Tirosinemia hereditária tipo I) e distúrbios de metabolismo orgânico e de ácido graxo ou para geração de perfis metabólicos para tais diagnoses (veja abaixo).

Métodos para Extração de Succinilacetona e Analitos Adicionais de uma Amostra

A descrição apresenta métodos para extração de succinilacetona junto com um ou mais analitos adicionais (por exemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, e carnitina livre) de uma amostra em uma etapa única de modo que as concentrações de succinilacetona e um ou mais analitos adicionais (por exemplo, aminoácidos, carnitina livre, e acilcarnitinas) no extrato reflita suas respectivas concentrações na amostra. Em seguida à extração, a presença ou quantidade de succinilacetona pode ser determinada junto com um ou mais analitos adicionais (por exemplo, carnitina livre, acilcarnitinas, e aminoácidos) usando espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa tandem). Os métodos podem incluir contato de uma amostra com uma solução de extração contendo um monoálcool de cadeia C₁₋₃ linear ou ramificada (por exemplo, metanol, etanol, propanol, ou isopropanol) e uma base forte tal como hidrazina, uma hidrazina modificada (por exemplo, acil-hidrazinas, aril-hidrazinas, alquil-hidrazinas, reagentes de Girard-P e Girard-T), ou hidroxilamina. A solução de extração pode também conter água. O contato da amostra com a solução de extração resulta em modificação (derivação) de succinilacetona, se presente na amostra e a extração da succinilacetona modificada assim como um ou mais analitos adicionais (por exem-

plo, carnitina livre, acilcarnitinas, e aminoácidos).

A figura 2 representa uma reação exemplar para extração de succinilacetona das amostras de mancha de sangue seca de acordo com os métodos descritos aqui. Succinilacetona é uma dicetona muito reativa e desta forma ela reage rapidamente com as cadeias laterais de certos aminoácidos (por exemplo, aminoácidos livres ou constituintes de peptídeos e proteínas) em fluidos biológicos tais como sangue total. Os conjugados de base de Schiff formados pela reação entre succinilacetona e os resíduos de aminoácido são mais estáveis do que a succinilacetona livre e desta forma a maior parte da, se não toda, succinilacetona presente no sangue está na forma ligada.

Para extrair (liberação) succinilacetona junto com um ou mais analitos adicionais de uma amostra (por exemplo, uma amostra biológica tal como uma mancha de sangue) em uma etapa única, uma amostra pode ser contatada com uma solução de extração contendo um monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada (por exemplo, metanol, etanol, propanol, ou isopropanol) e uma base forte. Uma base forte pode ser hidrazina ou uma hidrazina modificada (por exemplo, acil-hidrazinas, aril-hidrazinas, alquil-hidrazinas, reagentes de Girard-P e Girard-T) assim como hidroxilamina. O monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada pode ser, por exemplo, em uma concentração de cerca de 70% (por exemplo, cerca de 70%, cerca de 71%, cerca de 72%, cerca de 73%, cerca de 74%, cerca de 75%, cerca de 76%, cerca de 77%, cerca de 78%, cerca de 79%, cerca de 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, ou cerca de 95%) em volume na solução. A base forte (por exemplo, hidrazina, hidrazina modificada, ou hidroxilamina) pode estar em uma concentração de cerca de 600 μM (por exemplo, cerca de 200 μM , cerca de 300 μM , cerca de 400 μM , cerca de 500 μM , cerca de 550 μM , cerca de 650 μM , cerca de 700 μM , cerca de 800 μM , cerca de 900 μM , cerca de 1.000 μM , cerca de 1.200 μM , cerca de 1.500 μM , ou cerca de 2.000 μM) na solução.

A solução de extração pode também conter água. A água pode estar, por exemplo, em uma concentração de 6 a 30% (por exemplo, 7 a 28%, 8 a 26%, 10 a 26%, 14 a 25%, 18 a 24%) em volume em uma solução de extração. A concentração de água pode ser de modo que uma solução de
5 extração reconstitua algumas das proteínas e peptídeos enquanto ao mesmo tempo dissolvendo outros analitos (por exemplo, acilcarnitinas, carnitina livre, e aminoácidos) presentes na amostra. A solução de extração pode também conter um ácido orgânico tal como ácido oxálico em uma concentração de cerca de 3 mM (por exemplo, cerca de 1 mM, cerca de 2 mM, cerca de 2,5 mM, cerca de 3,5 mM, cerca de 4 mM, cerca de 4,5 mM, ou cerca
10 de 5 mM).

Opcionalmente, com a ajuda do ácido orgânico (por exemplo, ácido oxálico), que age como um catalisador, hidrazina libera succinilacetona dos resíduos de aminoácido e forma um anel de pirazona estável. A pirazona formada pela reação entre succinilacetona e hidrazina é o composto chamado ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propionico (MPP). Este composto é
15 mais estável do que as bases de Schiff que se formam pela reação de succinilacetona com resíduos de aminoácido. Por esse motivo, uma vez que a succinilacetona tenha reagido com hidrazina, este derivado de MPP pode ser totalmente extraído junto com analitos adicionais (por exemplo, aminoácidos, carnitina livre, e acilcarnitinas) em uma etapa única. O MPP extraído e
20 analitos adicionais pode em seguida ser medidos usando espectrometria de massa tandem. Succinilacetona e outros analitos podem ser avaliados, por exemplo, concomitantemente usando espectrometria de massa tandem. A concentração de MPP diretamente reflete a concentração de succinilacetona na amostra.
25

A figura 3 representa um método exemplar para preparo de uma amostra para análise espectrométrica de massa. Neste caso, uma amostra de mancha de sangue seca obtida de um recém-nascido (ou pessoa de
30 qualquer idade) pode ser perfurada para gerar um pequeno disco que é depositado, por exemplo, em um poço de uma placa de microtitulação. A esta amostra, uma solução de extração pode ser adicionada para extrair os anali-

tos na amostra. A solução de extração pode compreender uma mistura de um monoálcool de cadeia C1-3 linear ou ramificada e uma base forte (as proporções destes dois componentes podem variar tal como descrito acima). A fonte de hidrazina pode ser hidrato de hidrazina ou dicloridrato de hidrazina, ou outras hidrazinas modificadas (por exemplo, acil-hidrazinas, aril-hidrazinas, alquil-hidrazinas, reagentes de Girard-P e Girard-T) ou hidroxilamina. A solução pode também conter água (veja acima) com uma pequena porcentagem de um ácido orgânico (por exemplo, ácido oxálico). Esta solução pode também, opcionalmente, conter um ou mais padrões internos para, por exemplo, aminoácidos, carnitina livre, acilcarnitinas e succinilacetona em concentrações conhecidas. A mistura de amostra pode em seguida ser incubada durante um período predeterminado de tempo (por exemplo, cerca de 25 a cerca de 45 minutos (por exemplo, cerca de 30 a cerca de 45 minutos; cerca de 30 a cerca de 60 minutos; cerca de 30 a cerca de 70 minutos; cerca de 30 a cerca de 90 minutos; cerca de 30 a cerca de 120 minutos; cerca de 35 a cerca de 60 minutos; ou cerca de 40 a cerca de 60 minutos) para permitir a extração de aminoácidos, carnitina livre e acilcarnitinas assim como a extração de succinilacetona ligada e sua concomitante reação com hidrazina ocorrer. O extrato pode em seguida ser transferido a um poço não usado de uma placa de microtitulação e as amostras em seguida analisadas através de espectrometria de massa tandem, opcionalmente, com a ajuda de um dispositivo de manuseio de líquido para injeção de amostra. As regulagens instrumentais no espectrômetro de massa tandem são em seguida estabelecidas para detectar os respectivos metabólitos de interesse (aminoácidos, acilcarnitinas, carnitina, e succinilacetona) assim como seus correspondentes padrões internos de um modo múltiplo.

Pode ser vantajoso derivar não apenas a succinilacetona modificada (por exemplo, MPP), mas analitos adicionais em uma amostra (por exemplo, analitos adicionais tais como aminoácidos, acilcarnitinas, e carnitina). Muitos dos analitos descritos aqui, incluindo succinilacetona, são ácidos carboxílicos; por esse motivo, eles são acessíveis para derivação de amostra através de esterificação. Um método exemplar para esterificação de múl-

tiplos analitos em uma amostra, antes da análise através de espectrometria de massa, é descrito na figura 4. Primeiro, um procedimento similar pode ser desempenhado tal como acima, no entanto, processamento de amostra adicional pode ser desempenhado. Por exemplo, em seguida à etapa de derivação com hidrazina, a amostra pode ser evaporada até a secura. A amostra seca pode em seguida ser reconstituída em uma solução acídica de um álcool alquílico. O álcool pode ser qualquer álcool alquílico tal como, mas não limitados a, metanol, etanol, propanol, n-butanol, *terc*-butanol, pentanol, ou hexanol. Este álcool pode ser contatado com uma amostra em combinação com um ácido concentrado forte (por exemplo, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico). Tal solução de um álcool alquílico e um ácido pode ser, por exemplo, butanol em HCl a 3N ou metanol em HCl a 1N. A amostra pode ser incubada na solução de álcool alquílico/ácido durante cerca de 30 minutos (por exemplo, cerca de 20 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 45 minutos, cerca de 50 minutos, cerca de 60 minutos, cerca de 70 minutos, cerca de 80 minutos, cerca de 90 minutos, cerca de 100 minutos, ou cerca de 120 minutos) em cerca de 39°C (por exemplo, cerca de 30°C, cerca de 35°C, cerca de 36°C, cerca de 37°C, cerca de 40°C, cerca de 42°C, cerca de 50°C, cerca de 55°C, cerca de 60°C, ou cerca de 70°C). Em seguida a esta incubação, uma amostra pode ser evaporada até a secura e em seguida reconstituída em um solvente (por exemplo, acetonitrila); ou acetonitrila e água (por exemplo, 80% de acetonitrila e 20% de água), isopropanol (por exemplo, 80% de isopropanol e 20% de água) ou qualquer outro solvente que seja acessível para análise de espectrometria de massa e que seja capaz de dissolução de compostos orgânicos esterificados.

Analitos adicionais que podem ser detectados e/ou medidos com succinilacetona derivada (modificada) incluem, por exemplo, aqueles listados na Tabela 1.

Tabela 1.

NOME DO ANALITO	ABREVIACÃO
Cetonas	
Succinilacetona	SA
Aminoácidos	
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Ácido aspártico	Asp
Asparagina	Asn
Citrulina	Cit
Cisteína	Cys
Glicina	Gly
Glutamina	Gln
Ácido glutâmico	Glu
Histidina	His
Leucina (isoleucina, Alo-Isoleucina)	Leu (Ile, Allo-Ile)
Lisina	Lys
Metionina	Met
Ornitina	Orn
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptofano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val
Carnitinas	
Carnitina livre	C0
Acetilcarnitina	C2
Propionilcarnitina	C3
Malonilcarnitina	C3DC
Butirilcarnitina	C4
3-Hidróxi-butilcarnitina	C4OH
Isovalerilcarnitina	C5
Tigilcarnitina	C5:1
Glutarilcarnitina	C5DC
3-Hidróxi-isovalerilcarnitina	C5OH
Hexanoilcarnitina	C6
Adipilcarnitina	C6DC
Octanoilcarnitina	C8
Octenoilcarnitina	C8:1
Decanoilcarnitina	C10
Decenoilcarnitina	C10:1
Decadienoilcarnitina	C10:2
Dodecanoilcarnitina	C12
Dodecenoilcarnitina	C12:1
Tetradecanoilcarnitina (Miristoilcarnitina)	C14
Tetradecenoilcarnitina	C14:1
Tetradecadienoilcarnitina	C14:2

continuação

3-Hidróxi-tetradecanoilcarnitina	C14OH
Hexadecanoilcarnitina (palmitoilcarnitina)	C16
Hexadecenoilcarnitina	C16:1
3-Hidróxi-hexadecanoilcarnitina	C16OH
3-Hidróxi-hexadecenoilcarnitina	C16:1OH
Octadecanoilcarnitina (Estearoilcarnitina)	C18
Octadecenoilcarnitina (Oleilcarnitina)	C18:1
Octadecadienoilcarnitina (Linoleilcarnitina)	C18:2
3-Hidróxi-octadecanoilcarnitina	C18OH
3-Hidróxi-octadecenoilcarnitina	C18:1OH

Espectrometria de Massa

Espectrometria de massa tandem pode ser usada para detectar e/ou medir succinilacetona e um ou mais analitos adicionais (por exemplo, carnitina livre, acilcarnitinas, e aminoácidos) em uma amostra (por exemplo, uma amostra biológica). Em espectrometria de massa tandem, dois analitores de massa são ligados em série por meio de uma célula de colisão. O primeiro analitor de massa (MS-1) é usado para seleccionar um íon de interesse (por exemplo, um íon de uma relação de massa para carga (m/z) particular). Os íons seleccionados são em seguida transferidos para uma célula de colisão onde eles são fragmentados por colisões com um gás inerte. Este processo é chamado dissociação colisionalmente ativada (CAD). Uma vez que os íons de origem (algumas vezes referidos como precursor) foram fragmentados, o segundo analitor de massa (MS-2) é usado para ou varrer e detectar a totalidade dos íons filhos produzidos ou para seleccionar e detectar íons de fragmentos particulares.

Tal como detalhado nos Exemplos acompanhantes, espectrometria de massa tandem foi usada para ionizar as moléculas precursoras de succinilacetona derivada (modificada) e diversos aminoácidos, fragmentar os íons, e detectar picos específicos que são indicativos da presença destas moléculas na amostra. A detecção de espectrometria de massa tandem pode ser efetuada de vários modos. Em um tipo de espectrometria de massa tandem (comumente desempenhado em triplo quadripolar espectrômetros de massa tandem), íons que se fragmentam para produzir íons filhos (fragmento) comuns podem ser detectados como uma classe por execução de

uma "varredura de íon precursor" (também chamado varredura de íon de origem), onde por seleção da massa apropriada para o íon de fragmento comum em MS-2 todo íon que produz os íons de fragmento comuns são detectados. Este tipo de varredura pode ser usada para detectar as acilcarnitinas em uma amostra (íon precursor de m/z 85 varreduras). Em uma diferente forma de espectrometria de massa tandem, íons que se fragmentam para produzir uma perda neutra comum podem ser detectados como uma classe por execução de uma assim chamada varredura de perda neutra onde por determinação de uma compensação de massa apropriada igual à perda neutra comum entre MS-1 e MS-2 todos os íons que fragmentam-se para produzir a perda neutra especificada são detectados. Este tipo de varredura é desempenhado para detectar aminoácidos e succinilacetona em uma amostra (perda neutra de m/z 102 se os analitos na amostra extraída foram modificados para ésteres de butila ou perda neutra de m/z 46 se nenhuma outra modificação de analito tiver ocorrido). A figura 5 mostra que uma varredura de perda neutra de m/z 46 foi de diversos aminoácidos e succinilacetona que são detectados da mesma amostra. Um pico único correspondente à succinilacetona derivada é observado em m/z 155, junto com diversos picos únicos correspondentes a aminoácidos. Desta forma, succinilacetona (succinilacetona derivada tal como descrito aqui) pode ser detectada e/ou medida junto com um ou mais analitos adicionais em uma única amostra em uma análise.

Em ainda outro tipo de espectrometria de massa tandem conhecida como monitoramento de reação múltipla (MRM), um íon de origem de interesse é selecionado em MS-1, fragmentado na célula de colisão e um íon de fragmento específico resultante da ativação colisional é selecionado em MS-2 e finalmente detectado. MS-1 e MS-2 são fixados para respectivamente selecionar os pares de íon de origem e de fragmento correspondentes de interesse para uma quantidade predeterminada de tempo (alguns milissegundos). Esta transição de íon de origem-íon de produto específico pode ser considerada como um canal de detecção. Se analitos adicionais precisam ser detectados, canais de detecção adicionais com transições de massa específica podem ser introduzidos no experimento. Os dados de todas as tran-

sições de massa (canais) selecionadas podem ser adquiridos sequencialmente para obter a informação desejada. A detecção e quantificação de succinilacetona (succinilacetona derivada em uma amostra preparada tal como descrito aqui) em uma mistura pode ser obtida por meio do emprego da transição de massa específica para cada um destes compostos como segue: para succinilacetona derivada: MS-1 fixado para selecionar e transmitir o íon de origem em m/z 155, MS-2 fixado para selecionar e transmitir o íon de produto específico em m/z 109 (canal 1 ou transição de MRM 1); e para um aminoácido, tal como tirosina: MS-1 fixado para selecionar e transmitir o íon de origem em m/z 182, MS-2 fixado para selecionar e transmitir o íon de produto específico em m/z 136 (canal 2 ou transição de MRM 2). Estas duas transições de MRM podem ser medidas sequencialmente da mesma amostra durante um período predeterminado de tempo para detectar a presença e/ou concentração de uma mistura destes compostos em tal amostra.

Padrões internos rotulados por isótopos estáveis para succinilacetona (succinilacetona derivada) podem ser adicionados a uma amostra, pelos quais a quantificação de succinilacetona derivada, e desta forma succinilacetona propriamente dita, pode ser desempenhada. Tal rotulação de succinilacetona derivada com isótopos estáveis resulta em uma mudança de massa, enquanto retendo muitas propriedades físico-químicas similares entre os compostos rotulados e não rotulados.

Geralmente, um ou mais padrões internos podem ser adicionados em concentração conhecida a uma amostra para permitir quantificação do analito de interesse (por exemplo, succinilacetona). Por exemplo, para uma amostra analisada usando espectrometria de massa tandem, a relação dos sinais produzidos por succinilacetona derivada (por exemplo, MPP) e seu correspondente padrão interno pode ser usada para determinar as quantidades deste composto na amostra. O padrão interno pode também ser adicionado para distinguir moléculas de ocorrência natural (endógenas). Tal como acima, os padrões internos podem ser preparados em uma solução de extração antes da mistura de uma amostra (por exemplo, uma amostra de

sangue) e a solução de extração. Alternativamente, os padrões internos podem ser adicionados à mistura em qualquer etapa na preparação de amostra que assegura estes padrões internos não serem removidos da mistura durante o processamento de amostra (por exemplo, depois de uma extração líquido-líquido ou uma extração de fase sólida).

Padrões internos para um analito de interesse (ou outras moléculas, por exemplo, biomoléculas descritas aqui) detectado por um método descrito aqui pode ser qualquer modificação ou análogo desta molécula analisada que é detectável através de espectrometria de massa. Um padrão interno é separadamente detectável da molécula com base em características físicas únicas, tais como uma massa única ou relação da massa para carga. Um padrão interno comumente usado para espectrometria de massa é uma forma isotopicamente rotulada estável ou derivado químico de um analito de interesse (por exemplo, se o analito foi MPP, o padrão interno pode ser um MPP isotopicamente rotulado). Por exemplo, análogos rotulados por isótopo estáveis podem ser usados para quantificar o correspondente analito de interesse usando a técnica conhecida como espectrometria de massa de diluição de isótopo onde o analito e padrões internos são processados na mesma amostra. Padrões internos podem ser determinados de modo que 1) a rotulação cause uma mudança na massa de pelo menos 1 unidade de massa e 2) que nenhum dos rótulos de isótopo estáveis sejam localizados em sítios lábeis para prevenir permuta. Rótulos podem estar ^2H (D), ^{15}N , ^{13}C ou ^{18}O em qualquer combinação. A localização atual dos rótulos na molécula pode variar com a condição de que o pré-requisito 2 (acima) seja satisfeito. Além do mais, a posição dos rótulos e a mudança potencial na massa dos íons de fragmento podem também ser usadas para confirmar separação do padrão interno e analitos. Exemplos de padrões internos potenciais úteis nos métodos descritos aqui incluem, mas não são limitados a, um isotopicamente rotulado: succinilacetona derivada (por exemplo, ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propiónico (MPP)), carnitina, acilcarnitina, ou aminoácido (por exemplo, prolina, metionina, ou tirosina).

Diversos tipos de espectrômetros de massa estão disponíveis ou

podem ser produzidos com várias configurações, a totalidade dos quais podem ser úteis nos métodos descritos aqui. Em geral, um espectrômetro de massa possui os seguintes componentes principais: uma entrada de amostra, uma fonte de íon, uma célula de colisão, um analitor de massa, um detector, um sistema de vácuo, e sistema de controle de instrumento, e um sistema de dados. Diferença na entrada de amostra, fonte de íon, e analitor de massa geralmente define o tipo de instrumento e suas capacidades. Por exemplo, uma entrada pode ser uma fonte de cromatografia líquida de coluna capilar ou pode ser uma sonda direta ou estágio tal como usado em desabsorção a laser assistida matriz. Fontes de íon comuns são, por exemplo, eletrovaporização, incluindo nanovaporização e microvaporização ou desabsorção a laser assistida matriz. Analitores de massa comuns incluem filtros de massa quadripolares, analitores de massa de tempo de trajetória (de preferência um analitor de massa de tempo de trajetória de aceleração ortogonal), filtros de massa de captura de íon, analitores de setor magnético, ou analitores de massa de Ressonância de Ciclotron de Íon de Transformação de Fourier ("FTICR"). A célula de colisão pode ser, por exemplo, um conjunto de bastão quadripolar, um conjunto de bastão hexapolar, ou um conjunto de bastão octopolar. A célula de colisão de preferência forma um recinto impermeável substancialmente a gás além de uma abertura de entrada de íon e saída de íon. Um gás de colisão tal como hélio, argônio, nitrogênio, ar ou metano pode ser introduzido na célula de colisão.

Os exemplos específicos descritos aqui foram desempenhados usando espectrômetros de massa tandem (veja, por exemplo, os Exemplos acompanhantes).

Amostras

Amostras adequadas para os métodos descritos aqui incluem qualquer fluido biológico, célula, tecido, ou fração deste, que inclui biomoléculas indicativas de um estado metabólico (por exemplo, um distúrbio metabólico caracterizado por níveis de succinilacetona alterados tais como Tirosinemia hereditária tipo I). Uma amostra pode ser, por exemplo, uma espécie obtida de um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser hu-

mano) ou pode ser derivada de tal indivíduo. Por exemplo, uma amostra pode ser uma seção de tecido obtida por biopsia, ou células que são colocadas em ou adaptadas à cultura de tecido. Amostras exemplares por esse motivo incluem fibroblastos cultivados, células de fluido amniótico cultivadas, e amostra de vilosidades coriônicas. Uma amostra pode também ser uma espécime de fluido biológico tal como urina, sangue, plasma, soro, saliva, sêmen, esputo, fluido cerebro espinhal, lágrimas, muco, e outros mais. Uma amostra pode ser também fracionada, se desejado, a uma fração contendo tipos de célula particular. Por exemplo, uma amostra de sangue pode ser fracionada em soro ou em frações contendo tipos particulares de células sanguíneas tais como células sanguíneas vermelhas ou células sanguíneas brancas (leucócitos). Se desejado, uma amostra pode ser uma combinação de amostras de um indivíduo tal como uma combinação de um tecido e amostra de fluido, e outros mais. Métodos para obtenção de amostras que preservam a atividade ou integridade das moléculas na amostra são bem-conhecidos àqueles versados na técnica. Tais métodos incluem o uso de tampões e/ou inibidores apropriados, incluindo inibidores de nuclease, protease e fosfatase, que preservam ou minimizam mudanças nas moléculas na amostra. Tais inibidores incluem, por exemplo, quelantes tais como ácido tetra-acético de etilenodiamina (EDTA), ácido N,N,N1,N1-tetra-acético de bis(P-aminoetil éter) de etileno glicol (EGTA), inibidores de protease tais como fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipaina e outros mais, e inibidores de fosfatase tais como fosfato, fluoreto de sódio, vanadato e outros mais. Tampões e condições apropriadas para isolamento de moléculas são bem-conhecidos àqueles versados na técnica e podem ser variados dependendo, por exemplo, do tipo de molécula na amostra a ser caracterizado (veja, por exemplo, Ausubel e outros *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow e Lane, *using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz *Textbook of Clinical Chemistry*, 3^a ed. Burtis e Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999)). Uma amostra também pode ser

processada para eliminar ou minimizar a presença de substâncias interferentes. Para uso nos métodos descritos aqui, uma amostra pode ser em uma variedade de estados físicos. Por exemplo, uma amostra pode ser um líquido ou sólido, pode ser dissolvida ou suspensa em um líquido, pode estar em uma emulsão ou gel, e pode ser absorvida sobre um material. Como um exemplo não-limitante, uma amostra pode ser uma amostra de sangue líquida, amostra de soro líquida, amostra de célula sanguínea branca líquida, sangue seco, soro, ou amostra de célula branca, ou uma tal amostra absorvida em um papel ou substrato polímero.

10 **Aplicações Exemplares**

Os métodos descritos aqui podem ser usados para obter um perfil molecular para uma amostra, por exemplo, uma amostra de um indivíduo tal como um ser humano. O perfil pode incluir informação que indique se succinilacetona, ou succinilacetona e outros analitos biológicos tais como aminoácidos, estão presentes e tipicamente incluem informação sobre a presença (qualitativa ou quantitativa) de succinilacetona (e um ou mais analitos biológicos adicionais).

Em algumas aplicações destes métodos de espectrometria de massa, perfis metabólicos para um indivíduo (por exemplo, um ser humano) podem ser obtidos. Por exemplo, os perfis podem incluir o nível de succinilacetona em um indivíduo (por exemplo, um paciente humano). Outras biomoléculas podem também ser detectadas, quantificadas, e/ou avaliadas, incluindo, por exemplo, um ou mais de um aminoácido, carnitina livre, ou uma acilcarnitina, em uma amostra biológica usando espectrometria de massa tandem. A informação resultante (perfil metabólico) pode ser usada para avaliação do estado de saúde de um indivíduo (por exemplo, um paciente humano), tal como presença ou ausência de um distúrbio metabólico (por exemplo, uma aminoacidopatia, um distúrbio de ácido graxo ou ácido orgânico, ou um distúrbio metabólico associado com níveis alterados de succinilacetona (por exemplo, Tirosinemia hereditária tipo I)), ou para avaliar risco para tal distúrbio. Exemplos de amino acidopatias incluem, mas não são limitados a, argininemia, acidúria argininossuccínica (deficiência de argininos-

succinato liase/deficiência de argininossuccinase), citrulinamia (deficiência de ácido argininossuccínico sintetase/ deficiência de argininossuccinato sintetase), homocistinúria, deficiência de cistationa sintase, hipermetioninemia, hiperornitinemia, hiperamonemia, síndrome de hiperomocitrulinúria, deficiência de ornitina translocase, Doença de Urina de Xarope de Ácer de hiperprolinemia (cetoacidúria de cadeia ramificada), fenilcetonúria de hiperglicinemia não cetótica, academia de piroglutâmico/pipecólico, tirosenemia (tipo I), tirosenemia (tipo II), 5-oxoprolinúria, ou acidúria piroglutâmica. Exemplos de distúrbios de ácido graxo e ácido orgânico incluem, por exemplo, deficiência de 2-metilbutiril-CoA desidrogenase, deficiência de 2,4-Dienoil-CoA redutase, deficiência de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase (acidemia hidroximetilglutárico), deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-metilcrotonilglicinamia), deficiência de carnitina palmitoiltransferase (tipo I), deficiência de carnitina palmitoiltransferase (tipo II), defeito de transportador de carnitina, defeito de carnitina/acilcarnitina translocase, academia etilmalônica, academia glutárica (tipo I; deficiência de glutaril-CoA desidrogenase); academia isovalérica de deficiência de isobutiril-CoA desidrogenase, deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia longa, deficiência de hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa, acidúria malônica, deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média, academia metilmalônica, deficiência de acetacetil-CoA tiolase mitocondrial (deficiência de Beta-Cetotiolase), deficiência de acil-CoA desidrogenase múltipla (acidemia glutárica, tipo II), deficiência de Co-A carboxilase múltipla (deficiência de Holocarboxilase sintetase), academia propiônica, deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia curta, deficiência de hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta, deficiência de proteína trifuncional, e deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa. Distúrbios metabólicos adicionais são descritos em, por exemplo, Chace e outros (2001) *Clinical Chemistry* 47:1166-82; Rashed e outros (1997) *Clinical Chemistry* 43(7):1129-41; Schulze e outros (2003) *Pediatrics* 111(6):1399-1406; e Zytkevich e outros (2001) *Clinical Chemistry* 47(11):1945-55.

Tirosinemia tipo I (por exemplo, Tirosinemia hereditária tipo I),

por exemplo, é causada pela falta de atividade de fumarilacetoacetase que leva ao acúmulo de fumarilacetoacetato (figura 1). Fumarilacetoacetato é rapidamente convertido por outras enzimas a succinilacetona e desta forma pacientes com tirosinemia tipo I acumulam succinilacetona em seu sangue.

5 Por esse motivo, a capacidade de detectar succinilacetona ou sozinha, ou junto com outras biomoléculas (por exemplo, biomoléculas metabólicas), pode ser útil para avaliação do estado de saúde de um indivíduo. Em consequência, é possível, ao mesmo tempo, detectar outros aminoácidos tal como tirosina e metionina, também e outras biomoléculas tal como carnitina livre e
10 acilcarnitinas, na amostra, por exemplo, por identificação de picos únicos para tais moléculas na análise de espectrometria de massa. A Tabela 1 inclui uma lista não-exaustiva de analitos (por exemplo, biomoléculas) que podem ser detectados/medidos com succinilacetona (a título de succinilacetona derivada) usando os métodos descritos aqui.

15 Um perfil metabólico obtido pelos métodos descritos aqui pode ser usado em diagnóstico ou previsão de suscetibilidade a uma variedade de distúrbios metabólicos porque os indicadores bioquímicos (por exemplo, succinilacetona) examinados podem ser indicativos de tais distúrbios, se ou não sintomas fisiológicos ou comportamentais do distúrbio tornam-se eviden-
20 tes (por exemplo, um suspeito de possuir um distúrbio metabólico tal como uma aminoacidopatia (por exemplo, tirosinemia tipo I). Um perfil metabólico tal como descrito aqui pode ser útil para monitoramento do metabolismo de um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser humano), tal como aquele passando por tratamento para um distúrbio metabólico. Como um
25 exemplo não-limitante, os métodos podem ser usados para determinação de eficácia terapêutica de um tratamento particular (por exemplo, a capacidade de um tratamento restaurar níveis de succinilacetona a níveis fisiológicos). Com base nesta determinação, ao indivíduo pode ser oferecido opções terapêuticas adicionais ou alternativas. O perfil metabólico pode também ser útil
30 para avaliação de complacência de paciente com uma modalidade de tratamento particular, tal como restrição alimentar (por exemplo, a eficácia de um regime alimentar na restauração de níveis de succinilacetona a níveis fisio-

lógicos). Por esse motivo, a tecnologia descrita aqui é aplicável a análise, diagnose, prognóstico, terapia de monitoramento e complacência, e qualquer outra aplicação em que determinação da presença ou quantidade de painéis de duas ou mais biomoléculas, tais como succinilacetona e um ou mais de
5 um aminoácido, carnitina livre, ou uma acilcarnitina, é útil.

Um perfil metabólico gerado usando os métodos descritos aqui pode ser obtido usando uma variedade de amostras biológicas. Amostras adequadas incluem aquelas descritas acima.

Em um aspecto, um perfil metabólico tal como descrito aqui po-
10 de ser usado para avaliar a presença ou ausência de um distúrbio metabólico tal como uma aminoacidopatia (por exemplo, tirosinemia tipo I).

Indivíduos de todas as idades podem ser afetados por distúrbios metabólicos diagnosticados usando um perfil metabólico descrito aqui. Por esse motivo, uma amostra usada em um método descrito aqui pode ser obti-
15 da de um indivíduo (por exemplo, um ser humano) de qualquer idade, incluindo um neonato, recém-nascido, bebê, criança, e adulto, tal como uma fêmea grávida e indivíduo possuindo ou suspeito de possuir tirosinemia. Os métodos podem também ser usados para indivíduos em risco de desenvolvimento de um distúrbio metabólico. Tais indivíduos incluem aqueles que
20 possuem (i) um histórico familiar de (uma predisposição genética para) tais distúrbios ou (ii) um ou mais fatores de risco para desenvolvimento de tais distúrbios. Os métodos podem também ser usados para diagnose pré-natal se as mudanças em succinilacetona ou pelo menos um nível de analito adicional (por exemplo, um ou mais de um aminoácido, carnitina livre, ou uma
25 acilcarnitina) são evidentes em amostras maternas tais como fluido amniótico, sangue materno ou plasma. Os métodos além disso podem ser usados para monitorar níveis de succinilacetona em indivíduos possuindo condições de saúde associadas com níveis de succinilacetona alterada, tais como indivíduos passando por transplante de fígado.

30 Os métodos descritos aqui envolvem detecção da presença ou quantidade de succinilacetona e um ou mais analitos biológicos adicionais (por exemplo, aminoácidos, carnitina livre, ou acilcarnitinas, onde a presença

ou quantidade de cada biomolécula correlaciona-se à presença ou ausência de um distúrbio metabólico. Os métodos descritos aqui podem ser usados quantitativamente, se desejado, para permitir comparação de resultados de amostra de teste com uma quantidade padrão conhecida ou predeterminada de analito(s) particular(es) (por exemplo, por uso de um padrão interno tal como descrito acima). Os métodos podem também ser usados qualitativamente quando uma amostra de teste é comparada com uma amostra de referência, que pode ser ou uma referência normal ou referência de distúrbio metabólico. Neste formato, a quantidade relativa de biomoléculas pode ser indicativa de um distúrbio metabólico. Uma amostra de referência, por exemplo, pode ser de um indivíduo possuindo, não suspeito de possuir, ou não em risco de desenvolvimento de um distúrbio tal como um distúrbio metabólico tal como uma aminoacidopatia (por exemplo, tirosinemia tipo I).

De um modo geral, um valor de corte para uma dada biomolécula pode variar e seria conhecido na técnica para analitos e enzimas comumente testados. Rotina, óbvias adaptações de métodos conhecidos na técnica podem ser usadas para estabelecer valores de corte para analitos não comumente testados. Um valor de corte é tipicamente uma quantidade de biomolécula, ou relação com outra biomolécula, acima ou abaixo que é considerada indicativo de um distúrbio metabólico ou causa para reteste. Desta forma, de acordo com a tecnologia descrita aqui um nível de referência de pelo menos uma biomolécula em um tipo de amostra particular é identificado como um valor de corte, sobre o que há uma significativa correlação entre a presença de pelo menos uma biomolécula e presença (ou ausência) de um distúrbio metabólico. É entendido que painéis de biomolécula podem ser interpretados como um total, em partes ou em uma base analito por analito.

Aqueles versados na técnica reconhecerão que alguns valores de corte que não são absolutos nestas correlações clínicas são ainda significantes sobre uma faixa de valores em ou parte do corte; no entanto, é possível selecionar um valor de corte ideal (por exemplo, escores de H variantes, e outros mais) de biomolécula para um tipo de amostra particular. Valores de corte determinados para uso nos métodos descritos aqui geralmente são

comparados com faixas publicadas mas podem ser individualizados à metodologia usada e população de paciente. É entendido que melhoramentos em valores de corte ideais poderiam ser determinados dependendo da sofisticação de métodos estatísticos usados e do número e fonte de amostras usadas para determinar valores de nível de referência para as diferentes biomoléculas e tipos de amostra. Por esse motivo, valores de corte estabelecidos podem ser ajustados acima ou abaixo, com base em reavaliações periódicas ou mudanças em metodologia ou distribuição de população. Além disso, valores de corte específicos por instrumento podem ser usados, se desejado, por exemplo, tal como quando a comparabilidade de desempenho interinstrumento é $>10\%$.

O nível de referência pode ser determinado por uma variedade de métodos, com a condição de que o nível de referência resultante precisamente forneça uma quantidade de cada biomolécula acima que existe em um primeiro grupo de indivíduos (por exemplo, seres humanos) possuindo uma diferente probabilidade de distúrbio metabólico do que aquela de um segundo grupo de indivíduos possuindo quantidade de analito metabólico ou atividade de enzima abaixo do nível de referência. O nível de referência pode ser determinado por comparação de quantidade de biomolécula em, por exemplo, populações de indivíduos (por exemplo, pacientes) possuindo o mesmo distúrbio metabólico. Isto pode ser efetuado, por exemplo, por análise de histograma, em que um coorte inteiro de pacientes é graficamente apresentado, em que um primeiro eixo representa a quantidade de biomolécula e um segundo eixo representa o número de indivíduos no coorte cuja amostra contém uma ou mais biomoléculas em uma dada quantidade. Dois ou mais grupos separados de indivíduos podem ser determinados por identificação de populações de subséries do coorte que possuem os mesmos ou níveis similares de biomoléculas. Determinação do nível de referência pode em seguida ser feita com base em uma quantidade que melhor distingue estes grupos separados. O nível de referência pode ser um número único, igualmente aplicável a cada indivíduo, ou o nível de referência pode variar, de acordo com subpopulações específicas de indivíduos. Por exemplo, indi-

víduos mais velhos podem possuir um nível diferente de referência do que indivíduos mais jovens para o mesmo distúrbio metabólico. Além disso, um indivíduo com doença mais avançada (por exemplo, uma forma mais avançada de um distúrbio metabólico) pode possuir um valor diferente de referência do que um com uma forma mais suave da doença.

Os métodos podem também ser usados para determinar a presença ou quantidade de outras cetonas biologicamente ativas, por exemplo, esteroides. Por exemplo, os métodos descritos aqui podem ser usados para detectar a presença ou quantidade de um esteroide em uma amostra biológica obtida de um indivíduo (por exemplo, um paciente humano), os métodos podem ser usados para diagnosticar, ou gerar perfis metabólicos úteis para a diagnose, de uma ou mais condições associadas com níveis alterados de esteroides, por exemplo, deficiência de 21-OH, deficiência de 11b-OH, deficiência de 21-OH por perda de sal, câncer adrenal, hiperplasia adrenal, hipopituitarismo, deficiência de aldosterona sintase, distúrbio adrenalcortical, menopausa, ou gravidez.

Métodos de Identificação de Compostos que Modulam Níveis de Succinilacetona

Também fornecidos aqui são métodos de identificação de compostos que modulam (por exemplo, diminuem) os níveis de succinilacetona em uma célula. Os compostos podem modular succinilacetona e várias moléculas biológicas adicionais tais como, mas não limitados a, carnitina livre, acilcarnitinas, e aminoácidos (por exemplo, prolina, metionina, ou tirosina). Tal como discutido *supra*, uma vez que níveis desregulados (por exemplo, elevados) de succinilacetona são associados com risco aumentado de certos distúrbios (por exemplo, amino acidopatias), compostos assim identificados poderiam ser úteis em tratamento de amino acidopatias tal como tirosinemia tipo I. Células que podem ser contatadas com o composto candidato podem ser de qualquer espécie de modo que as células produzam succinilacetona (ou sinteticamente ou naturalmente). As células podem ser células primárias ou linhagens celulares e podem ser de qualquer tipo histológico, por exemplo, sem limitação, células epiteliais, fibroblastos, células linfoides, macrófa-

gos/monócitos, granulócitos, ceratinócitos, células neuronais, ou células musculares. As células podem ser cultivadas em placas de cultura de tecido. Frequentemente é preferível desenvolver as células em placas de ensaio de múltiplos poços (por exemplo, placas de ensaio de 96 poços ou 384 poços) de modo que compostos candidato múltiplos possam ser avaliados em um tempo. O composto candidato (opcionalmente em várias concentrações variando, por exemplo, de 0,001 nM a 10 mM) pode ser adicionado a uma solução (por exemplo, meio de cultura) contendo as células ou, onde o composto é uma proteína, as células podem recombinantemente expressá-lo. Em seguida à incubação de células expressando succinilacetona, a presença ou nível de succinilacetona pode ser determinada usando uma preparação de amostra (extração) e métodos de espectrometria de massa tandem descritos aqui. Antes da detecção, as células podem ser lisadas sob condições que permitem uma amostra ser preparada, o que é compatível com os métodos de extração descritos aqui e com espectrometria de massa tandem. Frequentemente um composto de controle pode ser adicionado a um grupo de células como ou um controle positivo ou negativo.

Os compostos identificados em quaisquer dos métodos descritos aqui incluem várias classes químicas. Compostos podem ser biomoléculas incluindo, mas não limitados a, peptídeos, polipeptídeos, peptidomiméticos (por exemplo, peptídeos), aminoácidos, análogos de aminoácido, sacarídeos, ácido graxos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados ou análogos estruturais destes, polinucleotídeos, e análogos de polinucleotídeo. Compostos podem ser compostos de molécula tanto pequena ou grande.

Identificação de compostos de teste por meio do uso de várias bibliotecas descritas aqui permite subsequente modificação do composto de teste "choque" ou "sonda" para otimizar a capacidade do "choque" ou "sonda" modular os níveis de succinilacetona em uma célula.

Os métodos descritos aqui podem ser modificados para identificar compostos que modulam os níveis de uma cetona biologicamente ativa, por exemplo, um esteroide ou qualquer das cetonas biologicamente ativas descritas aqui.

Kits

Também fornecidos aqui são *kits* úteis para preparo de amostras para detecção e/ou medição (usando espectrometria de massa tandem) de succinilacetona junto com múltiplos outros analitos (por exemplo, aminoácidos, carnitina livre, e acilcarnitina) em uma amostra, por exemplo, uma amostra de sangue seca ou qualquer das amostras descritas aqui. Os *kits* podem ser usados para extrair succinilacetona junto com um ou mais analitos adicionais (por exemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, e carnitinas) de uma amostra (por exemplo, uma mancha de sangue) em uma etapa única de modo que as concentrações de succinilacetona e analitos adicionais (por exemplo, aminoácidos, carnitina, e acilcarnitinas) no extrato reflitam suas respectivas concentrações (ou relações) na amostra. Os *kits* podem ser usados para preparar uma amostra para simultaneamente analisar succinilacetona, alanina, arginina, citrulina, glicina, leucina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, tirosina, valina, e acilcarnitinas tais como C0, C2, C3, C3DC/C4OH, C4, C4DC/C5OH, C5, C5:1, C5DC/C6OH, C6, C6DC/C7OH, C8, C8:1, C10, C10:1, C10:2, C12, C12:1, C14, C14:1, C14:2, C14OH, C16, C16:1, C16OH, C16:10H, C18, C18:1, C18:2, C18OH, C18:10H (veja Tabela 1).

Os *kits* podem incluir um ou mais padrões internos e/ou controles para uso em subsequente análise espectrométrica de massa. Por exemplo, os *kits* podem incluir succinilacetona (SA) como um controle e uma forma derivada de SA (por exemplo, ácido 3,4,5,6,7-¹³C₅-(3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propionato (MPP)) rotulado (por exemplo, isótopos rotulados) como um padrão interno. A succinilacetona e/ou succinilacetona derivada pode cada uma ser fornecida no *kit* em uma forma líquida ou seca (por exemplo, liofilizada). A succinilactona e/ou succinilacetona derivada pode ser fornecida em uma quantidade de cerca de 1 mmol (por exemplo, cerca de 1,5 mmol, cerca de 2 mmols, cerca de 2,5 mmols, cerca de 3,0 mmols, cerca de 3,5 mmols, cerca de 4,0 mmols, cerca de 4,5 mmols, ou cerca de 5 mmols). Os *kits* podem incluir succinilacetona ou succinilacetona derivada (por exemplo, MPP) em um recipiente contendo um ou mais controles ou padrões internos adi-

cionais. Por exemplo, o *kit* pode incluir um recipiente com um controle de succinilacetona, um ou mais controles de aminoácido, e um ou mais controles de carnitina (por exemplo, carnitina livre e acilcarnitinas). Os *kits* podem também incluir prolina como um controle e prolina rotulada (por exemplo, rotulada por isótopo) estável como um padrão interno.

Os *kits* podem também incluir uma base forte tal como hidrazina, por exemplo, dicloridrato de hidrazina ou qualquer das outras bases fortes descritas aqui. A base pode ser fornecida em solução em uma concentração de menos do que cerca de 0,5% (por exemplo, menos de cerca de 0,05%, menos do que cerca de 0,06%, menos do que cerca de 0,07%, menos do que cerca de 0,08%, menos do que cerca de 0,09%, menos do que cerca de 0,1%, menos do que cerca de 0,15%, menos do que cerca de 0,2%, menos do que cerca de 0,25%, menos do que cerca de 0,3%, menos do que cerca de 0,35%, menos do que cerca de 0,4%, menos do que cerca de 0,45%, ou menos do que cerca de 0,475%).

Uma ou mais soluções contidas no *kit* pode ser armazenada em, por exemplo, frascos de vidro silanizado. Um ou mais componentes do *kit* pode ser armazenado em um recipiente que previna ou minimize perda de material ou evaporação de um solvente. Por exemplo, o recipiente pode ser selado com um septo.

Os *kits* podem incluir, por exemplo, manchas de sangue secas (por exemplo, plasma, linfa) úteis como um controle. Por exemplo, a mancha de sangue seca pode ser enriquecida com um ou mais analitos (por exemplo, um ou mais analitos em concentrações conhecidas) tais como succinilacetona, um ou mais aminoácidos, carnitina livre, ou uma ou mais acilcarnitinas.

Os *kits* podem também, opcionalmente, incluir uma solução de extração tal como qualquer de uma solução de extrações descritas aqui. A solução de extração pode conter um monoálcool de C1-3 linear ou ramificado e uma base forte. Os *kits* podem também incluir uma ou mais soluções de solvente contendo, por exemplo, acetonitrila ou isopropanol. As soluções de solvente podem também conter água, por exemplo, uma solução de sol-

vente contendo 80% de acetonitrila e 20% de água.

Em algumas modalidades, o *kit* pode também incluir um ou mais componentes para testar quanto a atividade de biotinidase em uma amostra assim como para testar quanto à presença de distúrbios de armazenamento lisossômico ou galactosemia em um indivíduo.

Tais *kits* podem ser usados em seguida na detecção de níveis de succinilacetona, aminoácidos, carnitina livre, ou acilcarnitina elevados ou baixos em sangue de recém-nascido para a diagnose de um ou mais de diversos distúrbios metabólicos. Por exemplo, níveis elevados de succinilacetona podem ser indicativos de tirosinemia tipo I. Carnitina livre e acilcarnitinas são marcadores para distúrbios que são geralmente classificados como distúrbios de oxidação de ácido graxo (FAO) e distúrbios de acidúria orgânica (OAD). Similarmente, aminoácidos são usados como marcadores para diversos distúrbios metabólicos coletivamente conhecidos como amino acidopatias. Estes distúrbios são erros congênitos de metabolismo (ou deficiências metabólicas genéticas).

Entende-se que modificações que não afetam substancialmente a atividade das várias modalidades desta invenção são também incluídas dentro da definição da invenção fornecida aqui. Por conseguinte, o seguinte exemplo pretende ilustrar, não limitar, a presente invenção.

EXEMPLO

Exemplo 1

Manchas de sangue (sangue total) padrão de referência foram preparadas usando sangue total obtido de um indivíduo. O sangue foi processado por ajuste da concentração de hemoglobina a 17 mg/dL e adição ao sangue de diversos aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas e succinilacetona em concentrações conhecidas. O sangue processado foi dispensado em cartões de papel de filtro para formar manchas de sangue na matriz de papel de filtro. Cada mancha de sangue foi gerada por aplicação de 75 µL de sangue processado. As manchas de sangue foram deixadas secar durante a noite.

Um disco pequeno (0,317 cm (1/8")) de uma mancha de sangue

seca foi puncionado e depositado em um poço de placa de microtitulação. A amostra foi extraída por aplicação de 100 μ L de uma solução de extração que consistia em uma mistura de metanol e água em uma relação de volume para volume relativa aproximada de 78% de metanol e 22% de água. Além disso, a solução de extração continha um ácido oxálico a 3 mM, e uma concentração de 600 μ M de dicloridrato de hidrazina. Padrões internos (análogos de isótopo pesado estável dos analitos de interesse) para diversos aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas e succinilacetona (MPP) estavam também presentes em uma solução de extração. Os padrões internos incluídos na solução são indicados em varredura de espectrometria de massa tandem mostrada na figura 5.

A amostra extraída foi injetada em um espectrômetro de massa tandem quadripolar triplo por eletrovaporização com a ajuda de um dispositivo de manuseio de líquido automatizado. Dados de massa espectral para os aminoácidos e succinilacetona (MPP) foram adquiridos por meio de uma perda neutra de 46 varreduras (figura 5).

Exemplo 2.

Manchas de sangue contendo diversos aminoácidos, carnitina, acilcarnitinas e succinilacetona em concentrações conhecidas foram preparadas como acima (exemplo 1). Um pequeno disco (0,317 cm)(1/8") de uma mancha de sangue seca foi puncionado e depositado em um poço uma placa de microtitulação. Uma amostra foi extraída na presença de padrões internos tais como descrito acima.

Em seguida à extração, a amostra foi evaporada até a secura. A amostra seca foi em seguida reconstituída em HCl a 3N em n-butanol e incubada em 39°C durante cerca de 30 minutos. Em seguida a esta incubação, a amostra foi novamente evaporada até a secura e em seguida reconstituída em uma solução de acetonitrila e água.

A amostra extraída foi injetada em um espectrômetro de massa tandem quadripolar triplo por eletrovaporização com a ajuda de um dispositivo de manuseio de líquido automatizado. Os dados foram adquiridos na perda neutra de 102 varreduras. A formação de ésteres de butila é evidente pe-

lo aumento de 56 dáltons (Da) (referência cruzada figura 5) no m/z dos íons efetuada por esta esterificação (figura 6). Estes dados demonstram que em seguida à derivação de succinilacetona (tal como descrito aqui), a amostra pode ser também processada (por exemplo, por esterificação), se preciso for, para detectar outros constituintes de analito.

Exemplo 3.

Manchas de sangue secas foram preparadas como acima. As manchas de sangue foram reforçadas com diferentes níveis dos analitos (aminoácidos, Succinilacetona (SA), carnitina livre e acilcarnitinas) mostrados na Tabela 2 e Tabela 3. As manchas de sangue foram extraídas tais como descrito acima (exemplo 1; a definição para cada um dos analitos indicados nas tabelas pode ser encontrada na Tabela 1.) A amostra extraída foi injetada em um espectrômetro de massa tandem quadripolar triplo por eletrovaporização com a ajuda de um dispositivo de manuseio de líquido automatizado. Os dados espectrais de massa para o aminoácido e succinilacetona (MPP) foram adquiridos por meio de uma perda neutra de m/z 46 varreduras e para carnitina e acilcarnitinas por meio de um íon precursor de m/z 85 varreduras. A porcentagem de cada analito recuperado foi determinada por meio de comparação com um padrão interno para cada analito.

As várias recuperações, em porcentagem, são apresentadas na Tabela 2, os vários níveis de precisão são apresentados na Tabela 3.

A imprecisão do ensaio foi determinada por análise das amostras descritas na tabela três. Cada ciclo de amostra consistia em punções em triplicata de cada amostra que foram processadas e medidas tal como descrito no Exemplo 1. O estudo incluiu dois de tais ciclos por dia durante um total de cinco dias. Com esta informação os seguintes componentes de imprecisão foram determinados: dentro do ciclo, entre o ciclo - dentro do dia, e entre o dia a partir do qual a imprecisão total foi determinada. Os resultados da análise de imprecisão são mostrados na Tabela 3.

Estes dados demonstram que os métodos descritos aqui podem ser usados para simultaneamente extrair e quantificar MPP, aminoácidos, carnitina e acilcarnitinas usando espectrometria de massa tandem.

Exemplo 4.

A tirosina é atualmente usada como um marcador de diagnóstico para análise de tirosinemia tipo I. Para mostrar que a detecção de succinilacetona, quando comparada à tirosina, resulta em um aumento em especificidade para determinação de estado de tirosinemia tipo I em um indivíduo, amostras de sangue de um paciente afetado (isto é, paciente positivo de tirosinemia tipo I) foram comparadas às amostras normais conhecidas para as concentrações de tirosina e succinilacetona (MPP) correspondentes. Manchas de sangue secas de recém-nascidos saudáveis e de um recém-nascido com um caso confirmado de tirosinemia tipo I foram obtidas em 25 horas e 14 dias de idade. As manchas de sangue foram extraídas e submetidas à análise espectrométrica de massa tal como descrito acima (Exemplo 1). Embora o paciente afetado exiba níveis de tirosina normais em 25 horas de idade (a janela de análise de recém-nascido), não é até que o paciente seja 14 dias mais velho, que os níveis de tirosina são significativamente elevados (espectros de figura 7 e figura 8; tabela e gráficos de barra). Em contraste, succinilacetona (MPP) mostra elevação muito significativa (30 a 40 desvios padrão formam a média normal) mesmo tão precoce quanto 25 horas após o nascimento. Desta forma, em 25 horas de idade, este paciente teria sido um negativo falso se a tirosina fosse o único marcador usado. Visto que a detecção precoce é crucial para a tirosinemia tipo I, a detecção de succinilacetona é muito vantajosa para o diagnóstico desta condição.

Exemplo 6.

Muitos dos métodos descritos aqui usam uma base forte para formar uma base de Schiff com succinilacetona, desse modo ela pode ser extraída e medida. A hidrazina pode ser obtida de diversas formas, por exemplo, hidrato de hidrazina ou dicloridrato de hidrazina. Embora ambas estas formas funcionem de modo similar nos métodos descritos aqui, para testar qual das duas formas de hidrazina é a mais estável, e desta forma possuiria a vida de prateleira mais longa, a estabilidade relativa de cada forma foi testada durante uma abrangência de tempo de cerca de 60 dias. Soluções de cada forma de hidrazina (hidrato de hidrazina em 0,5% e diclori-

- drato de hidrazina em 0,1%) foram incubadas em 30°C e em vários momentos (por exemplo, 1 a cerca de 60 dias), a quantidade de cada forma de hidrazina foi determinada por um ensaio fluorométrico padronizado. O hidrato de hidrazina foi determinado ser instável, enquanto que, dicloridrato de hidrazina foi determinado ser muito mais estável e desta forma muito mais adequado para um produto robusto (figura 9).
- 5

Tabela 2. Recuperações em porcentagem para vários analitos em sangue seco.

	Reforço (µM)	Recuperação	Reforço (µM)	Recuperação	Reforço (µM)	Recuperação	Reforço (µM)	Recuperação	Reforço (µM)	Recuperação
ALA	81	67	644	77	1450	78	3261	90		
ARG	79	70	635	71	1429	71	3216	80		
CIT	31	90	251	86	564	83	1270	92		
GLY	83	83	665	79	1495	78	3364	88		
LEU	45	68	357	70	803	70	1807	79		
MET	21	74	171	73	385	72	866	81		
SA	4	72	29	69	65	66	147	76		
ORN	68	100	544	94	1223	92	2752	101		
PHE	42	101	337	99	759	99	1708	109		
PRO	63	96	507	94	1141	92	2567	104		
TYR	54	94	431	93	969	91	2181	102		
VAL	41	78	324	83	730	83	1642	93		
C0	45	101	362	94	814	92	1831	102		
C2	14	79	110	77	248	75	557	83		
C3	1,7	72	14	73	31	71	70	81		
C4	1,3	71	10	68	24	66	53	75		
C5	1,2	80	10	76	21	74	48	82		
C5DC	0,5	102	4	97	9	95	21	104		
C6	1,2	83	10	80	21	77	48	87		
C8	0,8	80	7	76	15	73	33	80		
C10	0,5	85	4	80	9	78	20	88		
C12	0,9	82	7	78	15	75	35	85		
C14	0,8	87	6	84	14	83	31	92		
C16	1,5	84	12	82	28	81	62	90		
C18	0,5	90	4	79	10	80	22	88		

Percentual de recuperação = $\frac{(\text{concentração medida}) - (\text{concentração endógena})}{\text{concentração máxima}} \times 100$

Tabela 3. Imprecisão total.

	Medido μM	%CV	Medido μM	%CV	Medido μM	%CV	Medido μM	%CV	Medido μM	%CV
ALA	567,1	8	604,1	9	709,9	8	1104,2	7		
ARG	30	7	51,1	7	135,6	6	476,8	7		
CIT	29,1	11	39,7	10	81,6	8	243,9	9		
GLY	327,1	10	359	9	463,1	8	867	9		
LEU	185,6	7	201,2	7	251,8	6	447,1	6		
MET	27,2	7	33,5	8	57	7	152,3	7		
SA	0,8	25	1,7	21	5,4	12	20,5	10		
ORN	127,2	7	152,5	7	254,6	6	637,2	7		
PHE	84,7	7	102,2	8	166,3	7	419,5	8		
PRO	275,5	9	304,4	9	398,9	6	763,4	9		
TYR	83,8	8	104,1	7	182	7	482,8	7		
VAL	206,2	8	222,9	8	278,6	7	489,2	8		
C0	51	7	67,9	7	134,9	8	390	6		
C2	36,4	7	42	8	60,8	7	134,6	7		
C3	3,3	9	4	11	6,3	8	15,3	9		
C4	0,3	11	0,7	10	2,2	8	8,3	10		
C5	0,3	11	0,6	10	2	7	7,4	7		
C5DC	0,2	13	0,4	12	1,2	10	4,2	8		
C6	0,1	12	0,5	10	2	8	7,7	8		
C8	0,1	13	0,4	9	1,3	8	5	7		
C10	0,1	12	0,3	10	0,9	9	3,3	7		
C12	0,1	10	0,4	8	1,5	7	6	7		
C14	0,2	10	0,4	8	1,4	7	5,3	7		
C16	2,2	8	2,7	7	4,6	6	12,2	8		
C18	2,1	7	2,3	6	2,9	6	5,5	10		

%CV total inclui: imprecisão dentro do ciclo, entre o ciclo –dentro do dia, e entre os dias.

Outras modalidades estão dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar uma cetona biologicamente ativa, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 contatar uma amostra com uma solução de extração compreendendo metanol e uma base forte;
 derivatizar uma cetona biologicamente ativa na amostra; e
 avaliar a cetona biologicamente ativa derivatizada na amostra derivatizada usando espectrometria de massa tandem,
 em que a cetona biologicamente ativa é succinilacetona ou um
10 esteroide.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a base forte é hidrazina.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a solução de extração compreende pelo menos 5% de
15 água.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a solução de extração compreende menos de 85% de metanol.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
20 4, caracterizado pelo fato de que a cetona biologicamente ativa é derivatizada com hidrazina ou hidrazina derivatizada.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a cetona biologicamente ativa é succinilacetona, em que a etapa de avaliação inclui a análise da
25 succinilacetona derivatizada, juntamente com um ou mais analitos adicionais da injeção da amostra em um espectrômetro de massa tandem, e ainda em que os um ou mais analitos adicionais são selecionados de aminoácidos, carnitina livre ou acilcarnitinas.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo
30 fato de que a succinilacetona derivatizada na amostra compreende succinilacetona derivatizada para o ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propionico (MPP).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda avaliar a amostra para um ou mais analitos adicionais, preferivelmente em que o um ou mais analitos adicionais são avaliados com MPP na mesma injeção da amostra.

5 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda determinar se um indivíduo de quem a amostra foi derivada tem, ou está em risco de desenvolver, tirosinemia hereditária tipo 1, com base na detecção de succinilacetona na amostra.

10 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizado pelo fato de que a succinilacetona derivatizada compreende pelo menos um isótopo de átomo pesado é incluída na amostra antes da análise de espectrometria de massa;

15 11. Método para extração, caracterizado pelo fato de que compreende:

 contatar uma amostra com uma solução de extração, a solução de extração compreendendo metanol e uma base forte, em que o contato da amostra com a solução de extração produz um extrato compreendendo

20 (i) succinilacetona derivatizada,
 (ii) um ou mais aminoácidos,
 (iii) carnitina livre,
 (iv) uma ou mais acilcarnitinas ou
 (v) uma forma derivatizada de (ii), (iii), ou (iv) da amostra, em que a concentração da succinilacetona derivatizada no extrato reflete a
25 concentração de succinilacetona na amostra, e em que as concentrações de um ou mais aminoácidos, carnitina livre, uma ou mais acilcarnitinas, ou formas derivatizadas dos mesmos no extrato refletem suas respectivas concentrações na amostra.

30 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda após contatar a amostra com a solução de extração, analisar a amostra usando espectrometria de massa tandem.

 13. Método de acordo com a reivindicação 11 ou 12,

caracterizado pelo fato de que o contato derivatiza pelo menos uma molécula de succinilacetona para o ácido 3-(5-metil-1H-pirazol-3-il)propriônico (MPP).

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que a amostra é uma amostra de sangue seco.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que a solução de extração compreende ainda um ácido orgânico, preferivelmente em que o ácido orgânico é ácido oxálico.

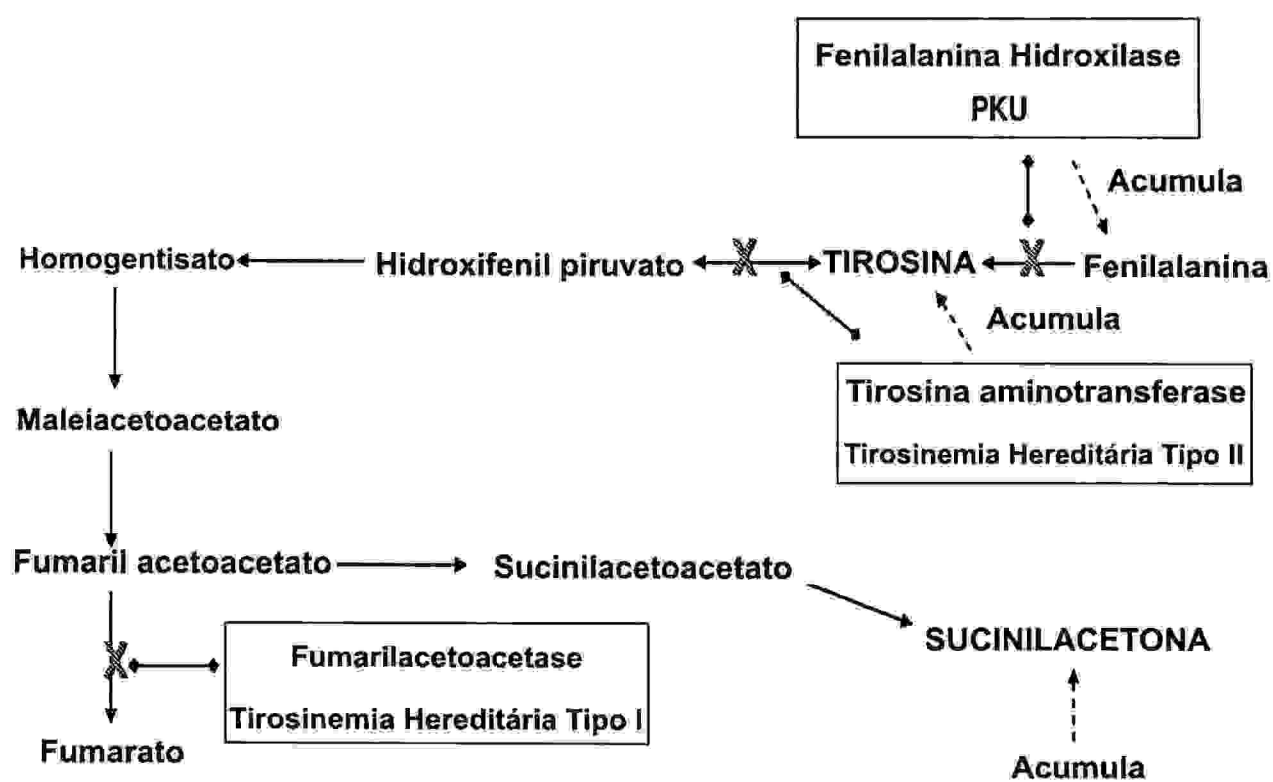


FIG. 1

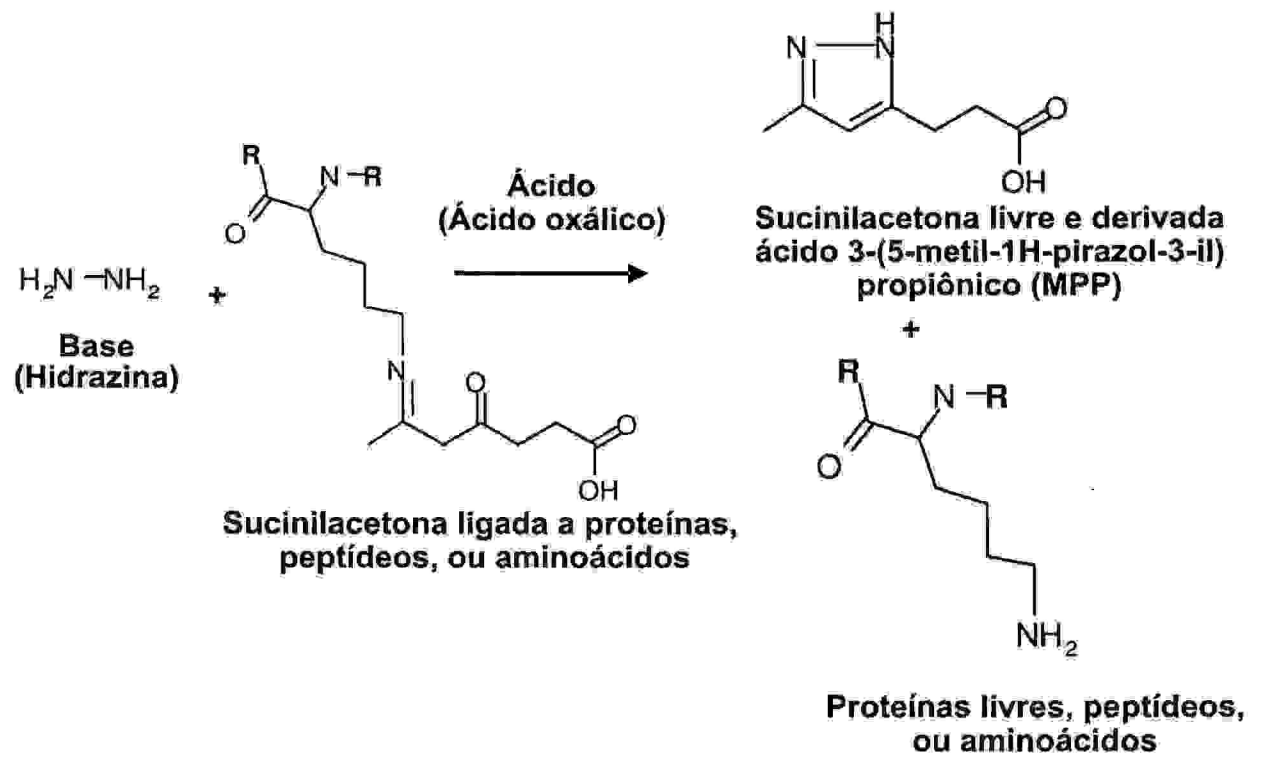


FIG. 2

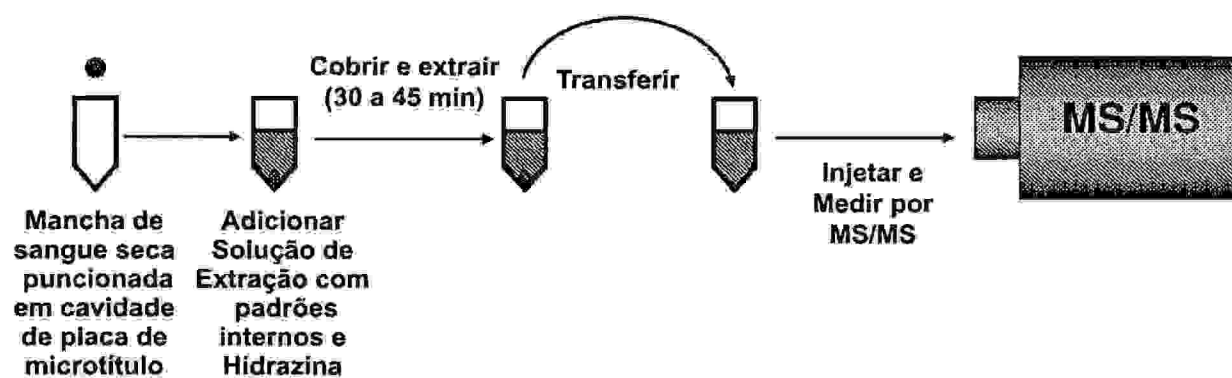


FIG. 3

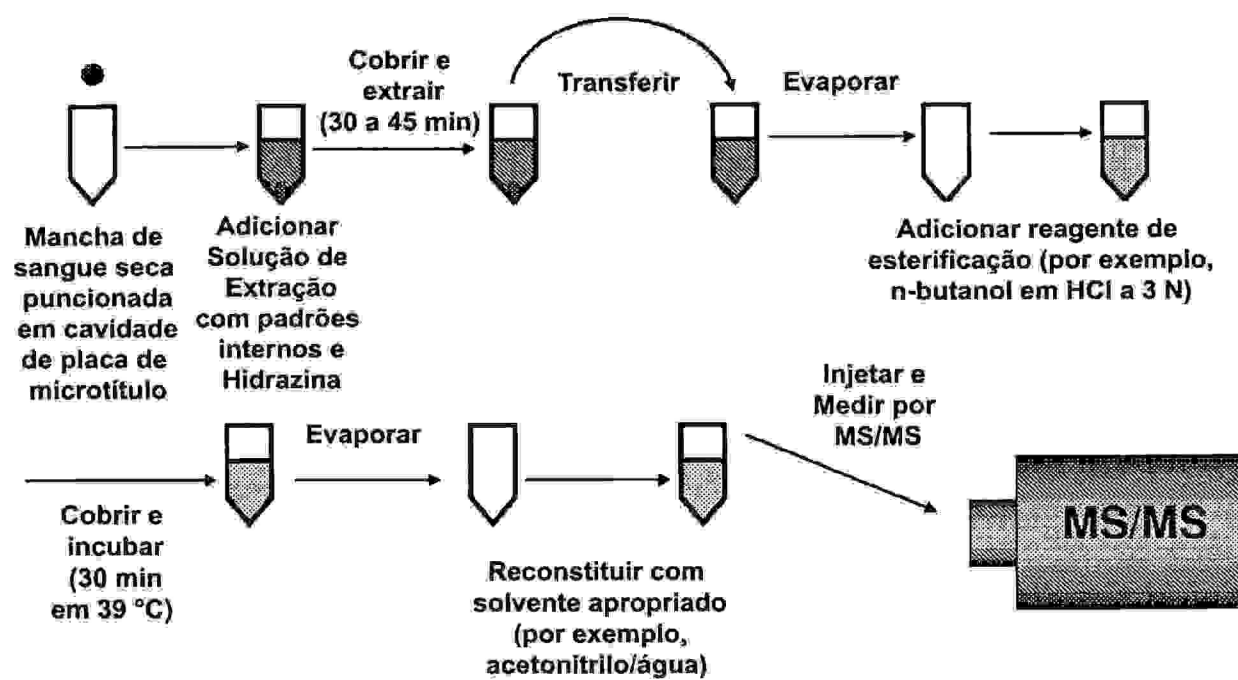


FIG. 4

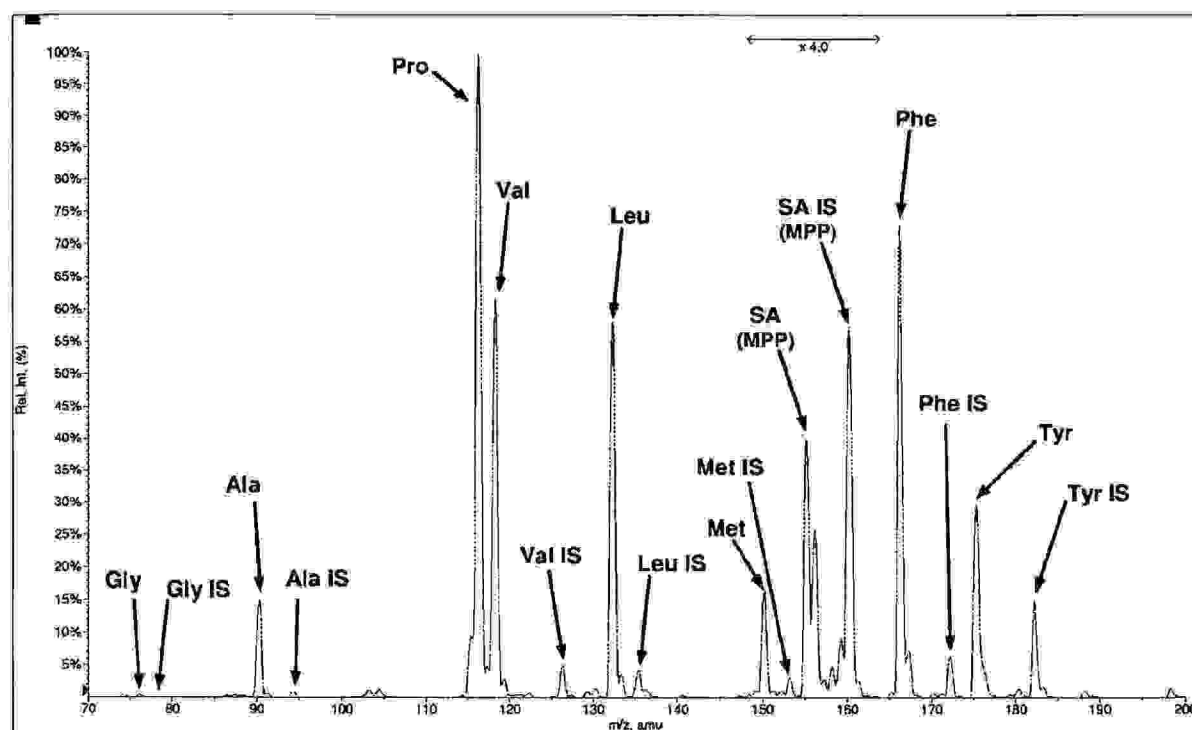


FIG. 5

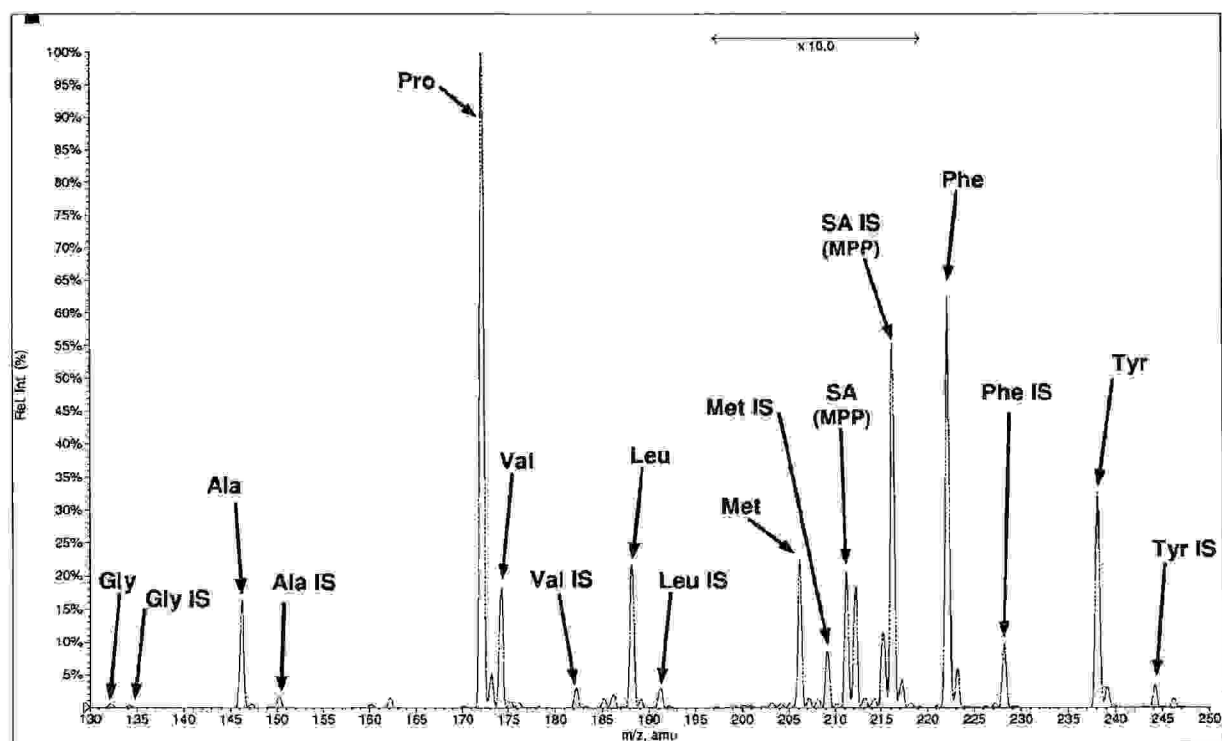


FIG. 6

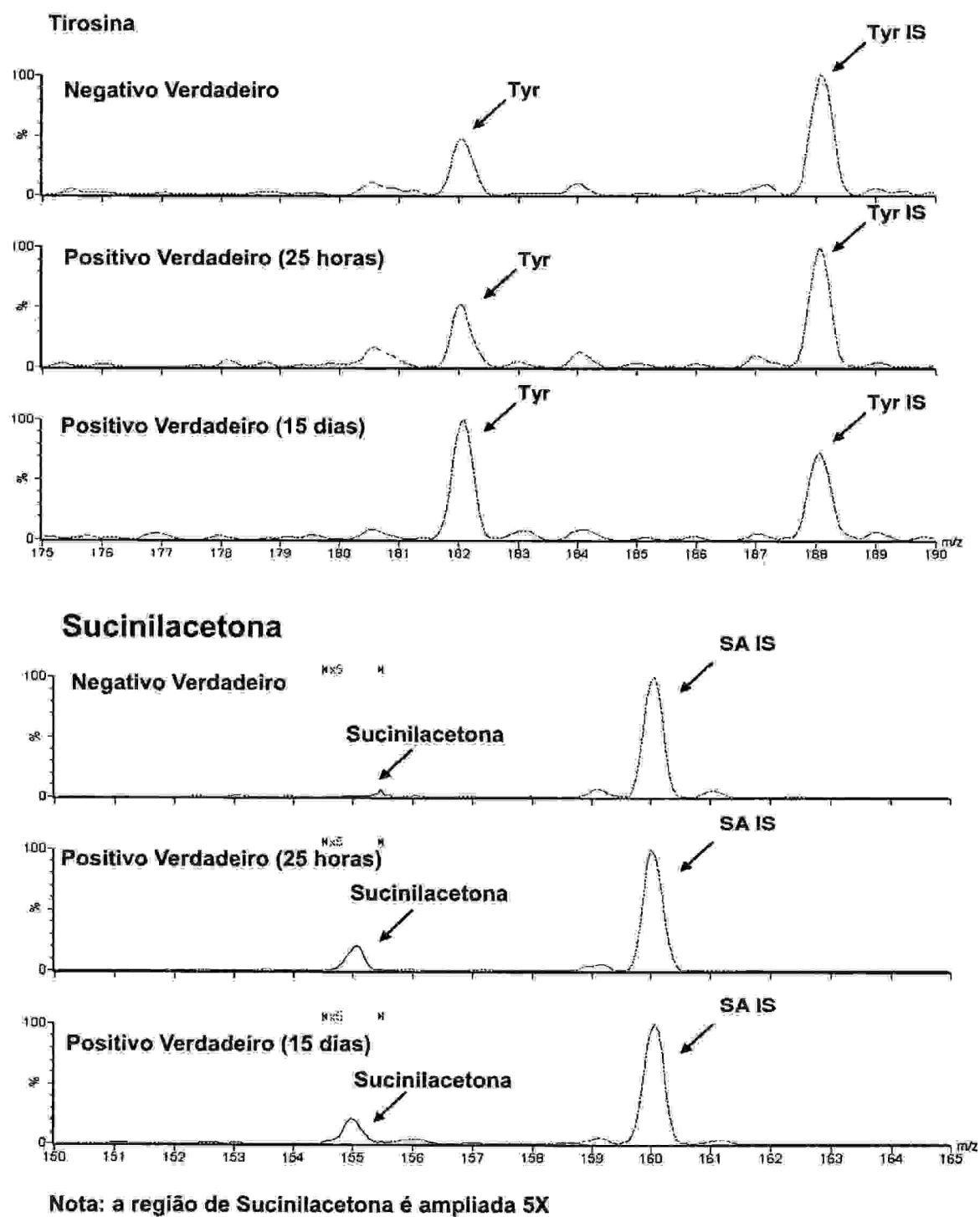
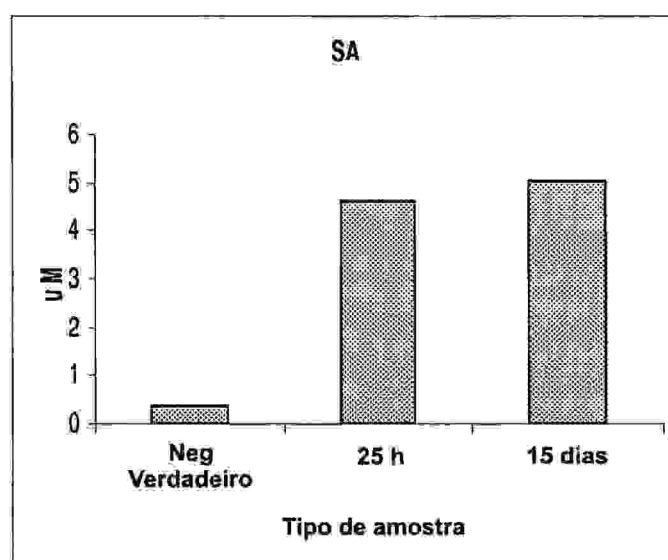
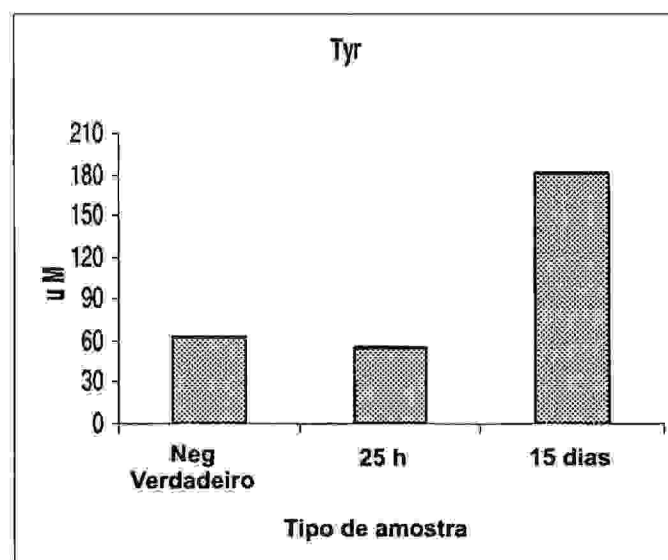


FIG. 7

Categoria	SA	TYR
Cortes	2*	575
Concentração média negativa verdadeira (TN)	0.51	93.67
Negativo verdadeiro SD	0.13	25.33
Negativo verdadeiro %CV	25%	27%
Amostra 1 – réplica 1 concentração, uM	4.42	65.89
Amostra 1 – réplica 1. SDs longes de média de TN	30.36	-1.09
Amostra 2 – concentração, uM	5.73	232.31
Amostra 2 – SDs longes de média de TN	40.55	5.48

A**B****FIG. 8**

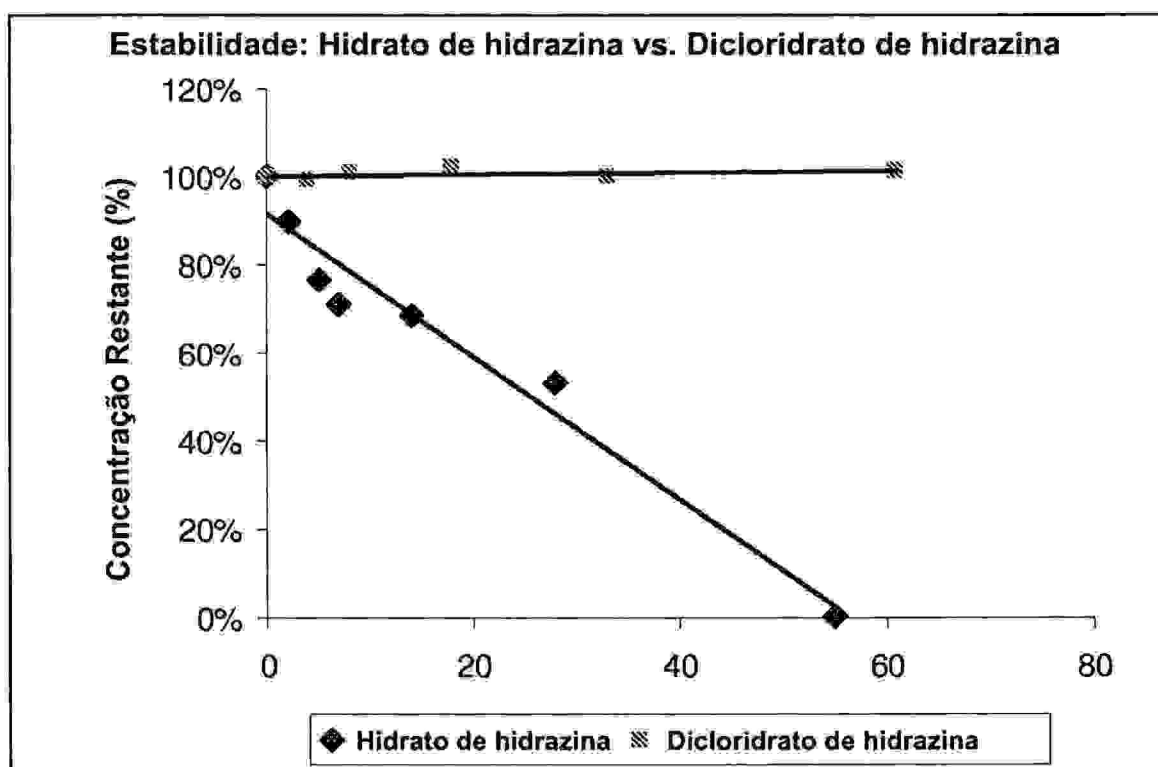


FIG. 9