(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 218**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04026164 .6**
(96) Fecha de presentación : **04.11.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1666884**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54) Título: **Método para la determinación de arginina, argininas metiladas y sus derivados.**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.01.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.01.2010

(73) Titular/es: **GermedIQ Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH**
Konig-Heinrich-Weg 48
22459 Hamburg, DE

(72) Inventor/es: **Böger, Rainer;**
Schwedhelm, Edzard;
Maas, Renke y
Riederer, Ulrich

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, José Antonio**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

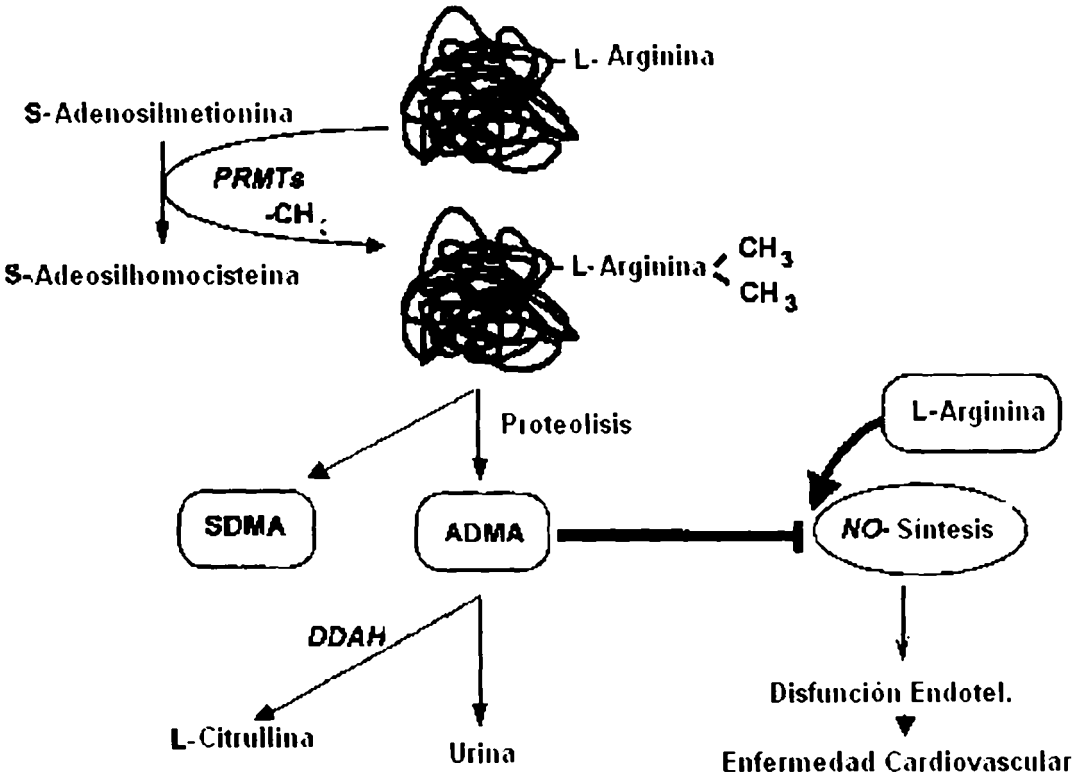
Método para la determinación de arginina, argininas metiladas y sus derivados.

La presente invención está en el campo de los métodos de ensayo y, en particular, métodos de ensayo para arginina y derivados de la misma.

La arginina (ARG) y derivados metilados de ella juegan un papel importante para la concentración biológica disponible del óxido nítrico (NO).

NO es esencial en varios procesos fisiológicos, es decir, en la homeostasis del sistema cardiovascular, defensa del huésped, señalización neuronal, migración celular y apoptosis. NO se forma en el endotelio por la isoforma constitutiva, endotelial de la sintasa de óxido nítrico utilizando ARG como sustrato. Las tres isoformas de la sintasa de óxido nítrico en humanos se ven inhibidas por el inhibidor endógeno monometil arginina (MMA) y dimetil arginina asimétrica (ADMA) con ADMA siendo más importante que MMA debido a que tiene hasta diez veces mayor concentración en el plasma humano. ADMA y MMA se originan de la metilación de arginina de proteínas por metiltransferasas de arginina de proteínas (PRMTs) después de la degradación de proteínas. De esta manera, también se produce la dimetilarginina simétrica (SDMA), la que no ejerce actividad biológica, sin embargo. Aproximadamente una quinta parte de la ADMA se excreta renalmente en el hombre mientras que la degradación enzimática por dimetilaminohidrolasa de dimetilarginina (DDAH) es la principal vía de eliminación de ADMA.

Un breve esquema, se indica a continuación



El desequilibrio del suministro y la exigencia de NO puede ser el paso inicial para cambios patológicos. Las pruebas acumuladas vinculan dicho desequilibrio de homeostasis a ADMA. Hasta la fecha, se ha mostrado que el ADMA circulante está alterado en pacientes que sufren de enfermedades cardiovasculares y neurológicas, así como de disfunción eréctil. Concentraciones plasmáticas elevadas de ADMA se encuentran en distintos entornos clínicos que van desde la insuficiencia renal a la aterosclerosis, hipertensión, diabetes, preclampsia, enfermedad de Alzheimer e incluso depresión o esquizofrenia.

Además, en pacientes con enfermedades cardiovasculares o renales elevadas concentraciones de plasma ADMA predicen independientemente progresión de aterosclerosis y mortalidad. Hasta ahora, la causalidad de las enfermedades cardiovasculares es considerada posible pero no probada definitivamente: La infusión de ADMA mejora la vasodilatación endotelio-dependiente en humanos.

El hecho de que la vida ha desarrollado un mecanismo enzimático altamente específico para la degradación de ADMA proporciona mayor evidencia de un papel directa (patóo-) fisiológico de ADMA. Por lo tanto, es importante seguir examinando el papel de ADMA, que requiere un método analítico capaz de un flujo alto de muestras.

En el estado de la técnica, han sido descritos métodos para la determinación de ADMA, SDMA y ARG como espectrofotometría, electroforesis capilar (CE) y ensayos basados en ELISA, HPLC, MS y tándem-MS.

Los actuales métodos analíticos para la medición de ADMA se centran en el uso de HPLC-MS o HPLC-MS/MS. Por ejemplo, Martens Lobenhoffer *et al*. (Martens Lobenhoffer J, Bode-Böger SM., J Chromatogr B analítica Technol Biomed Life Sci, 2003 Dec. 251; 798(2), 231-39) usaron derivados de o-ftaldialdehído (OFA) - 2-mercaptoetanol de ADMA, SDMA y ARG para mejorar la separación cromatográfica de los analitos. Esto era fundamental ya que los analitos sufren similares disociaciones que conducen a espectros tándem-MS muy similares. de forma que este método más específico no podía utilizarse. En su lugar, Martens-Lobenhoferet *et al* usaron MS en el modo de escáner completo de espectrometría de masa simple. El tiempo total del análisis fue de más de 32 minutos, que es demasiado largo para análisis de alto flujo o de cribado. Otra desventaja del método aplicado por Martens-Lobenhofer *et al*. es la escasa estabilidad de los derivados OPA de los analitos, que por lo tanto tienen que ser analizados on-line.

Vishwanathan *et al*. (Vishwanathan K, Tacket RL, Stewart JT, Bartlett MG; J Chromatogr B Biomed Sci. Appl., 2000 Oct 1; 748 (1), 157-66) omite el paso de derivación y analizaron los aminoácidos libres no derivados. Separaron los aminoácidos mediante HPLC utilizando una columna de sílice. Aunque eran capaces de utilizar el tándem-MS, Vishwanathan *et al*. encontraron que ADMA y SDMA muestran unos espectros MS-MS muy similares debido a sus reacciones de disociación muy similares. Por ejemplo, el m/z de 158 usado para la cuantificación de ADMA (203→158) también se observó para SMDA, ARG y MMA con intensidades relativas del 20%, 10% y 20%, respectivamente. Teniendo en cuenta que estos analitos son endógenos y que la concentración de SDMA es similar a la de ADMA y la de ARG hasta diez veces superior que la de ADMA, una grave perturbación de la cuantificación de ADMA en m/z 158 se producirá si se analizan los analitos simultáneamente. Por lo tanto, la trabajosa separación cromatográfica era esencial para el método aplicado por Vishwanathan *et al*. Una desventaja adicional de este método son las dificultades para lograr la separación de los isómeros posicionales ADMA y SDMA. El tiempo de análisis total es entre 15 y 20 minutos, que es muy rápido para análisis rápidos de rutina.

Huang *et al*. (Huang LF, Guo FQ, YZ Liang, Li BY, Cheng BM; Bioanal Anal Chem, 2004 Sep. 24; epub adelantada a impresión) también omitió el paso de derivación para acelerar el proceso analítico. Utilizaron LC-MS para analizar los analitos como aminoácidos libres. Se hizo una separación cromatográfica mediante una columna RP18, y de nuevo fue crucial, ya que ADMA y SDMA mostraron similares espectros de masas. El total de tiempo de análisis fue de más de 7 minutos, que sin embargo todavía no es adecuado para los análisis de rutina. Por otra parte, en una muestra de plasma analizada por el Huang *et al*., no pudo lograrse una separación de línea de base como puede verse en la fig. 3 del presente documento. Esto da lugar a una incorrecta cuantificación. Además, la separación isocrática aplicada dará lugar a la acumulación de matriz de muestra en la columna en caso de métodos de análisis de alto flujo.

De acuerdo con el estado de la técnica, una detección simultánea no parece ser posible y la separación cromatográfica parece ser crucial para determinar claramente la concentración de estos analitos. Aunque el paso de derivación se omite, tiempo de análisis es aún largo para llevar a cabo experimentos de detección. En resumen, en el estado del arte no se describe ningún método adecuado de análisis de alto rendimiento. Esto limita la mejora de investigación de ADMA,y por lo tanto limita el progreso médico y farmacéutico.

Es objeto de la invención superar las limitaciones del estado de la técnica y desarrollar una metodología para detectar ARG y sus derivados (por ejemplo: MMA, ADMA y SDMA), con una mayor sensibilidad, especificidad y con un mayor rendimiento.

Antes de que la presente invención se describa con mayor detenimiento, se entiende que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares descritas ya que las mismas, por supuesto, varían. También debe entenderse que la terminología utilizada aquí es solamente a efectos de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención será limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

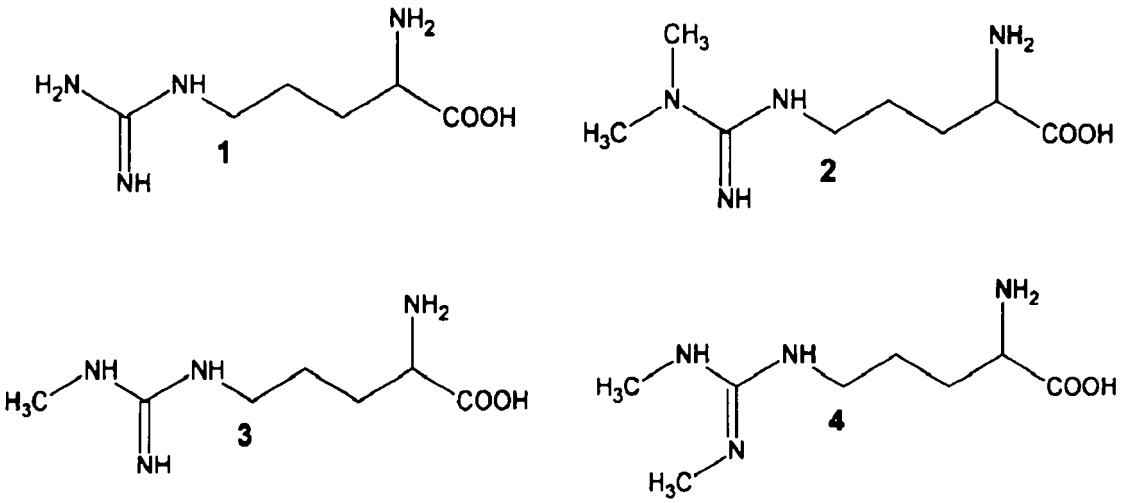
Los métodos de la invención pueden ser cualitativos o cuantitativos. Así pues, tal como se utiliza en este documento, el término "detección" se refiere tanto a las determinaciones cualitativas como cuantitativas, y por lo tanto, incluye "medir" y "determinar un nivel". Una "muestra" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo y pueden ser utilizadas en un sentido diagnóstico o de control. La definición abarca sangre, muestras de derivados de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos, como una muestra de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de ellos y la progenie de ellos. Eso también incluye muestras que han sido manipulados de cualquier forma después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento de determinados componentes. Abarca muestras clínicas y también células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, tejido líquido, muestras de tejido fluido biológico, y compuestos y productos dietéticos.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor interviniente está incluido dentro de la invención, así como los límites superior e inferior. Cuando el rango declarado incluya productos de uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Cabe señalar que, tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “y”, y “el” incluyen referencia plural y viceversa, salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

Las publicaciones que se discuten aquí se proporcionan únicamente para su descripción anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada aquí debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior.

La presente invención proporciona métodos de detección de uno o más analitos del grupo formado de arginina, sus derivados monometilados, sus derivados dimetilados y sus otros derivados, en muestras biológicas, en particular en muestras que pueden contener ARG, ADMA, SDMA y MMA. Las estructuras de RG, ADMA, SDMA y MMA se muestran a continuación.



1: Arginina, 2: ADMA, 3: MMA, 4: SDMA

Los métodos generalmente implican derivación y detección. El objeto de la presente invención se consigue mediante el hecho de que los derivados obtenidos de los analitos permiten la detección simultánea espectroscópica de masa, preferiblemente detección espectroscópica de masas en tándem. La detección simultánea espectroscópica de masa permite omitir o al menos claramente acortar el trabajo de paso de la separación cromatográfica anterior a la detección y, por tanto, acelerar el proceso analítico. Como se ha descrito anteriormente, el estado del arte, obviamente, intentó acortar tiempo al omitir el análisis del paso de derivación. En contraste con esto, la presente invención vuelve a este procedimiento antiguo y sorprendentemente logra los objetos al hacerlo.

Tal como fue citado en el estado de la técnica por Martens-Lobenhoffer *et al*. y Vishwanathan *et al*. ADMA SDMA muestran un patrón muy similar de fragmentación en MS, especialmente en tándem-MS de forma que que el uso de este sumamente específico y sensible método para la detección simultánea de los dos analitos se encontró no adecuada y la separación cromatográfica de los analitos se convirtió en crucial y debía aplicarse antes de la detección. La presente invención consigue los objetivos de la invención por derivación de los analitos de forma que los analitos derivados muestran un patrón diferente de fragmentación, con inequívocas y características señales de masa que no son perturbadas por las señales procedentes de los otros analitos. Por lo tanto, ya no existe la necesidad de una profunda separación cromatográfica, en su lugar los analitos derivados pueden ser detectados distintivamente simultáneamente. Por lo tanto, los Estados miembros y todas las técnicas de combinación de MS, por ejemplo, tándem-MS, trampa de iones-MS, MS-TOFLMS o técnicas adicionales MS^n son aplicables en el ámbito de esta invención.

Es especialmente útil, si cada ión madre de los analitos derivados generados en el proceso de análisis es fragmentado por lo menos una segunda vez difiriendo los espectros resultantes de los espectros de otros iones madre. Así, es posible un análisis muy específico ya que los iones hijos de un ión madre son diferentes de los iones hijos de otro ión madre. Por lo tanto, la detección utiliza el modelo típico de fragmentación de cada ión madre o si es necesario de cada ión hijo. Esto cualifica el método de la invención para ser utilizado en combinación con cualquier MS, por ejemplo, tándem-MS, trampa de iones-MS, MS-TOFLMS o técnicas adicionales MS^n.

Aunque uno puede desear aplicar separación cromatográfica, en algunos casos, para excluir a la matriz biológica de entrar en el detector, no es indispensablemente necesario. En las realizaciones de la invención, donde se proporciona una etapa de separación, se utiliza preferentemente para la separación de los analitos derivados de la matriz biológica, preferiblemente mediante HPLC o CE y no los propios analitos. Una clara separación de la línea de base de los analitos derivados no es esencial, de modo que incluso en estas realizaciones, el proceso de análisis procede más rápido que el descrito en el estado de la técnica.

La derivación de acuerdo con la invención comprende la derivación de la función ácido carboxílico de los analitos, de preferencia mediante esterificación de ácido o por amidación. Para la esterificación, puede ser utilizado cualquier alcohol adecuado, especialmente alquil alcoholes lineales o ramificados, sustituidos o no, olefínicos, aromáticos o fenoles o alcoholes orgánicos. Para la amidación, pueden usarse todos los reactivos adecuados conocidos por un experto en la materia. Preferiblemente, puede usarse un compuesto de nitrógeno adecuado, preferentemente NR3 siendo R hidrógeno o cualquier hidrocarburo, mientras que cada R puede diferir de los demás. Especialmente el uso de dietilamina resultó ser muy útil. La derivación en esta función de los analitos da como resultado sorprendentemente un patrón de fragmentación distinguible de los analitos. Ventajosamente, la derivación de esta función es fácil de manejar y resultan derivados estables. Esta es una importante diferencia con el estado de la técnica con la bien establecida OPA en la función amino de los aminoácidos. Cualquier otra derivación que conduzca a derivados que tengan diferentes patrones de fragmentación de iones madre o hija está dentro del ámbito de esta invención.

En una realización de la invención se provee que la derivación se lleve a cabo en cualquier forma automatizada conocida por una persona experta en la materia. Aunque esto se traducirá en costes adicionales para proporcionar los aparatos de análisis, una aceleración adicional del proceso analítico total puede ventajosamente ser conseguida por esta característica.

Dependiendo de la naturaleza de las muestras, en algunas realizaciones de la invención, se proporciona una preparación de la muestra, de preferencia consistente en una precipitación de proteínas, en particular, una precipitación de disolvente que es fácil de manejar y no altera la detección de MS, especialmente tándem-MS. Preferiblemente, esta etapa opcional es automatizada. La automatización puede lograrse mediante el uso de cualquier método conocido por el experto en la materia.

Ventajosamente, los métodos divulgados en la presente invención podrán hacer uso de un amplio espectro de técnicas de ionización para cada etapa de detección. Estas técnicas comprenden ESI, APCI u otras técnicas apropiadas conocidas por un experto en la materia. Por lo tanto, el método divulgado está disponible fácilmente para muchos laboratorios o investigadores, debido a el hecho de que muchos laboratorios ya poseen tales técnicas de ionización como ESI.

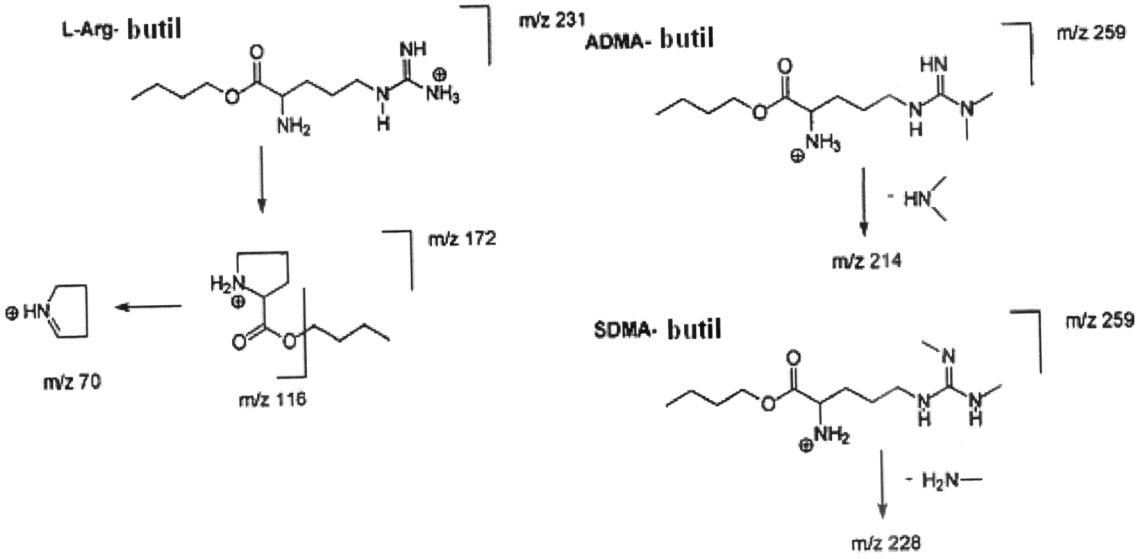
Por razón de gestión de calidad y control, se proporciona una calibración haciendo uso de un estándar interno y/o los estándares etiquetados. Los últimos son de preferencia isótopos estables, por ejemplo, ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{17}O, ^{18}O, o cualquier otro isótopo estable conocido por el experto en la materia. Ventajosamente, el método aplica las estándares internos para la cuantificación y los utiliza para calcular la relación de cualquier analito a cualquier otro analito, preferentemente la proporción ADMA respecto a SDMA, la relación L-ADMA respecto a L-arginina, y relaciones recíprocas. Por lo tanto, se utilizan los propios analitos en una forma deuterada ya que una separación cromatográfica no es necesario. De este modo, se simplifica el proceso de calibración y es de fácil manejo.

Ejemplo 1

Las muestras de plasma humano, la orina y las células sobrenadantes fueron analizadas cuantitativamente. Una muestra de 50 μL se diluyó con L-[$^{2}H_{7}$]-arginina y [$^{2}H_{6}$]-ADMA a concentraciones de 50 y 2 μmol/l, respectivamente, seguido de posterior precipitación de proteínas con 100 μL de acetona. El sobrenadante se secó y se integró en 100 μL de una solución 1 M de ácido clorhídrico en butanol. Se realizó derivación durante 17 min a 65ºC. Después de la evaporación se reconstituyeron las muestras en 1 mL de agua.

Se llevó a cabo la separación cromatográfica en una columna analítica [50 X 2,0 mm (i.d.)] lleno de Polaris C_{18}-Éter 3 μ. La columna se mantuvo a 25ºC. La fase móvil consistió en metanol (0,1% ácido fórmico, fase A) y agua (0,1% ácido fórmico, fase B). Un gradiente se bombea a un caudal de 0,4 ml/min recomenzando con un 2% de A para 0,5 minutos seguido de un aumento lineal a 50% de A durante 1,5 min y equilibración subsiguiente a un 2% de A durante 2 min. Los tiempos de retención se pueden tomar de la fig. 1. Todos los analitos eluaron en un plazo de aproximadamente 1 minuto comenzando desde t = 0,8 minutos de forma que todo el proceso de separación cromatográfica necesita no más de unos 2 minutos. Es fácilmente alcanzable una reducción del tiempo de retención, lo que resulta en un muy rápido proceso de análisis.

Se realizaron análisis MS LC-tandem en un Varian 1200L triple cuadripolar MS. El gas principal, el gas de secado (380ºC), y el gas de nebulización (N2) se bombearon a 80, 24 y 60 psi, respectivamente. Para ionización en el modo de ionización ESI + la aguja y el escudo de tensión se fijaron en 5800 y 400 voltios, respectivamente. El argón se utilizó para fragmentación MS/MS a una presión celular de colisión de 1,5 mTorr. Se analizaron las siguientes transiciones: relación masa-a-carga (m/z) 231→ m/z 70 →(energía de colisión (CE) -22 voltios) para L-arginina; m/z 238→ m/z 77 (CE -24 voltios) para L-[$^{2}H_{7}$]-arginina (pureza isotópica 98 atom% ^{2}H); m/z 259→ m/z 214 (CE -16 voltios) para ADMA, m/z 259→ m/z 228 (CE -14 voltios) para SDMA, y m/z 265→ m/z 220 (CE -16 voltios) para [$^{2}H_{6}$]-ADMA (pureza isotópica 98 atom% ^{2}H). Todos los compuestos se analizaron como sus derivados éster butilo. Un breve esquema de la posible fragmentación de ARG, ADMA y SDMA figura a continuación.



Sin ánimo de ser obligado por la teoría, se cree que la molestia de la formación de un complejo intermedio intramolecular por la naturaleza de derivación es crucial para la invención.

La Fig. 1a-b da ejemplos de un cromatograma LC-MS/MS de una muestra de plasma humano y un cromatograma LC-MS/MS de una muestra de sobrenadante de cultivo celular de acuerdo al ejemplo 1. De arriba a abajo de cada diagrama, se muestran los analitos arginina, [$^2H_7$]-arginina como estándar interno, ADMA, SDMA y [$^2H_6$]-ADMA como estándar interno. Puede claramente observarse que las argininas metilado eluyen al mismo tiempo y por lo tanto tienen que ser y son analizadas de manera simultánea.

Por razones de calibración, las soluciones de L-arginina sintética y ADMA_ se utilizaron en el rango 0-100 μmol/l para L-arginina y 0-4 μmol/L para ADMA. Se agregaron L-[$^2H_7$]-arginina y [$^2H_6$]-ADMA como estándares internos a concentraciones de 50 y 2 μmol/l, respectivamente. Las ecuaciones de regresión lineal para la relación de área de pico (y) y la proporción de calibradores inyectados (x) fueron: y = 0,93 x + 0,018 (r^2 = 0,999) para L-arginina e y = 0,93 x + 0,017 (r^2 = 0,999) para ADMA. Los ratios de área de pico obtenidos fueron corregidos para los distintos factores de respuesta para los compuestos etiquetados y no etiquetados obtenidos.

Se llevó a cabo una validación del método para la determinación cuantitativa de L-arginina y ADMA en plasma humano y de ratón, así como sobrenadantes de cultivo celular mediante la adición de L-arginina y ADMA en duplicado a las muestras. L-arginina se añadió a 0, 12.5, 25, 50 y 100 μmol/L. ADMA se agregó a los 0, 0,5, 1, 2 y 4 μmol/L. El análisis de regresión lineal entre (y) medida y concentración de L-arginina añadida (x) dió una pendiente de 1,09 y un corte con el eje x de 26,2 μmol/L, con r^2 = 0,996 para plasma humano. Ecuaciones similares se obtuvieron para plasma de ratón y cultivo de células sobrenadantes (células endoteliales de arteria coronaria humana). El análisis de regresión lineal entre (y) medida y concentración de ADMA añadida (x) dió una pendiente de 1,03 y un corte con el eje x de 0,39 μmol/L, con r^2 = 0,999 para plasma humano. Ecuaciones similares se obtuvieron para plasma de ratón y sobrenadantes de cultivo celular.

Se probó el límite de detección del método para ADMA. Pudo mostrarse, que el ratio señal-ruido observado para 0,05 pg/μL de ADMA fue 16: 1 mientras que 0,01 pg/μL ADMA como la más baja concentración aplicada no era detectable.

Ejemplo 2

La misma metodología se aplica como se indica para el ejemplo 1, incluyendo las siguientes modificaciones: las muestras de plasma humano, orina y sobrenadantes de cálulas fueron analizadas cuantitativamente. 50 μL de muestra se diluyeron con L-[$^2H_7$]-arginina y [$^2H_6$]-ADMA a concentraciones de 50 y 2 μmol/l, respectivamente, seguido de posterior precipitación de proteínas con 100 μL de acetona. El sobrenadante se seca y se integra en 100 μL 2M de una solución de ácido clorhídrico en metanol. Se realizó derivación durante 60 min a 80ºC. Después de la evaporación las muestras fueron reconstituidas en 1 ml de agua. Se realizaron análisis MS LC-tandem en un Varian 1200L Triple Cuadripolar MS. El gas principal, el gas de secado (300ºC), y el gas de nebulización (N_2) se bombearon a 80, 24 y 60 psi, respectivamente. Para ionización en el modo de ionización ESI + la aguja y el escudo de tensión se fijaron en 5000 y 400 voltios, respectivamente. El argón se utilizó para fragmentación MS/MS a una presión celular de colisión de 1,5 mTorr. Se analizaron las siguientes transiciones: relación masa-a-carga (m/z) 189→ m/z 70 →(energía de colisión (CE) -22 voltios) para L-arginina; m/z 196→ m/z 77 (energía de colisión (CE) -24 voltios) para L-[$^2H_7$]-arginina; m/z 217→ m/z 172 (CE -16 voltios)para ADMA, m/z 217→ m/z 172 (CE -14 voltios) para SDMA, y m/z 223→ m/z 178 (CE -16 voltios) para [$^2H_6$]-ADMA. Todos los compuestos se analizaron como sus derivados éster metilo.

Ejemplo 3

La misma metodología se aplica como se indica para el ejemplo 1, incluyendo las siguientes modificaciones: las muestras de plasma humano, orina y sobrenadantes de células fueron analizadas cuantitativamente. 50 μL de muestra se diluyeron con L-[$^2H_7$]-arginina y [$^2H_6$]-ADMA a concentraciones de 50 y 2 μmol/l, respectivamente, seguido de posterior precipitación de proteínas con 100 μL de acetona. El sobrenadante se seca y se integra en 100 μL 2M de una solución de ácido clorhídrico en etanol. Se realizó derivación durante 30 min a 65ºC. Después de la evaporación las muestras fueron reconstituidas en 1 ml de agua. Se realizaron análisis MS LC-tandem en un Varian 1200L Triple Cuadripolar MS. El gas principal, el gas de secado (300ºC), y el gas de nebulización (N_2) se bombearon a 80, 24 y 60 psi, respectivamente. Para ionización en el modo de ionización ESI + la aguja y el escudo de tensión se fijaron en 5000 y 400 voltios, respectivamente. El argón se utilizó para fragmentación MS/MS a una presión celular de colisión de 1,5 mTorr. Se analizaron las siguientes transiciones: relación masa-a-carga (m/z) 203→ m/z 70 →(energía de colisión (CE) -22 voltios) para L-arginina; m/z 210→ m/z 77 (energía de colisión (CE) -24 voltios) para L-[$^2H_7$]-arginina; m/z 231→ m/z 186 (CE -16 voltios)para ADMA, m/z 231→ m/z 200 (CE -14 voltios) para SDMA, y m/z 237→ m/z 192 (CE -16 voltios) para [$^2H_6$]-ADMA. Todos los compuestos se analizaron como sus derivados éster etilo.

Ejemplo 4

La misma metodología se aplica como se indica para el ejemplo 1, incluyendo las siguientes modificaciones: las muestras de plasma humano, orina y sobrenadantes de células fueron analizadas cuantitativamente. 50 μL de muestra se diluyeron con L-[$^2H_7$]-arginina y [$^2H_6$]-ADMA a concentraciones de 50 y 2 μmol/l, respectivamente, seguido de posterior precipitación de proteínas con 100 μL de acetona. El sobrenadante se seca y se integra en 100 μL 2M de una solución de ácido clorhídrico en metanol. Se realizó derivación durante 60 min a 80ºC. Después de la evaporación las muestras fueron reconstituidas en 100 μl de dietilamina (base libre). Se realizaron análisis MS LC-tandem en un Varian 1200L Triple Cuadripolar MS. El gas principal, el gas de secado (300ºC), y el gas de nebulización (N_2) se bombearon a 80, 24 y 60 psi, respectivamente. Para ionización en el modo de ionización ESI + la aguja y el escudo de tensión se fijaron en 5000 y 400 voltios, respectivamente. El argón se utilizó para fragmentación MS/MS a una presión celular de colisión de 1,5 mTorr. Se analizaron las siguientes transiciones: relación masa-a-carga (m/z) 241→ m/z 70 →(CE -22 voltios) para L-arginina; m/z 248→ m/z 77 (CE) -24 voltios) para L-[$^2H_7$]-arginina; m/z 269→ m/z 224 (CE -16 voltios)para ADMA, m/z 231→ m/z 200 (CE -14 voltios) para SDMA, y m/z 269→ m/z 238 (CE -16 voltios) para [$^2H_6$]-ADMA.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- **MARTENS-LOBENHOFFER** *et al. J Chromatogr B Analyt Technnol Biomed Life Sci*. 25 December 2003, vol. 798(2), 231-39.
- **VISHWANATHAN** *et al. J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 01 October 2000, vol. 748(1), 157-66.
- **HUANG** *et al. Anal Bioanal Chem*, 24 September 2004.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de uno o más analitos del grupo formado por arginina, su derivado monometilado monometilarginina (MMA), sus derivados demetilados dimetilarginina asimétrica (ADMA) y dimetilarginina simétrica (SDMA) en muestras biológicas que comprende los pasos de derivación y detección de analitos, estando **caracterizado** porque

- los analitos son derivados en su función ácido carboxílico, preferentemente mediante esterificación de ácido, particularmente por medio de metanol, etanol y/o butanol, o por amidación, particularmente por medio de dietilamina;

- los derivados obtenidos de analitos se detectan simultáneamente por detección espectroscópica de masas, preferentemente detección espectroscópica de masas tándem.

2. Método según la reivindicación 1, estando **caracterizado** porque la derivación se lleva a cabo en cualquier forma automatizada.

3. Método según cualquier reivindicación anterior, estando **caracterizado** porque la detección espectrométrica de masas se logra por un sistema MS cuadripolar simple, triple cuadropolar, trampa de iones, resonancia ión ciclotrón, de tiempo de vuelo, o cualquier otro sistema MS adecuado o combinación de los citados sistemas MS.

4. Método según cualquier reivindicación anterior, estando **caracterizado** porque se proporciona un paso de la separación, que preferentemente separa los analitos derivados de una matriz biológica, preferiblemente mediante el uso de HPLC o electroforesis capilar.

5. Método según cualquier reivindicación anterior, estando **caracterizado** porque se proporciona un paso de preparación de la muestra, preferentemente consistente en una precipitación de proteínas, particularmente una precipitación de disolvente, que se lleva a cabo preferentemente de forma automatizada.

6. Método según cualquier reivindicación anterior, estando **caracterizado** porque la detección comprende una técnica de ionización del grupo formado por ESi, APCI, MALDI.

7. Método según cualquier reivindicación anterior, estando **caracterizado** porque se proporciona una calibración haciendo uso de un estándar interno y/o estándar etiquetado y que se utiliza para calcular la relación de cualquier analito a cualquier otro analito, preferentemente la relación de ADMA respecto a SDMA, la relación de L-arginina respecto a ADMA, y relaciones recíprocas.

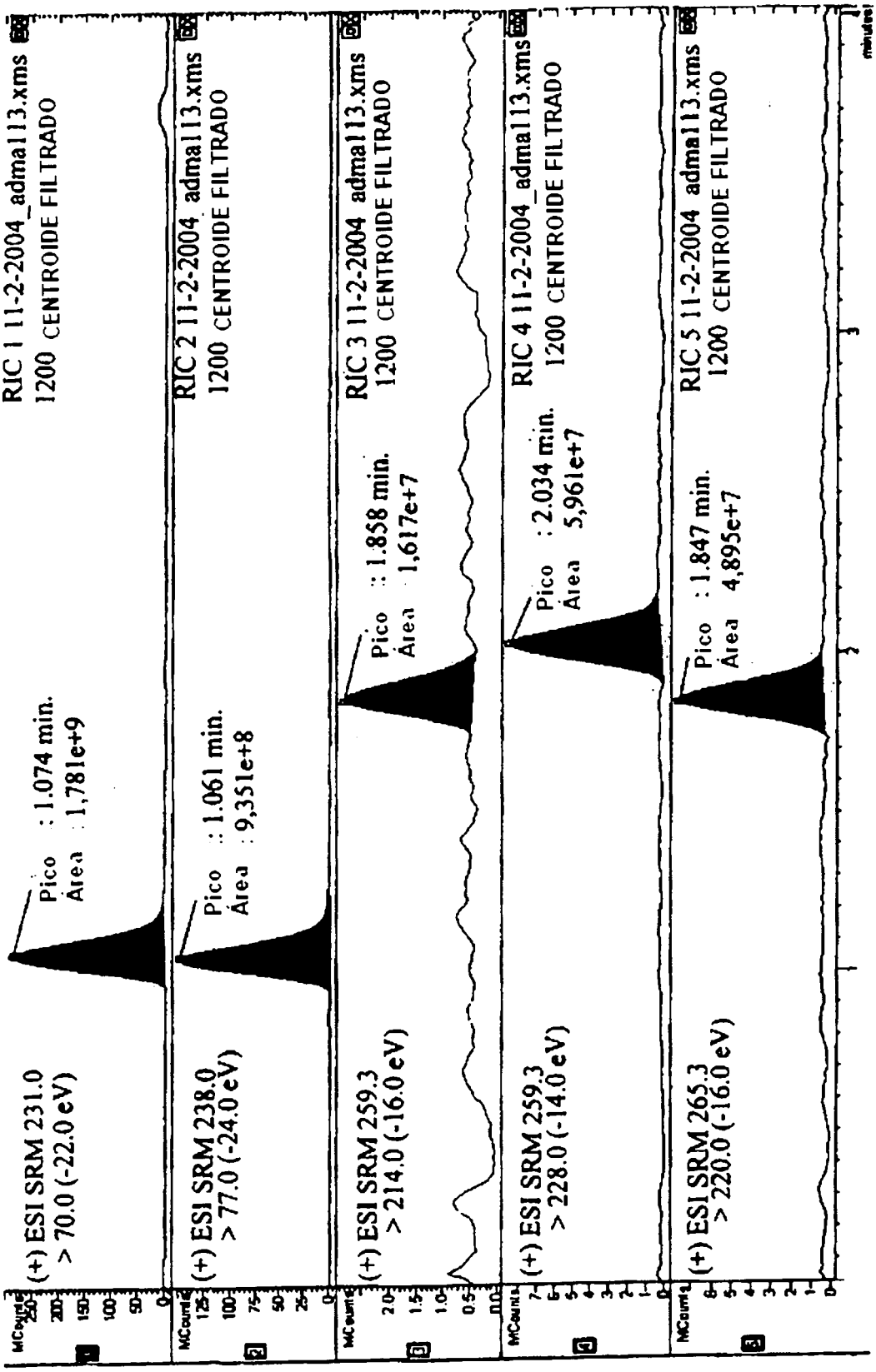

RIC 1 11-2-2004_adma113.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 231.0
> 70.0 (-22.0 eV)
Pico : 1.074 min.
Área : 1,781e+9
RIC 2 11-2-2004_adma113.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 238.0
> 77.0 (-24.0 eV)
Pico : 1.061 min.
Área : 9,351e+8
RIC 3 11-2-2004_adma113.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 259.3
> 214.0 (-16.0 eV)
Pico : 1.858 min.
Área 1,617e+7
RIC 4 11-2-2004_adma113.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 259.3
> 228.0 (-14.0 eV)
Pico : 2.034 min.
Área 5,961e+7
RIC 5 11-2-2004_adma113.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 265.3
> 220.0 (-16.0 eV)
Pico : 1.847 min.
Área 4,895e+7
minutes

fig 1a

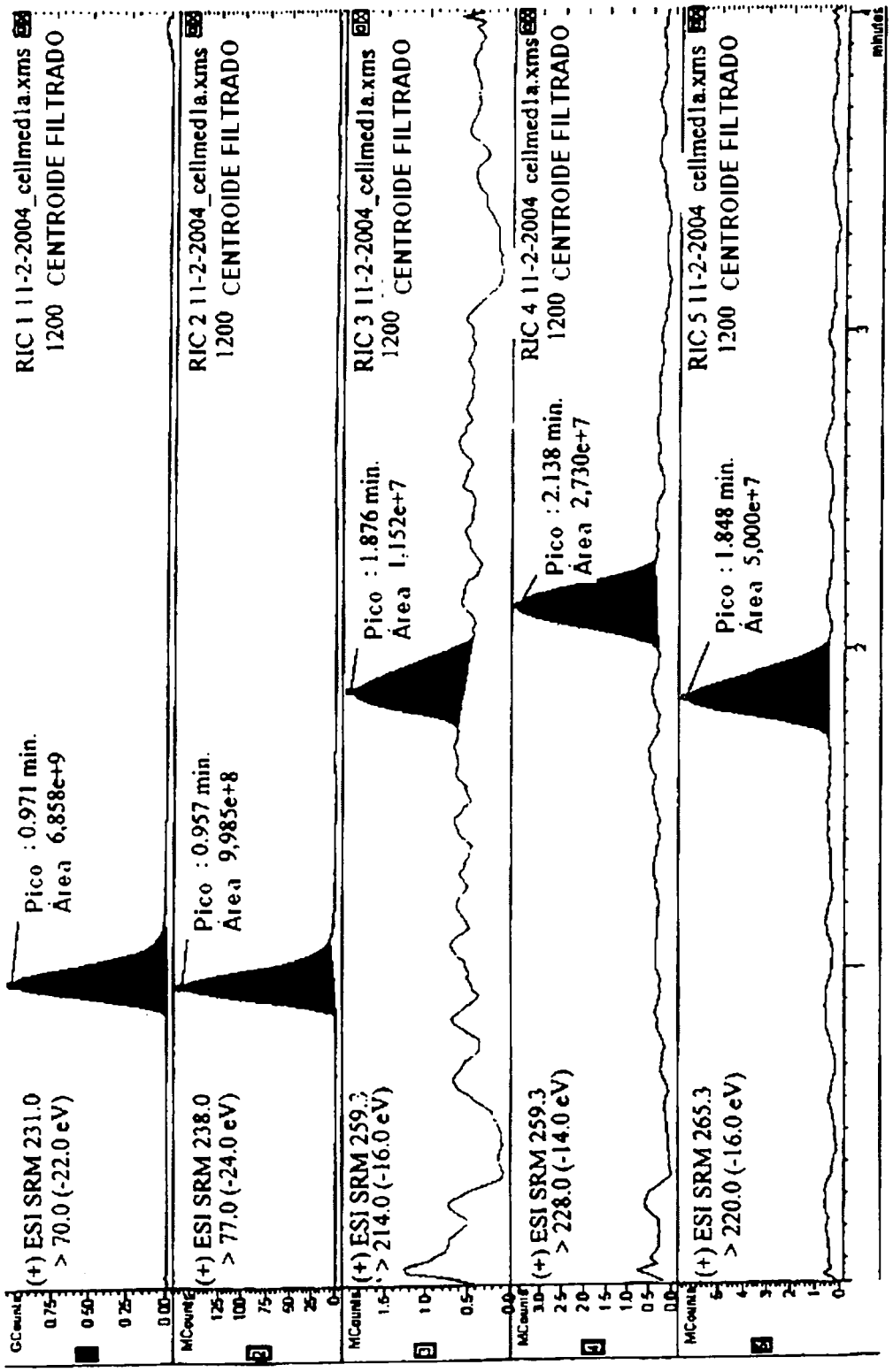

RIC 1 11-2-2004_cellmedia.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 231.0
> 70.0 (-22.0 eV)
Pico : 0.971 min.
Área 6,858e+9
RIC 2 11-2-2004_cellmedia.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 238.0
> 77.0 (-24.0 eV)
Pico : 0.957 min.
Área 9,985e+8
RIC 3 11-2-2004_cellmedia.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 259.3
> 214.0 (-16.0 eV)
Pico : 1.876 min.
Área 1,152e+7
RIC 4 11-2-2004 cellmedia.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 259.3
> 228.0 (-14.0 eV)
Pico : 2.138 min.
Área 2,730e+7
RIC 5 11-2-2004 cellmedia.xms
1200 CENTROIDE FILTRADO
(+) ESI SRM 265.3
> 220.0 (-16.0 eV)
Pico : 1.848 min.
Área 5,000e+7
minutes

fig 1 b