

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 083**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2017** **PCT/US2017/066364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018** **WO18118630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2017** **E 17885159 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3555615**

54 Título: **Método de ensayo de espectrometría de masas para la detección y cuantificación de metabolitos de función renal**

30 Prioridad:

**19.12.2016 US 201662435967 P**  
**28.06.2017 US 201762526043 P**  
**13.09.2017 US 201762558014 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2025**

73 Titular/es:

**METABOLON, INC. (100.00%)**  
**617 Davis Drive, Suite 100**  
**Morrisville, NC 27560, US**

72 Inventor/es:

**FORD, LISA;**  
**FREED, TIFFANY, A.;**  
**HAUSER, DEIRDRE, M. y**  
**GOODMAN, KELLI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 3 004 083 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de ensayo de espectrometría de masas para la detección y cuantificación de metabolitos de función renal

#### Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente n.º 62/435.967, presentada el 18 de diciembre de 2016, la solicitud provisional de patente U.S. n.º 62/526.043, presentada el 28 de junio de 2017 y la solicitud provisional de patente U.S. n.º 62/558.014, presentada el 13 de septiembre de 2017.

#### Antecedentes

Takahashi N, et al, "Tandem mass spectroscopy measurements of creatinine in mouse plasma and urine for determining glomerular filtration rate", *Kidney Int.*, 2007, vol. 71, n.º 3, páginas 266 a 271 describe un método para medir la creatinina mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM) utilizando [2H3]-creatinina deuterada como patrón interno.

El documento n.º WO 2014/186311 A1 describe biomarcadores de la función renal y métodos para utilizar dichos biomarcadores para evaluar la función renal, monitorizar la función renal, diagnosticar la lesión renal aguda y diagnosticar la enfermedad renal crónica. Se proporcionan, además, entidades de molécula pequeña como biomarcadores de enfermedad renal crónica.

El documento n.º WO 2016/025429 A1 se refiere al campo de la nefrología. Más específicamente, describe métodos y composiciones útiles para estimar con mayor precisión la tasa de filtración glomerular (TFG).

Soloni A. et al. "Prediction of declining renal function and albuminuria in patients with Type 2 diabetes by metabolomics", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2016, vol. 101, n.º 2, páginas 696 a 704 describe metabolómica de cribado en muestras de suero y orina mediante cromatografía de gases/espectroscopía de masas (EM) y cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado/EM/EM.

Vincent Guay: "Material Safety Data Sheet", CDN Isotopes Flyer, 1 de enero de 2014, páginas 1 a 2 (recuperado de internet: URL: <https://cymitquimica.com/products/3U-D7000/17093-74-2/n-acetyl-d3-l-threonine-23-d2/> [obtenido el 2020-05-29]) es una ficha de datos de seguridad de los materiales para la N-acetil-DL-treonina.

Se proporciona la información siguiente para describir los antecedentes de la invención, a fin de ayudar a la comprensión de la invención y no se admite que constituya o describa técnica anterior a la invención.

Existe una importante necesidad clínica insatisfecha de una prueba sensible, precisa y conveniente para evaluar la función excretora de los riñones (tasa de filtración glomerular, TFG). La medición más precisa de la función renal es la tasa de filtración glomerular medida (TFGm), que requiere el uso de marcadores de filtración (p. ej., inulina, yotalamato, iohexol). Debido a su complejidad, esta medición es cara, difícil de realizar en la práctica clínica rutinaria y generalmente solo se utiliza en estudios de investigación o para potenciales donantes de riñón. Otras evaluaciones actuales de la función renal (p. ej., BUN, mediciones de albúmina en orina; estimaciones de la tasa de filtración glomerular (TFGe) basadas en los niveles de creatinina sérica o cistatina C) no son lo suficientemente sensibles y/o precisas para detectar un compromiso de la función renal en estadios tempranos de daño o enfermedad renal, ni para mantener un seguimiento de la progresión de la enfermedad, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad renal crónica (ERC), cuando los individuos son asintomáticos. En consecuencia, se han desarrollado medidas alternativas de la función renal basadas en los niveles medidos de combinaciones de uno a diecisiete biomarcadores metabólicos seleccionados del grupo que comprende pseudouridina, N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, N,N,N-trimetil-L-alanil-L-prolina (TMAP, por sus siglas en inglés), creatinina, meso-eritritol, arabitól, mio-inositol, N-acetilserina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea, C-glucosilriptófano (también denominado 2-manopiranosil-triptófano, 2-( $\alpha$ -D-manopiranosil)-L-triptófano, mano-L-triptófano o 2-MT) y 3-indoxilsulfato. Las combinaciones de estos analitos se utilizan en ecuaciones complejas para derivar una estimación de la TFG (TFGe) que es más precisa que las estimaciones de TFGe basadas en los niveles de creatinina sérica y/o cistatina C. La ventaja de este enfoque radica en su facilidad de uso en la práctica clínica rutinaria para una evaluación más precisa de la función renal. La mayor precisión en la evaluación de la función renal permite intervenciones terapéuticas adecuadas y el seguimiento de la función renal, lo que facilita mejores resultados en el tratamiento.

Se describen en la presente memoria métodos para la detección y cuantificación de hasta diecisiete analitos en una muestra biológica. Entre los diecisiete analitos se pueden incluir un panel que comprende uno o más analitos seleccionados de pseudouridina, N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP, creatinina, meso-eritritol, arabitól, mio-inositol, N-acetilserina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea, C-glucosilriptófano y 3-indoxilsulfato. De manera ventajosa, los ensayos de metabolitos requieren un tamaño de muestra pequeño, no requieren derivatización y pueden llevarse a cabo mediante métodos de análisis por espectrometría de masas.

Descripción resumida

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. El método de la invención comprende la detección y determinación de la cantidad de un panel de analitos que comprende cinco analitos seleccionados del grupo que comprende pseudouridina, N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano y creatinina en una muestra mediante espectrometría de masas. El método comprende someter la muestra a una fuente de ionización bajo condiciones adecuadas para fragmentar un ion padre y producir uno o más iones hijo detectables mediante espectrometría de masas de cada uno de los analitos. Los analitos no se derivatizan antes de la ionización. Se proporcionan, además, métodos para extraer los analitos a partir de muestras biológicas y para separarlos cromatográficamente antes de su detección mediante espectrometría de masas.

En una realización, la espectrometría de masas es espectrometría de masas en tándem.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden N-acetiltreonina, el ion o iones de la N-acetiltreonina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 162,0±0,5, 74,1±0,5, 144,0±0,5, 126,1±0,5, 119,9±0,5, 116,1±0,5, 102,0±0,5, 97,9±0,5, 84,0±0,5, 70,0±0,5, 57,0±0,5, 56,0±0,5, 43,0±0,5, 28,1±0,5, 159,9±0,5, 73,9±0,5, 118,1±0,5, 115,8±0,5, 97,9±0,5, 71,9±0,5, 70,9±0,5, 70,1±0,5, 56,1±0,5, 54,0±0,5, 42,0±0,5, 40,9±0,5, 26,0±0,5 y 159,9±0,5.

En una realización en la que analito o analitos comprenden fenilacetilglutamina, el ion o iones de la fenilacetilglutamina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 265,0±0,5, 91,0±0,5, 248,1±0,5, 219,1±0,5, 147,1±0,5, 136,0±0,5, 130,0±0,5, 129,1±0,5, 101,1±0,5, 84,0±0,5, 83,0±0,5, 65,0±0,5, 56,0±0,5, 50,9±0,5, 44,0±0,5, 40,9±0,5, 39,1±0,5, 28,0±0,5, 262,9±0,5 y 42,0±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden creatinina, el ion o iones de la creatinina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 113,9±0,5, 43,0±0,5, 86,0±0,5, 72,0±0,5, 44,1±0,5, 42,0±0,5, 28,1±0,5, 111,9±0,5 y 67,9±0,5.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden triptófano, el ion o iones del triptófano pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 205,0±0,5, 146,0±0,5, 191-193±0,5, 173-174±0,5, 163-164±0,5, 144,8-151,2±0,5, 117,1-122,1±0,5, 102,9-110,1±0,5, 89,9-96,0±0,5, 74,1-81,1±0,5, 60,9-68,9±0,5, 50,1-54,1±0,5, 38,0-43,1±0,5, 28,0-29,0±0,5, 202,9±0,5, 115,9±0,5, 185,9±0,5, 158,9±0,5, 141,9±0,5, 130,0±0,5, 74,1±0,5, 72,2±0,5, 59,0±0,5 y 44,9±0,5.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden pseudouridina, el ion o iones de la pseudouridina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 244,9±0,5, 191,0±0,5, 209,0±0,5, 179,0±0,5, 167,0±0,5, 163,0±0,5, 154,8±0,5, 151,0±0,5, 148,0±0,5, 139,0±0,5, 125,0±0,5, 120,0±0,5, 111,8±0,5, 109,8±0,5, 107,8±0,5, 96,0±0,5, 92,0±0,5, 84,0±0,5, 82,0±0,5, 80,0±0,5, 68,0±0,5, 65,2±0,5, 55,0±0,5, 54,0±0,5, 43,0±0,5, 41,0±0,5, 39,0±0,5, 242,9±0,5, 153,0±0,5, 182,8±0,5, 151,9±0,5, 139,9±0,5, 138,9±0,5, 124,0±0,5, 110,8±0,5, 109,9±0,5, 96,0±0,5, 82,0±0,5, 55,0±0,5, 42,0±0,5 y 41,0±0,5.

En una realización en la que analito o analitos comprenden mesoeritritol, el ion o iones del mesoeritritol pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 120,9±0,5, 88,9±0,5, 120,0±0,5, 119,0±0,5, 105,9±0,5, 103,0±0,5, 100,9±0,5, 93,9±0,5, 92,8±0,5, 79,9±0,5, 77,0±0,5, 70,9±0,5, 67,9±0,5, 65,8±0,5, 65,0±0,5, 58,9±0,5, 52,0±0,5, 43,2±0,5 y 40,0±0,5.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden arabitol, el ion o iones del arabitol pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 150,9±0,5, 88,9±0,5, 149,1±0,5, 136,0±0,5, 133,0±0,5, 131,1±0,5, 119,0±0,5, 112,8±0,5, 108,2±0,5, 103,1±0,5, 100,9±0,5, 96,8±0,5, 91,8±0,5, 84,9±0,5, 83,0±0,5, 81,9±0,5, 78,8±0,5, 77,0±0,5, 73,0±0,5, 70,9±0,5, 68,9±0,5, 66,9±0,5, 59,0±0,5, 57,0±0,5, 55,0±0,5, 45,0±0,5, 42,9±0,5 y 41,2±0,5.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden mioinositol, el ion o iones del mioinositol pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 178,9±0,5, 87,0±0,5, 177,2±0,5, 161,0±0,5, 159,0±0,5, 146,8±0,5, 141,0±0,5, 134,9±0,5, 128,8±0,5, 125,0±0,5, 122,7±0,5, 117,0±0,5, 112,8±0,5, 110,9±0,5, 100,9±0,5, 98,9±0,5, 97,0±0,5, 95,0±0,5, 90,8±0,5, 89,0±0,5, 85,0±0,5, 82,9±0,5, 81,0±0,5, 78,8±0,5, 74,8±0,5, 73,1±0,5, 70,9±0,5, 68,9±0,5, 59,0±0,5, 56,9±0,5, 55,0±0,5, 45,1±0,5, 43,0±0,5 y 41,0±0,5.

En una realización en la que analito o analitos comprenden N-acetilserina, el ion o iones de la N-acetilserina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga ( $m/z$ ) de aproximadamente 145,9±0,5, 74,0±0,5, 119,0±0,5, 116,0±0,5, 104,9±0,5, 103,9±0,5, 103,0±0,5, 97,9±0,5, 84,0±0,5, 81,0±0,5, 72,0±0,5, 70,0±0,5, 64,9±0,5, 60,8±0,5, 57,0±0,5, 42,0±0,5 y 40,9±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden N-acetilalanina, el ion o iones de la N-acetilalanina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 131,9±0,5, 89,9±0,5, 114,1±0,5, 86,1±0,5 y 44,0±0,5.

En una realización en la que analito o analitos comprenden 3-metilhistidina, el ion o iones de la 3-metilhistidina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 170,0±0,5, 94,9±0,5, 109,1±0,5, 97,0±0,5, 96,0±0,5, 92,9±0,5, 83,0±0,5, 81,0±0,5, 80,1±0,5, 70,2±0,5, 67,9±0,5, 67,0±0,5, 55,0±0,5, 54,0±0,5, 42,0±0,5 y 41,0±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden trans-4-hidroxiprolina, el ion o iones de la trans-4-hidroxiprolina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 131,9±0,5, 68,0±0,5, 114,2±0,5, 86,0±0,5, 58,0±0,5 y 41,0±0,5.

En una realización en la que analito o analitos comprenden quinurenina, el ion o iones de la quinurenina pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 209,0±0,5, 94,0±0,5, 192,1±0,5, 191,2±0,5, 174,0±0,5, 164,1±0,5, 163,1±0,5, 150,0±0,5, 146,1±0,5, 136,0±0,5, 119,9±0,5, 118,1±0,5, 98,9±0,5, 88,0±0,5 y 73,9±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden urea, el ion o iones de la urea pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 60,9±0,5, 29,2±0,5, 44,0±0,5, 43,0±0,5, 42,1±0,5, 28,0±0,5 y 27,1±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden 3-indoxilsulfato, el ion o iones del 3-indoxilsulfato pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 211,8±0,5, 79,9±0,5, 132,0±0,5, 104,0±0,5, 80,9±0,5 y 77,0±0,5.

En una realización en la que uno o más analitos comprenden TMAP, el ion o iones del TMAP pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 229,1±0,5, 170,1±0,5, 142,2±0,5, 126,0±0,5, 124,0±0,5, 116,0±0,5, 114,0±0,5, 98,0±0,5, 96,0±0,5, 70,0±0,5, 68,0±0,5, 60,0±0,5, 59,1±0,5, 58,1±0,5, 54,9±0,5, 227,0±0,5, 181,0±0,5, 159,0±0,5, 133,2±0,5, 114,8±0,5, 112,9±0,5, 105,8±0,5, 89,1±0,5, 71,0±0,5, 69,0±0,5 y 45,1±0,5.

En una realización en la que el analito o analitos comprenden C-glucosiltryptófano, el ion o iones del C-glucosiltryptófano pueden comprender uno o más iones seleccionados del grupo que consiste en iones con una proporción de masa a carga (m/z) de aproximadamente 365,2±0,5, 245,0±0,5, 130,0±0,5, 142,0±0,5, 156,0±0,5 y 116,0±0,5.

En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tales como, por ejemplo, la cantidad de dos o más analitos seleccionados del grupo que consiste en tryptófano y 3-indoxilsulfato en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más o tres analitos seleccionados del grupo que comprende tryptófano, 3-indoxilsulfato y C-glucosiltryptófano en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco analitos seleccionados del grupo que comprende pseudouridina, N-acetilreonina, fenilacetilglutamina, tryptófano y creatinina en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección. En otra realización, el método incluye la determinación de la cantidad de N-acetilreonina, pseudouridina, fenilacetilglutamina y tryptófano.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden pseudouridina y N-acetilreonina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden pseudouridina y fenilacetilglutamina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden pseudouridina y tryptófano.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden pseudouridina y creatinina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden acetilreonina y fenilacetilglutamina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden acetiltreonina y triptófano.

5 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden acetiltreonina y creatinina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden fenilacetilglutamina y triptófano.

10 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden fenilacetilglutamina y creatinina.

15 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden triptófano y creatinina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden TMAP y pseudouridina.

20 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden TMAP y N-acetiltreonina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden TMAP y fenilacetilglutamina.

25 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden TMAP y triptófano.

30 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden TMAP y creatinina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y pseudouridina.

35 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y N-acetiltreonina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y fenilacetilglutamina.

40 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y triptófano.

45 En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y creatinina.

En una realización de ejemplo, se determinan los niveles de dos o más analitos, en donde los dos o más analitos comprenden C-glucosilriptófano y TMAP.

50 En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, arabitól, fenilacetilglutamina, creatinina y pseudouridina en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

55 En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, pseudouridina, meso-eritritól, arabitól, mio-inositol y N-acetilserina en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

60 En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, pseudouridina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP y creatinina en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

65 En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más o seis analitos seleccionados del grupo que

consiste en N-acetiltreonina, mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina y pseudouridina en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más o nueve analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea y combinaciones de los mismos en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección. Se muestran combinaciones de ejemplo de analitos en la Tabla A, proporcionada como Apéndice A.

En una realización, el método incluye la determinación de la cantidad de una pluralidad de analitos, tal como, por ejemplo, la cantidad de dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilserina y combinaciones de los mismos en una muestra mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección.

En una realización, el tiempo de ejecución puede ser de 7 minutos o menos. En otra realización, el tiempo de ejecución puede ser inferior a 4 minutos.

En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de plasma o de suero. El volumen de muestra puede ser de entre 10 µl y 200 µl. Por ejemplo, el volumen de muestra puede ser de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 µl, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 o 200 µl, o cualquier otro volumen entre 10 y 200 µl.

#### Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A-F muestran cromatogramas de ejemplo de fenilacetilglutamina, pseudouridina, triptófano, N-acetiltreonina y creatinina, en un único cromatograma con patrones internos (1A) y el cromatograma de cada analito individualmente (1B-F), respectivamente, generados utilizando el método de cromatografía 1.

Las FIGS. 2A-H muestran cromatogramas de ejemplo de meso-eritritol, N-acetilserina, arabitol, N-acetiltreonina, mio-inositol y pseudouridina, en un único cromatograma con patrones internos de suero (2A) o patrones de calibración en BSA (2B) y el cromatograma de cada analito individualmente (2C-H), respectivamente, generados utilizando el método de cromatografía 2.

Las FIGS. 3A-K muestran cromatogramas de urea, creatinina, trans-4-hidroxiprolina, N-acetilalanina, N-acetiltreonina, 3-metilhistidina, triptófano, quinurenina y fenilacetilglutamina, en un único cromatograma de suero (3A) o plasma (3B), y el cromatograma para cada analito individualmente (3C-K), respectivamente, generado utilizando el método de cromatografía 3.

Las FIGS. 4A-H muestran cromatogramas de C-glucosiltriptófano, triptófano y 3-indoxilsulfato en un único cromatograma obtenido a partir de suero (4A) o plasma (4E), y el cromatograma de cada analito individualmente a partir de suero (4B-D) y plasma (4F-H), generados utilizando el método de cromatografía 4.

La FIG. 5 muestra un cromatograma de ejemplo de fenilacetilglutamina, creatinina, N-acetiltreonina, triptófano, pseudouridina y TMAP en un único cromatograma, generado utilizando el método de cromatografía 5. Se incluyeron patrones internos para fenilacetilglutamina, creatinina, N-acetiltreonina, triptófano y pseudouridina; TMAP es endógeno.

La FIG. 6 muestra un cromatograma de ejemplo de N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilserina en un solo cromatograma, incluidos los patrones internos, generado utilizando el método de cromatografía 6.

La FIG. 7 muestra un cromatograma de ejemplo de arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltreonina en un único cromatograma, incluidos los patrones internos, generado utilizando el método de cromatografía 7.

La FIG. 8 muestra un cromatograma de ejemplo de mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltreonina en un único cromatograma, incluidos los patrones internos, generado utilizando el método de cromatografía 8.

La FIG. 9 muestra picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem de la N-acetiltreonina.

La FIG. 10 muestra picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem de la fenilacetilglutamina.

La FIG. 11 muestra picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem de la creatinina.

La FIG. 12 muestra picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem del triptófano.

La FIG. 13 muestra picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem de la pseudouridina.

Las FIGS. 14A-B muestran picos de iones padre e iones hija de ejemplo, generados a partir de la fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem de TMAP en modo de ionización positiva (A) y en modo de ionización negativa (B).

Descripción detallada

Se describen métodos para medir la cantidad de cinco analitos seleccionados del grupo de metabolitos que consisten en: N-acetiltreonina, pseudouridina, fenilacetilglutamina, triptófano y creatinina en una muestra. Se describen métodos de espectrometría de masas para cuantificar múltiples analitos en una muestra utilizando un método de inyección única. Los métodos utilizan una etapa de cromatografía líquida, tal como UPLC, para llevar a cabo una separación (purificación, enriquecimiento) de los analitos seleccionados, combinado con métodos de espectrometría de masas, proporcionando de esta manera un sistema de ensayo de alto rendimiento para la cuantificación de una pluralidad de analitos en una muestra que es adaptable a la automatización.

Los métodos presentados en la presente memoria ofrecen ventajas respecto a los métodos actuales para medir estos analitos. La capacidad de medir, en una única inyección, una pluralidad de analitos en diversas combinaciones reduce el tiempo necesario para obtener los resultados del análisis, y utiliza menos recursos en términos de consumibles de laboratorio (p. ej., tubos, puntas de pipeta y reactivos), instrumentos de laboratorio y recursos humanos. Estas mejoras generan ahorros al reducir los costes de los ensayos e incrementar la capacidad de los instrumentos y del laboratorio para el análisis de las muestras.

Antes de describir la presente invención en mayor detalle, se definen los siguientes términos y expresiones.

*Definiciones:*

La expresión "extracción en fase sólida" se refiere a un procedimiento de preparación de muestras en el que los componentes de una mezcla compleja (es decir, fase móvil) se separan de acuerdo con sus propiedades físicas y químicas utilizando un material de empaquetamiento cromatográfico de partículas sólidas (es decir, fase sólida o fase estacionaria). El material de empaquetamiento de partículas sólidas puede estar contenido en un dispositivo tipo cartucho (p. ej., una columna).

El término "separación" se refiere al procedimiento de dividir una mezcla compleja en sus moléculas o metabolitos componentes. Entre las técnicas de separación habituales y representativas de laboratorio se incluyen la electroforesis y la cromatografía.

El término "cromatografía" se refiere a un método físico de separación en el que los componentes (es decir, los constituyentes químicos) que se van a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida. La fase móvil puede ser gaseosa ("cromatografía de gases" o "CG") o líquida ("cromatografía líquida" o "CL"). Los datos de salida cromatográficos pueden utilizarse en realizaciones del método descrito en la presente memoria.

La expresión "cromatografía líquida" o "CL" se refiere a un procedimiento de inhibición selectiva de uno o más componentes de una solución líquida a medida que el líquido se desplaza uniformemente a través de una columna de una sustancia finamente dividida o a través de conductos capilares. La inhibición resulta de la distribución de los componentes de la mezcla entre una o más fases estacionarias y la fase o fases móviles a medida que la fase o fases móviles se desplazan en relación con la fase o fases estacionarias. Entre los ejemplos de "cromatografía líquida" se incluyen "cromatografía líquida de fase inversa" o "RPLC" (por sus siglas en inglés), "cromatografía líquida de alto rendimiento" o "HPLC" (por sus siglas en inglés), "cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado" o "UPLC" o "UHPLC" (por sus siglas en inglés).

La expresión "tiempo de retención" se refiere al tiempo transcurrido en un procedimiento de cromatografía desde la introducción de la muestra en el dispositivo de separación. El tiempo de retención de un constituyente de una muestra se refiere al tiempo transcurrido en un procedimiento de cromatografía entre el momento de inyección de la muestra en el dispositivo de separación y el momento en que el constituyente de la muestra eluye (p. ej., sale) de la parte del dispositivo de separación que contiene la fase estacionaria.

La expresión "índice de retención" de un componente de la muestra se refiere a un número, obtenido mediante interpolación (normalmente logarítmica), que relaciona el tiempo de retención o el factor de retención del componente de la muestra con los tiempos de retención de los patrones eluidos antes y después del pico del componente de la muestra, un mecanismo que utiliza las características de separación de patrones conocidos para eliminar el error sistemático.

La expresión "índice de separación" se refiere a una métrica asociada a los constituyentes químicos separados mediante una técnica de separación. Para las técnicas de separación cromatográfica, el índice de separación puede ser el tiempo de retención o el índice de retención. Para las técnicas de separación no cromatográficas, el índice de separación puede ser la distancia física recorrida por el constituyente químico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "información de separación" y "datos de separación" se refieren a los datos que indican la presencia o ausencia de constituyentes químicos con respecto al índice de separación. Por ejemplo, los datos de separación pueden indicar la presencia de un constituyente químico que

presenta una masa específica que eluye en un momento determinado. Los datos de separación pueden indicar que la cantidad del constituyente químico que eluye a lo largo del tiempo aumenta, alcanza un pico y después disminuye. Un gráfico que representa la presencia del constituyente químico en función del índice de separación (p. ej., el tiempo) puede mostrar un pico gráfico. De esta manera, dentro del contexto de los datos de separación, las expresiones "información de pico" y "datos de pico" son sinónimos de las expresiones "información de separación" y "datos de separación".

La expresión "espectrometría de masas" (EM) se refiere a una técnica de medición y análisis de moléculas que implica ionizar o ionizar y fragmentar una molécula objetivo, para luego analizar los iones en función de sus relaciones de masa/carga, generando un espectro de masas que sirve de "huella molecular". La determinación de la relación de masa/carga de un objeto puede llevarse a cabo mediante la determinación de las longitudes de onda en las que el objeto absorbe energía electromagnética. Existen varios métodos comúnmente utilizados para determinar la relación de masa/carga de un ion; algunos miden la interacción de la trayectoria del ion con ondas electromagnéticas; otros miden el tiempo que un ion tarda en recorrer una distancia dada, o una combinación de ambos. Los datos de estas mediciones de masas de fragmentos pueden compararse con bases de datos a fin de identificar moléculas objetivo.

Las expresiones "operar en modo negativo", "operar en modo MRM negativo" u "operar en modo de ionización negativa" se refieren a los métodos de espectrometría de masas en los que se generan y detectan iones negativos. Las expresiones "operar en modo positivo", "operar en modo MRM positivo" u "operar en modo de ionización positiva" se refieren a los métodos de espectrometría de masas en los que se generan y detectan iones positivos.

La expresión "analizador de masas" se refiere a un dispositivo en un espectrómetro de masas que separa una mezcla de iones según sus relaciones de masa-carga (" $m/z$ ").

El término " $m/z$ " se refiere a la cantidad adimensional que se forma al dividir el número de masa de un ion por su número de carga. Durante mucho tiempo se ha denominado relación "masa a carga".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "fuente" se refiere a un dispositivo en un espectrómetro de masas que ioniza una muestra que se va a analizar. Entre los ejemplos de fuentes de iones se incluyen la ionización por electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés) la, ionización química a presión atmosférica (APCI, por sus siglas en inglés), la ionización por electropulverización calentada (HESI, por sus siglas en inglés), la fotoionización a presión atmosférica (APPI, por sus siglas en inglés), el detector de ionización por llama (FID, por sus siglas en inglés), la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés), etc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "detector" se refiere a un dispositivo en un espectrómetro de masas que detecta iones.

El término "ion" se refiere a cualquier objeto que contenga una carga, que puede formarse, por ejemplo, mediante la adición de electrones al objeto o eliminándolos del mismo.

La expresión "espectro de masas" se refiere a un gráfico de datos producido por un espectrómetro de masas, que generalmente contiene los valores  $m/z$  en el eje x y los valores de intensidad en el eje y.

El término "barrido" se refiere a un espectro de masas asociado a un índice de separación particular. Por ejemplo, los sistemas que utilizan una técnica de separación cromatográfica pueden generar múltiples barridos, cada uno en un tiempo de retención diferente.

La expresión "tiempo de ejecución" se refiere al tiempo desde la inyección de la muestra hasta la generación de los datos del instrumento. El tiempo total de ejecución incluye tanto la cromatografía como la espectrometría de masas para la muestra.

La expresión "EM en tándem" se refiere a una operación en la que se realiza una primera etapa de la EM, denominada "EM primaria", seguido de la realización de una o más etapas de EM a continuación, denominadas genéricamente "EM secundaria". En la EM primaria, un ion, que representa uno (y posiblemente más de uno) de los constituyentes químicos, se detecta y registra durante la creación del espectro de masas primario. La sustancia representada por el ion se somete a una EM secundaria, en la que la sustancia de interés experimenta una fragmentación que provoca la descomposición de la sustancia en subcomponentes, los cuales son detectados y registrados como un espectro de masas secundario. En una EM en tándem verdadera, existe una relación inequívoca entre el ion de interés en la EM primaria y los picos resultantes creados durante la EM secundaria. El ion de interés en la EM primaria corresponde a un ion "padre" o precursor, mientras que los iones creados durante la EM secundaria corresponden a subcomponentes del ion padre y se denominan iones "hijo" o "de producto".

De esta manera, la EM en tándem permite la creación de estructuras de datos que representan la relación padre-hijos de los constituyentes químicos en una mezcla compleja. Esta relación puede representarse mediante una estructura de tipo árbol que ilustra la relación entre los iones padre e hijo, donde los iones hijo representan subcomponentes del ion padre. La EM en tándem puede repetirse sobre los iones hijo para determinar los iones "nietos", por ejemplo. Por



lo tanto, la EM en tándem no está limitada a dos niveles de fragmentación, sino que se usa genéricamente para referirse a la EM de múltiples niveles, también conocida como "EMn". El término "EM/EM" es sinónimo de "EM<sup>2</sup>". Por simplicidad, la expresión "ion hijo" se refiere a cualquier ion creado por una EM secundaria o de orden superior (es decir, no la primaria).

El "nivel" de uno o más biomarcadores significa la cantidad absoluta o relativa o concentración del biomarcador medida en la muestra.

El término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar los biomarcadores deseados y puede comprender material celular y/o no celular del sujeto. La muestra puede aislarse a partir de cualquier líquido o tejido biológico adecuado, tal como, por ejemplo, sangre, plasma sanguíneo (plasma), suero sanguíneo (suero), orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o tejido.

El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, aunque preferentemente es un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, mono, ratón, conejo o rata.

El C-glucosiltryptófano también se denomina 2-mannopiranosil-tryptófano, 2-( $\alpha$ -D-manopiranosil)-L-tryptófano, mano-L-tryptófano y 2-MT. De acuerdo con lo anterior, estos términos se utilizan de manera intercambiable en la presente memoria.

#### I. Preparación de muestras y control de calidad (CC)

Los extractos de muestra que contienen analitos se preparan mediante aislamiento de los analitos de las macromoléculas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) que puedan estar presentes en la muestra. Algunos o todos los analitos en una muestra pueden estar unidos a proteínas. Se pueden utilizar diversos métodos para interrumpir la interacción entre el analito o analitos y las proteínas antes del análisis mediante EM. Por ejemplo, los analitos pueden extraerse de una muestra para producir un extracto líquido, mientras que las proteínas presentes se precipitan y se eliminan. Las proteínas pueden hacerse precipitar utilizando, por ejemplo, una solución de acetato de etilo o metanol. Para precipitar las proteínas en la muestra, se añade una solución de acetato de etilo o metanol a la muestra, y después se centrifuga la muestra a fin de separar el sobrenadante líquido, que contiene los analitos extraídos, de las proteínas precipitadas.

En otras realizaciones, los analitos pueden liberarse de las proteínas sin necesidad de precipitar estas últimas. Por ejemplo, se puede añadir una solución de ácido fórmico a la muestra para interrumpir la interacción entre la proteína y el analito. Alternativamente, se pueden añadir sulfato amónico, una solución de ácido fórmico en etanol o una solución de ácido fórmico en metanol a la muestra para interrumpir las interacciones iónicas entre la proteína y el analito sin precipitar la proteína. En un ejemplo, se puede utilizar una solución de acetonitrilo, metanol, agua y ácido fórmico para extraer los analitos de la muestra.

En algunas realizaciones, el extracto puede someterse a diversos métodos, incluyendo cromatografía líquida, electroforesis, filtración, centrifugación y separación por afinidad, tal como se describe en la presente memoria, con el fin de purificar o enriquecer la cantidad del analito seleccionado respecto a otro u otros componentes en la muestra.

Para evaluar, por ejemplo, la precisión, exactitud, intervalo de calibración o sensibilidad analítica de los métodos de detección y cuantificación de analitos, se pueden utilizar muestras de control de calidad (CC). La concentración de un analito o analitos determinados que se utilizará en una muestra de CC puede determinarse en función del límite inferior de cuantificación (LIDC) o el límite superior de cuantificación (LSDC) del analito, tal como se detecta en una muestra. En un ejemplo, el LIDC puede estar representado por la concentración de un patrón (p. ej., el patrón A), y el LSDC puede estar representado por la concentración de un segundo patrón (p. ej., el patrón H). El valor de CC bajo puede fijarse en una concentración de aproximadamente 3 X LIDC, el valor de CC medio puede estar en una concentración de aproximadamente 25 % a 50 % del CC alto, y el valor de CC alto puede fijarse en una concentración de aproximadamente 80 % del LSDC. Los niveles de concentración objetivo de CC pueden seleccionarse en función de una combinación del intervalo de medición analítico (IMA) y la frecuencia de los resultados de las muestras, tal como se mide en un conjunto de muestras representativas.

#### II. Cromatografía

Antes de la espectrometría de masas, el extracto del analito se somete a cromatografía líquida y, opcionalmente, a uno o más métodos adicionales de separación, tales como electroforesis, filtración, centrifugación o separación por afinidad. La cromatografía líquida (CL) puede ser cromatografía líquida de rendimiento ultraelevado (UHPLC, por sus siglas en inglés).

En algunas variantes, la UHPLC puede llevarse a cabo utilizando un sistema cromatográfico de columna en fase inversa, cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés) o un sistema cromatográfico de columna de fase mixta.

El calentador de la columna (o gestor de columna) para LC puede ajustarse a una temperatura de entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 80 °C. Por ejemplo, el calentador de la columna puede configurarse a aproximadamente 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, etc.

En un ejemplo, la UHPLC puede llevarse a cabo utilizando un sistema HILIC. En otro ejemplo, la UHPLC puede llevarse a cabo utilizando un sistema cromatográfico de columna en fase inversa. El sistema puede comprender dos o más fases móviles. Las fases móviles pueden denominarse, por ejemplo, fase móvil A, fase móvil B, fase móvil A' y fase móvil B'.

En una realización de ejemplo que utiliza dos fases móviles, A y B, la fase móvil A puede comprender formiato de amonio, ácido fórmico y agua, y la fase móvil B puede contener acetonitrilo. La concentración de formiato de amonio en la fase móvil A puede variar entre 0,1 mM y 100 mM, y la concentración del ácido fórmico puede variar entre 0,001 % y 5 %. Además, la concentración de acetonitrilo puede estar comprendida entre 0 % y 100 %. En un ejemplo, la fase móvil A puede comprender formiato de amonio 20 mM + ácido fórmico al 1 % en agua y la fase móvil B puede comprender 100 % acetonitrilo. En otro ejemplo, la fase móvil A puede comprender formiato de amonio 50 mM + ácido fórmico al 1 % en agua y la fase móvil B puede comprender 100 % acetonitrilo.

En un ejemplo, se puede utilizar la elución por gradiente lineal para la cromatografía. Las condiciones iniciales para la elución por gradiente lineal pueden incluir la concentración de una fase móvil (p. ej., la fase móvil A) y/o el caudal de una fase móvil a través de la columna (p. ej., la fase móvil A). Las condiciones iniciales pueden optimizarse para la separación y/o retención de uno o más analitos. Las condiciones del gradiente también pueden optimizarse para la separación y/o retención de analitos y pueden variar según el caudal seleccionado. Por ejemplo, con condiciones iniciales de 12 % de fase móvil A y un caudal de 550 µl/min, la fase móvil A puede incrementarse a 22 % a los 1,9 minutos, a 30 % a los 2,5 minutos y después a 42 % a los 2,7 minutos. La fase móvil B puede revertir a 12 % a los 3,4 minutos, donde puede mantenerse durante 0,3 minutos para el equilibrado para la inyección de la muestra siguiente. En otro ejemplo, las condiciones iniciales pueden ser 12 % de fase móvil A y un caudal de 500 µl/min. La fase móvil A puede incrementarse a 22 % a los 1,9 minutos, a 30 % a los 2,5 minutos, a 35 % a los 3,1 minutos, a 38 % a los 3,7 minutos y a 45 % a los 5,0 minutos, donde puede mantenerse durante 0,5 minutos. La fase móvil A puede volver a 12 % a los 5,7 minutos, momento en que puede mantenerse durante 1,3 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente. En otro ejemplo, las condiciones iniciales pueden ser 12 % de fase móvil A y un caudal de 550 µl/min. La fase móvil A puede incrementarse a 22 % a los 1,9 minutos, a 30 % a los 2,5 minutos y a 42 % a los 2,7 minutos. Después, la fase móvil A puede volver a 12 % a los 3,4 minutos, momento en que puede mantenerse durante 0,3 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente.

En otro ejemplo, la fase móvil A puede comprender acetato amónico, hidróxido amónico y agua, y la fase móvil B puede comprender acetonitrilo. La concentración de acetato amónico puede variar entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 200 mM. Por ejemplo, la concentración de acetato amónico puede ser de entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 100 mM. La concentración de hidróxido amónico puede variar entre aproximadamente 0,001 % y aproximadamente 1 %. Por ejemplo, la concentración de hidróxido amónico puede ser de entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 0,2 %. En un ejemplo adicional, la fase móvil A puede ser acetato amónico 50 mM + hidróxido amónico al 0,1 % en agua, y la fase móvil B puede ser 100 % acetonitrilo. Puede utilizarse la elución de gradiente lineal para la cromatografía y puede llevarse a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A y un caudal de 450 µl/min. La proporción de fase móvil A a continuación puede incrementarse a 20 % a los 1,5 minutos. La proporción de fase móvil A puede incrementarse a 30 % a los 4,7 minutos, a 35 % a los 5,0 minutos, y después de vuelta a 7 % a los 5,1 minutos, momento en que puede mantenerse durante 1,9 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución puede ser de 7 minutos o inferior. En otro ejemplo, la fase móvil A puede ser acetato amónico 100 mM + hidróxido amónico al 0,2 % en agua, y la fase móvil B puede ser 100 % acetonitrilo. Puede utilizarse la elución de gradiente lineal para la cromatografía y puede llevarse a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A y un caudal de 500 µl/min. La fase móvil A puede incrementarse a 20 % a los 1,5 minutos, a 30 % a los 4,7 minutos y a 35 % a los 5,0 minutos. Después, la fase móvil A puede volver a 7 % a los 5,1 minutos, momento en que puede mantenerse durante 1,9 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente. En otro ejemplo, la elución por gradiente lineal puede realizarse con una condición inicial de 7 % de fase móvil A y un caudal de 800 µl/min. La fase móvil A puede incrementarse a 20 % a los 0,9 minutos, a 25 % a los 1,9 minutos y a 30 % a los 2,1 minutos. Después, la fase móvil A puede volver a 7 % a los 2,2 minutos, momento en que puede mantenerse durante 0,5 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente. En todavía otro ejemplo, utilizando una condición inicial de 7 % de fase móvil A y un caudal de 800 µl/min para la elución por gradiente lineal, la fase móvil A puede incrementarse a 22 % a los 0,9 minutos, a 30 % a los 2,5 minutos y a 35 % a los 2,7 minutos. A continuación, la fase móvil A puede volver a 7 % a los 2,8 minutos, donde puede mantenerse durante 0,4 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente.

En todavía otras realizaciones, la fase móvil A puede contener ácido fórmico y agua, y la fase móvil B puede contener ácido fórmico y acetonitrilo. En una realización de ejemplo, la fase móvil A puede contener entre aproximadamente 0,001 % y 1,0 % de ácido fórmico, y la fase móvil B puede contener ácido fórmico y acetonitrilo en proporciones de entre 0 % y 100 %. En un ejemplo, la concentración de la fase móvil A puede ser de aproximadamente 0,1 % de ácido fórmico en agua, y la concentración de la fase móvil B puede ser de aproximadamente 0,1 % de ácido fórmico en

acetonitrilo. Puede utilizarse la elución de gradiente lineal para la cromatografía y puede llevarse a cabo con una condición inicial de 2 % de fase móvil B y un caudal de 700 µl/min. La fase móvil B puede incrementarse a 90 % a los 2,5 minutos, mantenerse a 90 % durante 0,3 minutos y después puede reducirse a 2 % a los 2,9 minutos, a partir de cuando puede mantenerse durante 0,4 minutos para el equilibrado antes de la inyección de la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución puede ser inferior a 4 minutos.

### III. Espectrometría de masas y cuantificación

Puede ionizarse uno o más analitos mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, la espectrometría de masas. La espectrometría de masas se lleva a cabo utilizando un espectrómetro de masas que incluye una fuente de iones para ionizar la muestra fraccionada y crear moléculas cargadas para su posterior análisis. La ionización de la muestra puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante ionización mediante electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés). Entre otras fuentes de iones se pueden incluir, por ejemplo, ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización mediante electropulverización calentada (HESI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), detector de ionización por llama (FID) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). La selección del método de ionización puede determinarse en función de diversas consideraciones. Entre los ejemplos de dichas consideraciones se incluyen el analito que se va a medir, el tipo de muestra, el tipo de detector y la opción de modo positivo o negativo.

El analito o analitos pueden ionizarse en modo positivo o negativo para crear uno o más iones. Por ejemplo, los analitos N-acetiltreonina, pseudouridina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina y urea pueden ionizarse en modo positivo. En otro ejemplo, los analitos N-acetiltreonina, TMAP, pseudouridina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, N-acetilserina, triptófano, C-glucosiltryptófano y 3-indoxilsulfato pueden ionizarse en modo negativo. En todavía otro ejemplo adicional, los analitos N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilserina pueden ionizarse en modo negativo. En algunos ejemplos, los analitos pueden ionizarse en modo positivo y negativo en una sola inyección.

Los ajustes del instrumento del espectrómetro de masas pueden optimizarse según el método dado y/o según el espectrómetro de masas particular utilizado. El instrumento puede utilizar diversos gases, por ejemplo, nitrógeno, helio, argón o aire cero. La espectrometría de masas puede llevarse a cabo utilizando espectrómetros de masas AB Sciex QTrap 5500. En un ejemplo, el espectrómetro de masas puede operarse en modo positivo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). La configuración de voltaje del pulverizador de iones puede variar entre aproximadamente 0,5 kV y 5,0 kV; en una realización, el voltaje puede configurarse en 4,0 kV. La temperatura de la fuente puede variar entre aproximadamente 350 °C y 600 °C; en una realización, la temperatura de la fuente puede configurarse en 550 °C. El gas de cortina puede estar comprendido entre aproximadamente 10 y aproximadamente 55 psi; en una realización, el gas de cortina se configura en 20 psi. Los caudales del gas nebulizador y del gas de desolvatación pueden variar entre aproximadamente 0 y aproximadamente 90 psi. En una realización, los caudales pueden configurarse en 75. La configuración del gas CAD puede variar de alta a baja; en una realización, el gas de disociación activada por colisión (DAC) se configura en un nivel intermedio. El potencial de desaglomeración puede variar entre menos de 15 V y más de 170 V. La energía de colisión (EC) puede variar entre menos de 12 eV y más de 100 eV. La configuración del potencial de entrada (PE) puede estar comprendida entre menos de aproximadamente 10 V y más de aproximadamente 10 V. La configuración del potencial de salida de la celda de colisión (PSC) puede variar entre menos de 8 V y más de 14 V.

En otro ejemplo, el instrumento puede operarse en modo negativo de MRM. La configuración de voltaje del pulverizador de iones puede estar comprendida entre aproximadamente -0,5 kV y -5,5 kV; en una realización, el voltaje puede configurarse en -4,0 kV. En una realización, el voltaje puede configurarse en -4,5 kV. La temperatura de la fuente puede estar comprendida entre aproximadamente 350 °C y 600 °C; en una realización, la temperatura de la fuente puede configurarse en 550 °C. El gas de cortina puede estar comprendido entre 10 y 30 o cualquier otro valor apropiado; en una realización, el gas de cortina puede configurarse en 20. Los caudales del gas nebulizador y del gas de desolvatación pueden estar comprendidos entre 40 y 80, u otro valor apropiado. En una realización, los caudales pueden configurarse en 70; en otra realización, los caudales pueden configurarse en 50. En otro ejemplo, el caudal del gas nebulizador puede configurarse en 60 y el caudal del gas de desolvatación pueden configurarse en 65. El gas CAD puede estar comprendido entre bajo y alto. En un ejemplo, el gas CAD puede configurarse, por ejemplo, en un nivel intermedio. En otro ejemplo, el gas CAD puede configurarse en un nivel alto.

Después de que una muestra ha sido ionizada, los iones cargados positiva o negativamente pueden analizarse para determinar la relación masa/carga. Entre los analizadores adecuados de ejemplo para determinar las relaciones de masa/carga se incluyen analizadores de cuadrupolo, analizadores de trampa de iones y analizadores de tiempo de vuelo. Los iones pueden detectarse utilizando, por ejemplo, un modo selectivo o un modo de barrido. Entre los modos de barrido de ejemplo se incluyen la monitorización de reacciones múltiples (MRM) y la monitorización de reacciones seleccionadas (SRM, por sus siglas en inglés).

Entre los resultados del análisis se pueden incluir los datos producidos mediante EM en tándem. En realizaciones de ejemplo, la EM en tándem puede ser una EM en tándem exacta. Por ejemplo, la espectrometría de masas en tándem

exacta puede utilizar un analizador de tiempo de vuelo con cuadrupolo (Q-TOF, por sus siglas en inglés). De esta manera, la EM en tándem permite la creación de estructuras de datos que representan la relación padre-hijos de los constituyentes químicos en una mezcla compleja. Esta relación puede representarse mediante una estructura de tipo árbol que ilustra la relación entre los iones padre e hijo, donde los iones hijo representan subcomponentes del ion padre.

Por ejemplo, un espectro de masas primario puede contener cinco iones distintos, los cuales pueden representarse como cinco picos gráficos. Cada ion en el EM primario puede ser un ion padre. Cada ion padre puede someterse a un EM secundario que produce un espectro de masas mostrando los iones hijo para ese ion padre en particular.

La relación de iones padre/hijos puede extenderse para describir la relación entre los componentes separados (p. ej., componentes que eluyen del estado de cromatografía) y los iones detectados en la EM primaria, así como la relación entre la muestra que se va a analizar y los componentes separados.

El espectrómetro de masas normalmente proporciona al usuario un barrido de iones (es decir, una abundancia relativa de cada ion con una masa/carga particular en un intervalo dado). Los datos de espectrometría de masas pueden relacionarse con la cantidad del analito en la muestra original mediante varios métodos. En un ejemplo, se utiliza un patrón de calibración para generar una curva patrón (curva de calibración) de modo que la abundancia relativa de un ion dado pueda convertirse en una cantidad absoluta del analito original. En otro ejemplo, el patrón de calibración puede ser un patrón externo y se puede generar una curva patrón basada en los iones generados a partir de esos patrones para calcular la cantidad de uno o más analitos. En un ejemplo adicional, el patrón externo puede ser un analito no marcado.

Los patrones internos pueden añadirse a los patrones de calibración y/o a las muestras de ensayo. Se puede utilizar un patrón interno para compensar la pérdida de analitos que ocurre durante el procesamiento de la muestra, con el fin de obtener un valor más preciso del analito medido en la muestra. La relación entre la superficie del pico del analito y la superficie del pico del patrón interno en los niveles de los patrones de calibración puede utilizarse para generar una curva de calibración y cuantificar las muestras. Como patrones internos puede utilizarse uno o más análogos isotópicamente marcados de los analitos, por ejemplo, N-acetil-d<sub>3</sub>-DL-treonina-d<sub>2</sub>, fenilacetilglutamina-d<sub>5</sub>, creatinina-d<sub>3</sub>, L-triptófano-d<sub>5</sub>, pseudouridina-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, eritritol-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, D-arabinitol-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, mio-inositol-d<sub>6</sub>, acetilserina-d<sub>3</sub>, N-acetil-L-alanina-d<sub>4</sub>, 3-metil-L-histidina-d<sub>3</sub>, trans-4-hidroxi-L-prolina-d<sub>3</sub>, quinurenina-d<sub>6</sub>, urea-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, 2-(α-D-manopiranosil)-L-triptófano-d<sub>4</sub>, 3-indoxilsulfato-d<sub>4</sub> y N,N,N-trimetil-L-alanil-L-prolina-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, pueden utilizarse como patrones internos.

Los datos de análisis pueden enviarse a un ordenador y procesarse con un programa informático. En un ejemplo, las relaciones entre las superficies de pico de analito y patrón interno se ajustan frente a las concentraciones de los patrones de calibración utilizando un método de regresión estadística para la cuantificación. En otro ejemplo, la regresión estadística es una regresión lineal ponderada de mínimos cuadrados. La pendiente y la ordenada en el origen calculados mediante la curva de calibración pueden utilizarse para determinar las concentraciones problema de los analitos en las muestras experimentales.

Tras obtener la concentración de uno o más analitos del panel renal, se introducen los valores de concentración en un algoritmo multivariante para generar una puntuación estimada de TFG (tasa de filtración glomerular). Por ejemplo, pueden determinarse las concentraciones de dos, tres, cuatro, cinco o seis analitos seleccionados entre N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP, pseudouridina y creatinina. En un ejemplo, pueden utilizarse parámetros clínicos (p. ej., BUN, SCr, mediciones de albúmina en orina), marcadores de función renal (p. ej., β-2 microglobulina, β-TRACE, 2-manopiranosil-triptófano (2-MPT)) y/o información del paciente (p. ej., edad, antecedentes familiares de ERC y otros factores de riesgo) en combinación con los valores de concentración de analitos obtenidos mediante los métodos descritos en la presente memoria.

#### IV. Kit

Se describe un kit para someter a ensayo uno o más analitos del panel renal seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP, pseudouridina, creatinina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, N-acetilserina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea, C-glucosil-triptófano, 3-indoxilsulfato y combinaciones de los mismos, en donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un único analito, dicho analito no es creatinina y se indica en la presente memoria. Por ejemplo, un kit puede incluir material de embalaje y cantidades medidas de uno o más patrones de analito o patrones internos en cantidades suficientes para uno o más ensayos. En realizaciones de ejemplo, los patrones internos pueden estar marcados isotópicamente, el kit puede comprender soluciones de fase móvil previamente preparadas y/o el kit puede contener reactivos de fase móvil e instrucciones para preparar las soluciones de fase móvil. Los kits pueden comprender, además, instrucciones registradas en un medio tangible (p. ej., en papel, tal como un folleto de instrucciones, o en un medio electrónico) para el uso de los reactivos en la medición del analito o analitos.

#### Ejemplos

##### I. Preparación de las muestras

## A. Reactivos e instrumentos

El ácido fórmico de grado para espectrometría de masas (98 %) y el formiato de amonio (>98 %) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; el metanol y el acetonitrilo de grado HPLC fueron obtenidos de JT Baker; y el ácido clorhídrico, 6N (certificado) fue obtenido de Fisher Scientific. Se utilizó un mezclador vórtex de tubos múltiples de VWR Scientific para la mezcla. La centrifugación de placas se llevó a cabo en una centrífuga Sorvall ST 40R de Thermo Scientific con un rotor de cubo 3617. El plasma humano (heparina-litio) y el suero se obtuvieron de Bioreclamation. La albúmina de suero bovino (libre de ácidos grasos) se obtuvo de GenDepot. La fenilacetil L-glutamina, N-acetil-L-alanina, beta-pseudouridina-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, L-triptófano-d<sub>5</sub>, D-arabitol-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, eritritol-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, 2-(α-D-manopiranosil)-L-triptófano-d<sub>4</sub>, y sal potásica de 3-indoxilsulfato-d<sub>4</sub> se obtuvieron de Toronto Research Chemicals; el cloruro de creatinina, L-triptófano, N-acetil-DL-serina, L-quinurenina, trans-4-hidroxiprolina, 3-metil-L-histidina, D-(+)-arabitol, meso-eritritol, mio-inositol, sal potásica de 3-indoxilsulfato y urea se obtuvieron de Sigma-Aldrich; la beta-pseudouridina se obtuvo de MP Biomedicals; la acetil-L-treonina se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology, y la Nα-(fenil-d<sub>5</sub>-acetil)-L-glutamina, creatinina-d<sub>3</sub>, N-acetil-d<sub>3</sub>-L-treonina-2,3-d<sub>2</sub>, N-acetil-L-alanina-2,3,3,3-d<sub>4</sub>, N-acetil-L-serina-2,3,3-d<sub>3</sub>, trans-4-hidroxiprolina-2,5,5-d<sub>3</sub>, NT-metil-d<sub>3</sub>-L-histidina, mio-inositol-1,2,3,4,5,6-d<sub>6</sub> se obtuvieron de CDN Isotopes; el sulfato de L-quinurenina (anillo-d<sub>4</sub>, 3,3-d<sub>2</sub>) y la urea (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>) se obtuvieron de Cambridge Isotope Laboratories. La N,N,N-trimetil-L-alanil-L-prolina-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-L-TMAP) se obtuvo de Albany Molecular Research.

## B. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras se llevó a cabo en una placa de polipropileno de 96 pocillos. Muestras de estudio. Se descongelaron las muestras de control de calidad (CC) y los patrones de calibración sobre hielo y se sometieron a agitación con vórtex. Para extraer los analitos de las muestras del estudio y las muestras de CC, se añadieron 175 µl de una solución de patrón interno de trabajo (PIT) de una mezcla de acetonitrilo/metanol/agua/ácido fórmico (88/10/2/0,2) que contenía el patrón o patrones apropiados a cada pocillo. La solución WIS puede comprender uno o más patrones internos y puede incluir uno o más patrones internos para cada uno de los diecisiete analitos indicados en la presente memoria. Los blancos de muestra se extrajeron mediante la adición de 175 µl de una mezcla de acetonitrilo/metanol/agua/ácido fórmico (88/10/2/0,2) sin patrones internos. Las concentraciones de WIS para dieciséis analitos se muestran en la Tabla 1. Todas las soluciones WIS fueron preparadas en una solución de acetonitrilo/metanol/agua/ácido fórmico (88/10/2/0,2). La determinación de la concentración de WIS puede basarse, por ejemplo, en las concentraciones de los analitos en el intervalo de calibración. Por ejemplo, la concentración del WIS para TMAP puede ser aproximadamente igual a la concentración de los patrones de calibración de TMAP C y D.

Tabla 1. soluciones de trabajo de patrón interno (SPI)

Nombre del patrón interno	Concentración (µg/ml)
N-Acetil-L-alanina-2,3,3,3-d <sub>4</sub>	0,0400
Creatinina-d <sub>3</sub>	0,100
N <sup>α</sup> -(fenil-d <sub>5</sub> -acetil)-L-glutamina	0,0500
N-acetil-L-serina-2,3,3-d <sub>3</sub>	0,0400
N-acetil-d <sub>3</sub> -L-treonina-2,3-d <sub>2</sub>	0,300
N <sup>T</sup> -metil-d <sub>3</sub> -L-histidina	0,0800
L-Triptófano-d <sub>5</sub>	0,500
Sulfato de L-quinurenina (anillo-d <sub>4</sub> , 3,3-d <sub>2</sub> )	1,00
trans-4-Hidroxi-L-prolina-2,5,5-d <sub>3</sub>	0,200
D-Arabinitol- <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	0,200
Eritritol- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	0,100
sal potásica de 3-indoxilsulfato-d <sub>4</sub>	0,200
Urea ( <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )	50,0
mio-Inositol-1,2,3,4,5,6-d <sub>6</sub>	1,00
β-Pseudouridina- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	0,500
2-(α-D-Manopiranosil)-L-triptófano-d <sub>4</sub>	0,200

Se determinó el intervalo de calibración de cada analito. Para cada analito, el LIDC representa el límite inferior del intervalo de calibración, y el LSDC representa el límite superior del intervalo de calibración. El experto en la materia entenderá cómo determinar el intervalo de calibración para cada analito sin necesidad de una experimentación excesiva. Se utilizaron ocho calibradores (patrones A a H) para cubrir los intervalos de calibración. Las concentraciones finales de los analitos en cada calibrador se enumeran en la Tabla 2. Las soluciones de calibración se prepararon a 20 veces las concentraciones correspondientes de calibración.

Tabla 2. Intervalos de calibración para analitos

Analito	Concentración actual de intervalo de calibración en el ensayo (µg/ml)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
N-acetiltreonina	0,02	0,04	0,08	0,2	0,6	1	1,8	2
Fenilacetilglutamina	0,1	0,2	0,4	1	3	7,5	18	20
Creatinina	2	4	8	20	60	100	180	200
Triptófano	1	2	4	10	30	50	90	100
Pseudouridina	0,4	0,8	1,6	4	12	20	36	40
N-acetilalanina	0,0075	0,015	0,03	0,06	0,24	0,6	1,5	3
Urea	10	20	40	80	320	800	2.000	4.000
Quinurenina	0,025	0,05	0,1	0,2	0,8	2	5	10
3-Metilhistidina	0,04	0,08	0,16	0,32	1,28	3,2	8	16
<i>trans</i> -4-hidroxiprolina	0,05	0,1	0,2	0,4	1,6	4	10	20
N-Acetilserina	0,015	0,03	0,06	0,12	0,48	1,2	3	6
<i>meso</i> -Eritritol	0,03	0,06	0,12	0,24	0,96	2,4	6	12
Arabitol	0,05	0,1	0,2	0,4	1,6	4	10	20
<i>mio</i> -Inositol	0,1	0,2	0,4	0,8	3,2	8	20	40
Sulfato de 3-indoxilo	0,03	0,06	0,12	0,24	0,96	2,4	6	12
Mano-L-triptófano	0,0050	0,010	0,020	0,040	0,16	0,40	1,00	2,00

Los niveles de CC se determinaron en función del LIDC y el LSDC. Se prepararon muestras de CC de nivel bajo, intermedio y alto a partir de combinaciones de pools de plasma o suero humano con concentraciones apropiadas de analitos y fortificación de analitos según fuera necesario. Las muestras de LIDC se prepararon en una solución de BSA libre de ácidos grasos (al 7,5% en PBS) a las mismas concentraciones que el patrón A de la Tabla 2 para todos los analitos. Las muestras de CC se almacenaron a -80 °C.

Para las muestras de estudio, las muestras de CC, los patrones de calibración y los blancos, se transfirieron 25 µl de la muestra extraída a los pocillos correspondientes de la placa. La placa se selló y se mezcló en un agitador de placas a alta velocidad durante aproximadamente 2 minutos. Se centrifugó la placa a 4 °C durante 10 minutos a 4.000 rpm, y se transfirió un alícuota de 150 µl del sobrenadante a una nueva placa para el análisis mediante CL-EM/EM. Con el fin de evaluar la recuperación de las muestras, se fortificaron muestras de CC de nivel intermedio con una concentración equivalente al patrón de calibración E, tal como se presenta en la Tabla 2. Los valores de calibración del patrón E se presentan en la columna con el encabezamiento "E". Las soluciones madre, las soluciones de calibración y las soluciones de patrón interno se almacenaron a 4 °C.

#### *Ejemplo 1: Purificación cromatográfica y separación de analitos a partir de muestras*

Se desarrollaron métodos cromatográficos utilizando UHPLC para analizar uno o más y hasta diez analitos a partir de una única inyección. Para cada método cromatográfico, se inyectó un alícuota fija de 1,0 µl de la solución final de extracción en la columna de UPLC para cada muestra analizada. En los métodos cromatográficos 1, 3, 5, 6, 7 y 8 se utilizó un sistema UHPLC Agilent 1290 Infinity dotado de una unidad de bomba de solventes binaria, un muestreador automático refrigerado (configurado en 4 °C) y un calentador de columna (configurado en 60 °C) para cromatografía líquida con una columna HILIC (Waters ACQUITY UPLC® BEH Amide, 1,7 µm, 2,1x150 mm). Para el método cromatográfico 2 se utilizó un sistema UPLC Waters Acquity dotado de una unidad de bomba binaria de solventes, un muestreador automático refrigerado (configurado en 4 °C) y un gestor de columnas termostatzado (configurado en 60 °C) con una columna HILIC (Waters ACQUITY UPLC® BEH Amide, 1,7 µm, 2,1x150 mm). En el método cromatográfico 4 se utilizó el mismo sistema UPLC Waters Acquity con una columna de fase inversa (Waters ACQUITY UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1x100 mm). Los detalles de cada método cromatográfico (es decir, tampones de fase móvil, gradientes de elución, caudales y tiempos de ejecución) se ejemplifican a continuación.

#### *A. Método cromatográfico 1 (5 analitos: N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, pseudouridina, triptófano y creatinina)*

En un ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los cinco analitos seleccionados del grupo compuesto por N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, pseudouridina, triptófano, creatinina y combinaciones de los mismos, donde, si el analito sometido a ensayo es solo un analito, este analito único no es creatinina.

La fase móvil A consistía en formiato amónico 20 mM + ácido fórmico al 1 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 12 % de fase móvil A (88 % de fase móvil B) y un caudal de 550 µl/min, a menos que se indique lo contrario. La fase móvil A se incrementó de 12% inicialmente a 22 % (78 % de fase móvil B) a 1,9 minutos, de 22 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a 2,5 minutos, y de 30 % a 42 % (58 % de fase móvil B) a 2,7 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 12 % (88 % de fase móvil B) a 3,4 minutos, en donde se mantuvo durante 0,3 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 3,70 minutos.

El método cromatográfico 1 separó una pluralidad de hasta cinco analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en las figuras 1A a F. Se indica el tiempo de retención aproximado para el pico de interés de cada analito. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 1,11, 2,45, 2,61, 1,43 y 1,83 para fenilacetilglutamina, pseudouridina, triptófano, N-acetiltreonina y creatinina, respectivamente.

*B. Método cromatográfico 2 (6 analitos: pseudouridina, N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol y N-acetilserina)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consiste en pseudouridina, N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, N-acetilserina y combinaciones de los mismos.

La fase móvil A consistía en formiato amónico 50 mM + ácido fórmico al 0,1 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A (93 % de fase móvil B) y un caudal de 450 µl/min, a menos que se indique lo contrario. La fase móvil A se incrementó de 7 % inicialmente a 20 % (80 % de fase móvil B) a los 1,5 minutos, de 20 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a los 4,7 minutos, y de 30 % a 35 % (65 % de fase móvil B) a los 5,0 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 7 % (93 % de fase móvil B) a los 5,1 minutos, en donde se mantuvo durante 1,9 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 7,0 minutos.

El método cromatográfico 2 separó una pluralidad de hasta seis analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en las figuras 2A a H. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 2,21, 3,30, 2,72, 2,99, 4,59 y 2,89 para meso-eritritol, N-acetilserina, arabitol, N-acetiltreonina, mio-inositol y pseudouridina, respectivamente.

*C. Método cromatográfico 3 (9 analitos: N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina y urea)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los nueve analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea y combinaciones de los mismos, donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, este analito único no es creatinina.

La fase móvil A consistía en formiato amónico 20 mM + ácido fórmico al 1 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 12 % de fase móvil A (88 % de fase móvil B) y un caudal de 500 µl/min, a menos que se indique lo contrario. La fase móvil A se incrementó de 12 % inicial al 22 % (78 % de fase móvil B) a los 1,9 minutos, de 22 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a los 2,5 minutos, de 30 % a 35 % (65 % de fase móvil B) a los 3,1 minutos, de 35 % a 38 % (62 % de fase móvil B) a los 3,7 minutos, y de 38 % a 45 % (55 % de fase móvil B) a los 5,0 minutos, donde se mantuvo durante 0,5 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 12 % (88 % de fase móvil B) a los 5,7 minutos, donde se mantuvo durante 1,3 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 7,0 minutos.

El método cromatográfico 3 separó una pluralidad de hasta nueve analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en las figuras 3A a I. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 1,36, 1,94, 3,74, 1,17 y 1,69 para urea, creatinina, trans-4-hidroxiprolina, N-acetilalanina, N-acetiltreonina, 3-metilhistidina, triptófano, quinurenina y fenilacetilglutamina, respectivamente.

*D. Método cromatográfico 4 (triptófano, 3-indoxilsulfato, C-glucosiltriptófano)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los tres analitos seleccionados del grupo que consistía en triptófano, 3-indoxilsulfato y C-glucosiltriptófano y combinaciones de los mismos.

La fase móvil A era ácido fórmico al 0,1 % en agua y la fase móvil B era ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 2 % de fase móvil B (98 % de fase móvil A) y un caudal de 700 µl/min. La fase móvil B se incrementó del 2 % inicial a 90 % (10 % de fase móvil A) a los 2,5 minutos y se mantuvo a 90 % durante 0,3 minutos. A continuación, la fase móvil B volvió a 2 % (98 % de fase móvil A) a los 2,9 minutos, donde se mantuvo durante 0,4 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 3,30 minutos.

El método cromatográfico 4 separó una pluralidad de hasta tres analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en las figuras 4A a H. Los tiempos de

retención aproximados (en minutos) fueron 0,91 y 0,95 para C-glucosiltryptófano, 1,32 y 1,33 para tryptófano y 1,45 para 3-indoxilsulfato en suero y plasma, respectivamente.

*E. Método cromatográfico 5 (6 analitos: N-acetiltryeonina, fenilacetilglutamina, pseudouridina, tryptófano, TMAP y creatinina)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consistía en N-acetiltryeonina, fenilacetilglutamina, pseudouridina, tryptófano, TMAP, creatinina y combinaciones de los mismos. Si el analito o analitos analizados son solo un analito, ese analito único no es creatinina.

La fase móvil A consistía en formiato amónico 20 mM + ácido fórmico al 1 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 12 % de fase móvil A (88 % de fase móvil B) y un caudal de 550 µl/min. La fase móvil A se incrementó de 12 % inicialmente a 22 % (78 % de fase móvil B) a 1,9 minutos, de 22 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a 2,5 minutos, y de 30 % a 42 % (58 % de fase móvil B) a 2,7 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 12 % (88 % de fase móvil B) a 3,4 minutos, en donde se mantuvo durante 0,3 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 3,70 minutos.

El método cromatográfico 5 separó una pluralidad de hasta seis analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en la figura 5. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 1,40, 1,86, 2,14, 2,61, 2,71 y 3,16 para fenilacetilglutamina, creatinina, N-acetiltryeonina, tryptófano, pseudouridina y TMAP, respectivamente.

*F. Método cromatográfico 6 (10 analitos: N-acetiltryeonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, tryptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilserina)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los diez analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltryeonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, tryptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilserina y combinaciones de los mismos, donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, este analito único no es creatinina.

La fase móvil A consistía en formiato amónico 100 mM + hidróxido amónico al 0,2 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A (93 % de fase móvil B) y un caudal de 500 µl/min. La fase móvil A se incrementó de 7 % inicialmente a 20 % (80 % de fase móvil B) a los 1,5 minutos, de 20 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a los 4,7 minutos, y de 30 % a 35 % (65 % de fase móvil B) a los 5,0 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 7 % (93 % de fase móvil B) a los 5,1 minutos, en donde se mantuvo durante 1,9 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 7,0 minutos.

El método cromatográfico 6 separó una pluralidad de hasta diez analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en la figura 6. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 2,35, 2,87, 4,85, 0,78, 3,20, 2,82, 2,40, 3,00, 3,30 y 3,69 para meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, 3-indoxilsulfato, tryptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetiltryeonina y N-acetilserina, respectivamente.

*G. Método cromatográfico 7 (5: arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltryeonina)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltryeonina y combinaciones de los mismos, donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, este analito único no es creatinina.

La fase móvil A era acetato amónico 100 mM + hidróxido amónico al 0,2 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A (93 % de fase móvil B) y un caudal de 800 µl/min. La fase móvil A se incrementó de 7 % inicialmente a 20 % (80 % de fase móvil B) a los 0,9 minutos, de 20 % a 25 % (75 % de fase móvil B) a los 1,9 minutos, y de 25 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a los 2,1 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 7 % (93 % de fase móvil B) a los 2,2 minutos, en donde se mantuvo durante 0,5 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 2,7 minutos.

El método cromatográfico 7 separó una pluralidad de hasta cinco analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en la figura 7. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 1,74, 1,74, 1,48, 1,84 y 1,98 para arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltryeonina, respectivamente.



*H. Método cromatográfico 8 (6: mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilteonina)*

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía líquida para la purificación y separación en una misma inyección de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consiste en mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilteonina y combinaciones de los mismos, donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, este analito único no es creatinina.

La fase móvil A consistía en acetato amónico 100 mM + hidróxido amónico al 0,2 % en agua, y la fase móvil B era acetonitrilo al 100 %. La elución en gradiente lineal se llevó a cabo con una condición inicial de 7 % de fase móvil A (93 % de fase móvil B) y un caudal de 800 µl/min. La fase móvil A se incrementó de 7 % inicialmente a 22 % (78 % de fase móvil B) a los 0,9 minutos, de 22 % a 30 % (70 % de fase móvil B) a los 2,5 minutos, y de 30 % a 35 % (65 % de fase móvil B) a los 2,7 minutos. A continuación, la fase móvil A volvió a 7 % (93 % de fase móvil B) a los 2,8 minutos, en donde se mantuvo durante 0,4 minutos para el equilibrado antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo total de ejecución fue de 3,2 minutos.

El método cromatográfico 8 separó una pluralidad de hasta seis analitos con buenas formas de pico. Los cromatogramas de ejemplo de los analitos separados resultantes se muestran en la figura 8. Los tiempos de retención aproximados (en minutos) fueron 2,64, 1,83, 1,64, 1,40, 1,74 y 1,85 para mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetilteonina, respectivamente.

#### *Ejemplo 2: Medición mediante EM/EM de analitos*

Se llevó a cabo espectrometría de masas en los extractos de muestras tal como se describe en los métodos a continuación utilizando un espectrómetro de masas AB Sciex QTrap 5500 con fuente Turbo V (ESI). Los datos en bruto fueron adquiridos del instrumento y procesados utilizando el programa informático Analyst 1.6.2 (AB Sciex). Para la cuantificación, las relaciones de superficie de pico del analito a patrón interno se ajustaron frente a las concentraciones de los patrones de calibración mediante regresión lineal ponderada ( $1/x^2$ ) de los mínimos cuadrados. La pendiente y la ordenada en el origen resultantes de la curva de calibración se utilizaron para calcular las concentraciones problema en las muestras experimentales.

#### *A. Método de EM/EM 1*

Se desarrolló un método para detectar en la misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en pseudouridina, N-acetilteonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina y combinaciones de los mismos, en donde, si el uno o más analitos sometidos a ensayo es solo un analito, dicho analito único no es creatinina. Se utilizó el mismo método de EM/EM para detectar en la misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consiste en pseudouridina, N-acetilteonina, fenilacetilglutamina, triptófano, TMAP, creatinina, y combinaciones de los mismos.

El eluyente de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 1, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. En otro ejemplo, el eluido de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 5, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. Se utilizó acetonitrilo:agua (50:50) para el lavado de la aguja. El instrumento se operó en modo positivo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). El voltaje de ionización se ajustó a 4,0 kV, la temperatura de la fuente se ajustó a 550 °C, el gas cortina (p. ej., nitrógeno), a 20 psi, y los caudales de gas nebulizador y desolvatación (p. ej., nitrógeno) a 75 psi, gas de disociación activada por colisión (CAD) (p. ej., nitrógeno) al medio.

Los datos en bruto fueron adquiridos del instrumento y procesados utilizando el programa informático Analyst 1.6.2 (AB Sciex). Para la cuantificación, las relaciones de superficie de pico del analito a patrón interno se ajustaron frente a las concentraciones de los patrones de calibración mediante regresión lineal ponderada ( $1/x^2$ ) de los mínimos cuadrados. La pendiente y la ordenada en el origen resultantes de la curva de calibración se utilizaron para calcular las concentraciones problema en las muestras experimentales. Los iones de ejemplo que fueron generados para la cuantificación de pseudouridina, N-acetilteonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina y TMAP se enumeran en la Tabla 3. Los iones padre se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion padre (m/z)", y los iones hijo utilizados para la cuantificación en el presente ejemplo se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion hijo para cuantificación (m/z)". La elección del ion hijo para la cuantificación en el presente ejemplo fue optimizada para la sensibilidad en todo el intervalo de medición analítica; sin embargo, se pueden seleccionar iones hijo adicionales para reemplazar o complementar los iones hijo utilizados para la cuantificación en los ejemplos.

Tabla 3. Relaciones de masa a carga (m/z) de iones padre e hijos de los analitos medidos en modo de ionización positiva

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
N-Acetil-DL-treonina	162,0 $\pm$ 0,5	74,1 $\pm$ 0,5	144,0, 126,1, 119,9, 116,1, 102,0, 97,9, 84,0, 70,0, 57,0, 56,0, 43,0, 28,1
N-Acetil-d <sub>3</sub> -DL-treonina-d <sub>2</sub>	167,0 $\pm$ 0,5	77,1 $\pm$ 0,5	149,1, 131,9, 129,8, 125,9, 122,8, 121,0, 104,0, 91,0, 86,1, 76,0, 59,0, 58,1, 45,9, 43,0, 31,1, 29,2, 28,0
fenilacetilglutamina	265,0 $\pm$ 0,5	91,0 $\pm$ 0,5	248,1, 219,1, 147,1, 136,0, 130,0, 129,1, 101,1, 84,0, 83,0, 65,0, 56,0, 50,9, 44,0, 40,9, 39,1, 28,0
fenilacetilglutamina-d <sub>5</sub>	270,0 $\pm$ 0,5	96,3 $\pm$ 0,5	253,3, 224,3, 147,0, 141,3, 130,0, 100,8, 84,0, 69,0, 68,1, 56,0, 41,1, 28,1
creatinina	113,9 $\pm$ 0,5	43,0 $\pm$ 0,5	86,0, 72,0, 44,1, 42,0, 28,1
creatinina-d <sub>3</sub>	116,9 $\pm$ 0,5	47,0 $\pm$ 0,5	89,2, 43,1, 29,1, 28,0
L-triptófano	205,0 $\pm$ 0,5	146,0 $\pm$ 0,5	188,1, 170,0, 159,1, 144,0, 143,0, 142,0, 140,0, 132,0, 130,1, 128,1, 126,9, 117,9, 116,9, 114,9, 103,0, 91,0, 89,9, 89,0, 77,0, 74,9, 74,0, 64,9, 63,0, 62,0, 61,0, 50,9, 49,9, 39,2, 28,0
L-triptófano-d <sub>5</sub>	210,0 $\pm$ 0,5	150,1 $\pm$ 0,5	191-193, 173-174, 163-164, 144,8-151,2, 117,1-122,1, 102,9-110,1, 89,9-96,0, 74,1-81,1, 60,9-68,9, 50,1-54,1, 38,0-43,1, 28,0-29,0
pseudouridina	244,9 $\pm$ 0,5	191,0 $\pm$ 0,5	209,0, 179,0, 167,0, 163,0, 154,8, 151,0, 148,0, 139,0, 125,0, 120,0, 111,8, 109,8, 107,8, 96,0, 92,0, 84,0, 82,0, 80,0, 68,0, 65,2, 55,0, 54,0, 43,0, 41,0, 39,0
pseudouridina- <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	247,9 $\pm$ 0,5	194,0 $\pm$ 0,5	230,2, 212,0, 206,9, 194,1, 182,2, 169,9, 166,0, 157,9, 154,0, 148,9, 141,9, 128,1, 120,9, 113,0, 109,1, 96,8, 92,7, 91,0, 85,3, 83,1, 81,2, 78,8, 77,0, 69,1, 65,0, 56,9, 55,0, 53,3, 51,3, 44,9, 43,0, 40,9, 39,0
TMAP	229,1 $\pm$ 0,5	142,2 $\pm$ 0,5 o 70,0 $\pm$ 0,5	170,1, 126,0, 124,0, 116,0, 114,0, 98,0, 96,0, 68,0, 60,0, 59,1, 58,1, 54,9
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -L,L-TMAP	232,2 $\pm$ 0,5	142,1 $\pm$ 0,5 o 70,1 $\pm$ 0,5	170,1, 126,0, 124,0, 116,0, 114,0, 98,0, 97,1, 96,0, 93,9, 81,0, 80,0, 79,0, 77,0, 74,0, 72,1, 71,1, 69,0, 68,0, 67,1, 63,0, 62,1, 61,1, 60,0, 59,0, 58,1, 57,1, 56,1, 55,0, 54,0, 53,1

5 Las figuras 9 a 14 muestran espectros de masas resultantes de la fragmentación de los iones padre indicados en la Tabla 3.

10 Las transiciones de MRM que se generaron para la cuantificación de la N-acetiltreonina en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre con un m/z de aproximadamente 162,0 $\pm$ 0,5 para producir iones hijo con m/z de aproximadamente 74,1 $\pm$ 0,5, 144,0 $\pm$ 0,5, 126,1 $\pm$ 0,5, 119,9 $\pm$ 0,5, 116,1 $\pm$ 0,5, 102,0 $\pm$ 0,5, 97,9 $\pm$ 0,5, 84,0 $\pm$ 0,5, 70,0 $\pm$ 0,5, 57,0 $\pm$ 0,5, 56,0 $\pm$ 0,5, 43,0 $\pm$ 0,5 y 28,1 $\pm$ 0,5. Estos picos de iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem de la N-acetiltreonina se ilustran en la figura 9. Cualquiera de los iones hijo puede ser seleccionado para la cuantificación. En el presente ejemplo, el ion hijo utilizado para la cuantificación de la N-acetiltreonina presenta un m/z de aproximadamente 74,1 $\pm$ 0,5. El intervalo de calibración para la N-acetiltreonina se determinó que estaba comprendido entre 0,0200 y 2,00  $\mu$ g/ml.

20 Las transiciones de MRM que se generaron para la cuantificación de la fenilacetilglutamina en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre con un m/z de aproximadamente 265,0 $\pm$ 0,5 para producir iones hijo con m/z de aproximadamente 91,0 $\pm$ 0,5, 248,1 $\pm$ 0,5, 219,1 $\pm$ 0,5, 147,1 $\pm$ 0,5, 136,0 $\pm$ 0,5, 130,0 $\pm$ 0,5, 129,1 $\pm$ 0,5, 101,1 $\pm$ 0,5, 84,0 $\pm$ 0,5, 83,0 $\pm$ 0,5, 65,0 $\pm$ 0,5, 56,0 $\pm$ 0,5, 50,9 $\pm$ 0,5, 44,0 $\pm$ 0,5, 40,9 $\pm$ 0,5, 39,1 $\pm$ 0,5 y 28,0 $\pm$ 0,5. Estos picos de iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem de la fenilacetilglutamina se ilustran en la figura 10. Cualquiera de los iones hijo puede ser seleccionado para la cuantificación. En el presente ejemplo, el ion hijo utilizado para la cuantificación de la fenilacetilglutamina presenta un m/z de aproximadamente 91,0 $\pm$ 0,5. El intervalo de calibración para la fenilacetilglutamina se determinó que estaba comprendido entre 0,100 y 20,0  $\mu$ g/ml.

25 Las transiciones de MRM que se generaron para la cuantificación de la creatinina en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre que presenta un m/z de aproximadamente

113,9±0,5 para producir iones hijo que presentan un m/z de aproximadamente 43,0±0,5, 86,0±0,5, 72,0±0,5, 44,1±0,5, 42,0±0,5 y 28,1±0,5. Estos picos de los iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem de la creatinina se ilustran en la figura 11. Puede seleccionarse cualquiera de los iones hijo para la cuantificación. En el presente ejemplo, el ion hijo utilizado para la cuantificación de la creatinina presenta un m/z de aproximadamente 43,0±0,5. El intervalo de calibración para la creatinina se determinó que estaba comprendido entre 2,00 y 200 µg/ml.

Las transiciones de MRM que se generaron para la cuantificación del triptófano en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre con un m/z de aproximadamente 205,0±0,5 para producir iones hijo que presentan un m/z de aproximadamente 146,0±0,5, 191-193±0,5, 173-174±0,5, 163-164±0,5, 144,8-151,2±0,5, 117,1-122,1±0,5, 102,9-110,1±0,5, 89,9-96,0±0,5, 74,1-81,1±0,5, 60,9-68,9±0,5, 50,1-54,1±0,5, 38,0-43,1±0,5 y 28,0-29,0±0,5. Estos picos de los iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem del triptófano se ilustran en la figura 12. Puede seleccionarse cualquiera de los iones hijo para la cuantificación. En el presente ejemplo, el ion hijo utilizado para la cuantificación del triptófano presenta un m/z de aproximadamente 146,0±0,5. El intervalo de calibración para el triptófano se determinó que estaba comprendido entre 1,00 y 100 µg/ml.

Las transiciones MRM que se generaron para la cuantificación de la pseudouridina en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre que presenta un m/z de aproximadamente 244,9±0,5 para producir iones hijo que presenta un m/z de aproximadamente 191,0±0,5, 209,0±0,5, 179,0±0,5, 167,0±0,5, 163,0±0,5, 154,8±0,5, 151,0±0,5, 148,0±0,5, 139,0±0,5, 125,0±0,5, 120,0±0,5, 111,8±0,5, 109,8±0,5, 107,8±0,5, 96,0±0,5, 92,0±0,5, 84,0±0,5, 82,0±0,5, 80,0±0,5, 68,0±0,5, 65,2±0,5, 55,0±0,5, 54,0±0,5, 43,0±0,5, 41,0±0,5 y 39,0±0,5. Estos picos de los iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem de la pseudouridina se ilustran en la figura 13. Puede seleccionarse cualquiera de los iones hijo para la cuantificación. En el presente ejemplo, el ion hijo utilizado para la cuantificación de la pseudouridina presenta un m/z de aproximadamente 191,0±0,5. El intervalo de calibración para la pseudouridina se determinó que estaba comprendido entre 10,0 y 400 µg/ml.

Las transiciones de MRM que se generaron para la cuantificación de TMAP en modo de ionización positiva incluyen aquellas producidas por la fragmentación de un ion padre que presenta un m/z de aproximadamente 229,1±0,5 para producir iones hijo que presentan un m/z de aproximadamente 170,1±0,5, 142,2±0,5, 126,0±0,5, 124,0±0,5, 116,0±0,5, 114,0±0,5, 98,0±0,5, 96,0±0,5, 70,0±0,5, 68,0±0,5, 60,0±0,5, 59,1±0,5, 58,1±0,5, 54,9±0,5, 227,0±0,5, 181,0±0,5, 159,0±0,5, 133,2±0,5, 114,8±0,5, 112,9±0,5, 105,8±0,5, 89,1±0,5, 71,0±0,5, 69,0±0,5 y 45,1±0,5. Puede seleccionarse cualquiera de los iones hijo para la cuantificación. Por ejemplo, los iones hijo con un m/z de aproximadamente 58,1±0,5, 70,0±0,5, 114,0±0,5, o 142,2±0,5 pueden ser utilizados para la cuantificación de TMAP. Estos picos de los iones padre e hijo generados a partir de la fragmentación espectrométrica en tándem de TMAP se ilustran en la figura 14.

## B. Método de EM/EM 2

En otro ejemplo, se desarrolló un método para detectar en la misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consiste en pseudouridina, N-acetilteonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol, N-acetilserina y combinaciones de los mismos. El eluyente de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 2, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. Se utilizó una mezcla de agua:acetonitrilo (90:10) para el lavado fuerte/sellado; se utilizó acetonitrilo:agua (90:10) para el lavado débil.

Los instrumentos se operaron en modo negativo de MRM. El voltaje de pulverización iónica se configuró en -4,0 kV, la temperatura de la fuente en 550 °C, y el gas de cortina en 20 psi; los caudales de gas nebulizador y de desolvatación se configuraron en 70 psi, y el gas CAD, a nivel intermedio.

Los iones de ejemplo que se generaron para la cuantificación de pseudouridina, N-acetilteonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol y N-acetilserina se muestran en la Tabla 4. Los iones padre se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion padre (m/z)", y los iones hijo utilizados para la cuantificación en el presente ejemplo se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion hijo para cuantificación (m/z)". La selección del ion hijo para la cuantificación en el presente ejemplo se optimizó para la sensibilidad en todo el intervalo de medición analítica; sin embargo, se pueden seleccionar cualesquiera de los iones hijo para reemplazar o potenciar los iones hijo utilizados para la cuantificación en los ejemplos.

Tabla 4. Iones útiles para la cuantificación de analitos

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos ±0,5)
Pseudouridina	242,9±0,5	153,0±0,5	182,8, 151,9, 139,9, 138,9, 124,0, 110,8, 109,9, 96,0, 82,0, 55,0, 42,0, 41,0

(continuación)

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
Pseudouridina- $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}_2$	245,9 $\pm$ 0,5	156,0 $\pm$ 0,5	186,0, 141,8, 141,0, 114,0, 111,0, 97,0, 44,1
Acetil-L-treonina	159,9 $\pm$ 0,5	73,9 $\pm$ 0,5	118,1, 115, 8, 97,9, 71,9, 70,9, 70,1, 56,1, 54,0, 42,0, 40,9, 26,0
N-Acetil-d <sub>3</sub> -L-treonina-d <sub>2</sub>	165,0 $\pm$ 0,5	102,0 $\pm$ 0,5	120,0, 103,0, 82,2, 77,0, 76,0, 74,1
<i>meso</i> -Eritritol	120,9 $\pm$ 0,5	88,9 $\pm$ 0,5	120,0, 119,0, 105,9, 103,0, 100,9, 93,9, 92,8, 79,9, 77,0, 70,9, 67,9, 65,8, 65,0, 58,9, 52,0, 43,2, 40,0
Eritritol- $^{13}\text{C}_4$	124,9 $\pm$ 0,5	73,9 $\pm$ 0,5	123,0, 110,0, 107,0, 105,0, 98,0, 95,2, 91,9, 87,0, 82,1, 81,1, 76,1, 67,0, 65,9, 61,0, 60,1, 58,0, 44,8, 41,2, 39,9, 25,8
D-Arabitol	150,9 $\pm$ 0,5	88,9 $\pm$ 0,5	149,1, 136,0, 133,0, 131,1, 119,0, 112,8, 108,2, 103,1, 100,9, 96,8, 91,8, 84,9, 83,0, 81,9, 78,8, 77,0, 73,0, 70,9, 68,9, 66,9, 59,0, 57,0, 55,0, 45,0, 42,9, 41,2
D-Arabinol- $^{13}\text{C}_5$	155,9 $\pm$ 0,5	91,9 $\pm$ 0,5	154,1, 138,0, 136,0, 123,1, 118,1, 107,0, 104,9, 102,0, 88,9, 86,9, 76,0, 74,0, 73,2, 61,0, 59,9, 58,0, 45,0, 43,1
<i>mio</i> -Inositol	178,9 $\pm$ 0,5	87,0 $\pm$ 0,5	177,2, 161,0, 159,0, 146,8, 141,0, 134,9, 128,8, 125,0, 122,7, 117,0, 112,8, 110,9, 100,9, 98,9, 97,0, 95,0, 90,8, 89,0, 85,0, 82,9, 81,0, 78,8, 74,8, 73,1, 70,9, 68,9, 59,0, 56,9, 55,0, 45,1, 43,0, 41,0
<i>mio</i> -Inositol-d <sub>6</sub>	184,9 $\pm$ 0,5	88,9 $\pm$ 0,5	181,8, 167,1, 164,1, 158,1, 144,9, 140,0, 131,9, 130,1, 128,9, 119,9, 118,9, 117,2, 104,1, 103,1, 102,0, 100,9, 97,9, 93,1, 90,0, 88,0, 85,9, 82,0, 80,8, 76,9, 74,1, 72,9, 72,1, 69,8, 62,1, 61,0, 60,1, 58,1, 57,0, 46,0, 45,0, 42,1
N-acetilserina	145,9 $\pm$ 0,5	74,0 $\pm$ 0,5	119,0, 116,0, 104,9, 103,9, 103,0, 97,9, 84,0, 81,0, 72,0, 70,0, 64,9, 60,8, 57,0, 42,0, 40,9
Acetilserina-d <sub>3</sub>	148,9 $\pm$ 0,5	117,0 $\pm$ 0,5	121,9, 106,9, 98,9, 87,0, 86,0, 74,9, 73,0, 70,9, 60,8, 59,0, 58,0, 45,0, 41,2, 42,0

## C. Método de EM/EM 3

En otro ejemplo, se desarrolló un método de cromatografía para detectar en una misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los nueve analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea y combinaciones de los mismos, donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, este analito único no es creatinina. El eluyente de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 3, método cromatográfico 3, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. Se utilizó agua:acetonitrilo (90: 10) para el lavado fuerte/de sellado; se utilizó acetonitrilo:agua (90:10) para el lavado débil. El instrumento se operó en modo positivo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). El voltaje de ionización se ajustó a 4,0 kV, la temperatura de la fuente se ajustó a 550 °C, el gas cortina (p. ej., nitrógeno), a 20 psi, y los caudales de gas nebulizador y desolvatación (p. ej., nitrógeno) a 75 psi, gas de disociación activada por colisión (CAD) (p. ej., nitrógeno) al medio.

Los iones de ejemplo que se generaron para la cuantificación de N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina y urea se muestran en la Tabla 5. Los iones padre se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion padre (m/z)", y los iones hijo utilizados para la cuantificación en el presente ejemplo se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion hijo para cuantificación (m/z)". La selección del ion hijo para la cuantificación en el presente ejemplo se optimizó para la sensibilidad en todo el intervalo de medición analítica; sin embargo, se pueden seleccionar cualesquiera de los iones hijo para reemplazar o potenciar los iones hijo utilizados para la cuantificación en los ejemplos.

Tabla 5. Iones útiles para la cuantificación de analitos

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
Acetil-L-treonina	162,0 $\pm$ 0,5	74,1 $\pm$ 0,5	144,0, 126,1, 119,9, 116,1, 102,0, 97,9, 84,0, 70,0, 57,0, 56,0, 43,0, 28,1
N-Acetil-d <sub>3</sub> -L-treonina-d <sub>2</sub>	167,0 $\pm$ 0,5	77,1 $\pm$ 0,5	149,1, 131,9, 129,8, 125,9, 122,8, 121,0, 104,0, 91,0, 86,1, 76,0, 59,0, 58,1, 45,9, 43,0, 31,1, 29,2, 28,0
Fenilacetil-L-glutamina	265,0 $\pm$ 0,5	91,0 $\pm$ 0,5	248,1, 219,1, 147,1, 136,0, 130,0, 129,1, 101,1, 84,0, 83,0, 65,0, 56,0, 50,9, 44,0, 40,9, 39,1, 28,0
Fenilacetilglutamina-d <sub>5</sub>	270,0 $\pm$ 0,5	96,3 $\pm$ 0,5	253,3, 224,3, 147,0, 141,3, 130,0, 100,8, 84,0, 69,0, 68,1, 56,0, 41,1, 28,1
Creatinina	113,9 $\pm$ 0,5	43,0 $\pm$ 0,5	86,0, 72,0, 44,1, 42,0, 28,1
Creatinina-d <sub>3</sub>	116,9 $\pm$ 0,5	47,0 $\pm$ 0,5	89,2, 43,1, 29,1, 28,0
L-Triptófano	205,0 $\pm$ 0,5	146,0 $\pm$ 0,5	188,1, 170,0, 159,1, 144,0, 143,0, 142,0, 140,0, 132,0, 130,1, 128,1, 126,9, 117,9, 116,9, 114,9, 103,0, 91,0, 89,9, 89,0, 77,0, 74,9, 74,0, 64,9, 63,0, 62,0, 61,0, 50,9, 49,9, 39,2, 28,0
L-Triptófano-d <sub>5</sub>	210,0 $\pm$ 0,5	150,1 $\pm$ 0,5	191-193, 173-174, 163-164, 144,8-151,2, 117,1-122,1, 102,9-110,1, 89,9-96,0, 74,1-81,1, 60,9-68,9, 50,1-54,1, 38,0-43,1, 28,0-29,0
N-Acetil-L-alanina	131,9 $\pm$ 0,5	89,9 $\pm$ 0,5	114,1, 86,1, 44,0
N-Acetil-L-alanina-d <sub>4</sub>	136,0 $\pm$ 0,5	94,0 $\pm$ 0,5	118,1, 90,0, 48,0
3-Metil-L-histidina	170,0 $\pm$ 0,5	94,9 $\pm$ 0,5	109,1, 97,0, 96,0, 92,9, 83,0, 81,0, 80,1, 70,2, 67,9, 67,0, 55,0, 54,0, 42,0, 41,0
3-Metil-L-histidina-d <sub>3</sub>	173,0 $\pm$ 0,5	127,0 $\pm$ 0,5	129,1, 112,0, 100,1, 83,0
<i>trans</i> -4-Hidroxi-L-prolina	131,9 $\pm$ 0,5	68,0 $\pm$ 0,5	114,2, 86,0, 58,0, 41,0
<i>trans</i> -4-Hidroxi-L-prolina-d <sub>3</sub>	134,9 $\pm$ 0,5	71,1 $\pm$ 0,5	117,1, 89,0, 70,0, 61,0
L-quinurenina	209,0 $\pm$ 0,5	94,0 $\pm$ 0,5	192,1, 191,2, 174,0, 164,1, 163,1, 150,0, 146,1, 136,0, 119,9, 118,1, 98,9, 88,0, 73,9
Quinurenina-d <sub>6</sub>	215,0 $\pm$ 0,5	98,0 $\pm$ 0,5	198,2, 197,2, 179,1, 170,1, 169,2, 155,1, 154,1, 151,0, 142,0, 141,0, 125,0, 118,0, 99,9, 99,1, 97,0, 89,9, 74,2
Urea	60,9 $\pm$ 0,5	29,2 $\pm$ 0,5	44,0, 43,0, 42,1, 28,0, 27,1
Urea- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	63,9 $\pm$ 0,5	29,1 $\pm$ 0,5	46,0, 45,0, 44,1, 30,0

## D. Método de EM/EM 4

En otro ejemplo, se desarrolló un método para detectar en la misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los tres analitos seleccionados del grupo que consiste en triptófano, C-glucosilriptófano y 3-indoxilsulfato. El eluyente de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 4, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. Se utilizó metanol para el lavado de la aguja. El instrumento se operó en modo negativo de MRM. El voltaje de pulverización iónica se configuró en -4,5 kV, temperatura de la fuente de 550 °C, y gas de cortina, 20 psi; los caudales de gas nebulizador y de desolvatación se configuraron en 60 y 65 psi, respectivamente, y el gas CAD, a nivel alto.

Los pares de iones de ejemplo que pueden utilizarse para la cuantificación de triptófano, C-glucosilriptófano y 3-indoxilsulfato se muestran en la Tabla 6. Los iones padre se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion padre (m/z)", y los iones hijo utilizados para la cuantificación en el presente ejemplo se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion hijo para cuantificación (m/z)". La selección del ion hijo para la cuantificación en el presente ejemplo se optimizó para la sensibilidad en todo el intervalo de medición analítica; sin embargo, se pueden seleccionar cualesquiera de los iones hijo para reemplazar o potenciar los iones hijo utilizados para la cuantificación en los ejemplos.

Tabla 6. Iones útiles para la cuantificación de analitos

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
L-Triptófano	202,9 $\pm$ 0,5	115,9 $\pm$ 0,5	185,9, 158,9, 141,9, 130,0, 74,1, 72,2, 59,0, 44,9
L-Triptófano-d <sub>5</sub>	208,0 $\pm$ 0,5	119,9 $\pm$ 0,5	190,2, 164,2, 162,2, 147,1, 146,0, 134,1, 121,0, 120,0, 76,0, 75,0, 73,9, 72,8, 72,0
3-indoxilsulfato	211,8 $\pm$ 0,5	79,9 $\pm$ 0,5	132,0, 104,0, 80,9, 77,0

(continuación)

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
3-indoxilsulfato-d <sub>4</sub>	215,9 $\pm$ 0,5	80,9 $\pm$ 0,5	136,0, 79,9
Mano-L-triptófano	365,2 $\pm$ 0,5	245,0 $\pm$ 0,5	130,0, 142,0, 156,0, 116,0
Mano-L-triptófano-d <sub>4</sub>	369,2 $\pm$ 0,5	249,0 $\pm$ 0,5	

## D. Método de EM/EM 5

En otro ejemplo, se desarrolló un método para detectar en la misma inyección los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los diez analitos seleccionados del grupo que consiste en meso-eritritol, D-arabitol, inositol, 3-indoxilsulfato, L-triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetiltreonina, y N-acetilserina, y combinaciones de los mismos. El eluyente de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 6, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas.

En otro ejemplo, el eluido de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 7, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. El método detectó, en la misma inyección, los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en D-arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetiltreonina y combinaciones de los mismos, en donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, dicho analito único no es creatinina.

En otro ejemplo, el eluido de la columna cromatográfica descrita en el Ejemplo 1, método cromatográfico 8, se introdujo directa y automáticamente en la fuente de electropulverización de un espectrómetro de masas. El método detectó, en la misma inyección, los niveles de uno o más, dos o más, y hasta los seis analitos seleccionados del grupo que consiste en inositol, L-triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetiltreonina y combinaciones de los mismos, en donde, si el analito o analitos sometidos a ensayo son solo un analito, dicho analito único no es creatinina. Se utilizó acetonitrilo:agua (50:50) para el lavado de la aguja. El instrumento se operó en modo negativo de MRM. El voltaje de pulverización iónica se configuró en -4,5 kV, la temperatura de la fuente en 550 °C, y el gas de cortina en 20 psi; los caudales de gas nebulizador y de desolvatación se configuraron en 50 psi, y el gas CAD, a nivel intermedio.

Los pares de iones de ejemplo que pueden utilizarse para la cuantificación de meso-eritritol, D-arabitol, inositol, 3-indoxilsulfato, L-triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetiltreonina, y N-acetilserina se muestran en la Tabla 7. Los iones padre se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion padre (m/z)", y los iones hijo utilizados para la cuantificación en el presente ejemplo se enumeran en la columna con el encabezamiento "ion hijo para cuantificación (m/z)". La selección del ion hijo para la cuantificación en el presente ejemplo se optimizó para la sensibilidad en todo el intervalo de medición analítica; sin embargo, se pueden seleccionar cualesquiera de los iones hijo para reemplazar o potenciar los iones hijo utilizados para la cuantificación en los ejemplos.

Tabla 7. Iones útiles para la cuantificación de analitos

Analito	Ion padre $\pm 0,5$ (m/z)	Ion hijo para la cuantificación $\pm 0,5$ (m/z)	Analito	Ion parental $\pm 0,5$ (m/z)	Ion hijo para la cuantificación $\pm 0,5$ (m/z)
Meso-eritritol	120,9	89	Fenilacetilglutamina	262,9	42
Meso-eritritol- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	124,9	74-	Fenilacetilglutamina-d <sub>5</sub>	268	42
D-Arabitol	150,9	88,9	Creatinina	111,9	67,9
D-Arabitol- <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	155,9	91,9	Creatinina-d <sub>3</sub>	114,9	68
Inositol	178,9	87	Pseudouridina	242,9	42
Inositol-d <sub>6</sub>	184,9	88,9	Pseudouridina- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	245,9	156
3-indoxilsulfato	211,8	103,9	N-Acetil-DL-treonina	159,9	73,9
3-Indoxilsulfato-d <sub>4</sub>	215,9	107,9	N-Acetil-d <sub>3</sub> -L-treonina-d <sub>2</sub>	164,9	102
L-Triptófano	202,9	115,9	N-Acetilserina	145,9	74
L-Triptófano-d <sub>5</sub>	207,9	119,9	N-Acetilserina-d <sub>3</sub>	148,9	117

## Ejemplo 3: Validación del método

## A. Método cromatográfico 1 y método de EM/EM 1

El rendimiento analítico de la combinación de método cromatográfico 1 y método de EM/EM 1 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta cinco analitos en una sola inyección con un tiempo de ejecución de 3,7 minutos.

La precisión del método para medir una pluralidad de cinco analitos se evaluó en tres niveles de control de calidad

(bajo, intermedio y alto) en plasma y suero. Se analizaron tres réplicas por nivel de control de calidad por matriz en dos tandas por día durante 20 días, para un total de 40 tandas. Se incluyó un total de 120 réplicas por nivel de CC en los cálculos de CV entre días para cada analito por matriz. La precisión entre días fue inferior a 6,3 % en cada nivel de CC en plasma e inferior a 7,1 % en cada nivel de CC en suero. Se presentan los resultados en la Tabla 8. Se observaron respuestas lineales ( $R^2 > 0,98$ ) en un intervalo de 100 veces para N-acetiltreonina, creatinina, pseudouridina y triptófano, y en un intervalo de 200 veces para fenilacetilglutamina. Se seleccionaron los intervalos de calibración basándose en el análisis de más de 1.000 muestras de plasma y suero.

Tabla 8. Precisión entre días para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Nivel QC	SUERO		PLASMA	
		Media (µg/ml)	% CV	Media (µg/ml)	% CV
Acetiltreonina (n=120)	Baja	0,0772	5,9	0,0758	6,0
	Intermedia	0,889	5,9	0,891	5,3
	Alto	1,78	4,8	1,64	5,4
Creatinina (n=120)	Baja	7,42	7,1	6,70	5,3
	Intermedia	88,9	6,6	87,0	4,9
	Alto	172	5,5	158	5,4
Fenilacetilglutamina (n=120)	Baja	0,328	6,4	0,327	6,3
	Intermedia	8,15	5,1	8,19	4,2
	Alto	16,0	3,8	14,7	3,8
Pseudouridina (n=120)	Baja	1,27	6,1	1,23	5,1
	Intermedia	16,4	5,1	16,4	4,8
	Alto	32,1	3,7	29,8	4,4
Triptófano (n=120)	Baja	4,07	6,9	3,26	6,1
	Intermedia	44,5	5,4	43,4	4,9
	Alto	88,0	4,3	80,6	4,8

Se evaluaron la exactitud y la precisión de los CC de dilución en suero y plasma para medir de manera exacta las muestras con valores de analitos superiores al LSDC (es decir, fuera del intervalo de calibración). Los CC de dilución se prepararon mediante dilución de la matriz de CC alta 5 veces con una solución de BSA libre de ácidos grasos. Se analizaron tres réplicas de CC de dilución por matriz en dos tandas por día durante cinco días, para un total de 10 tandas. Se incluyeron un total de 30 réplicas en los cálculos de exactitud y precisión entre días. La exactitud entre días (en comparación con el valor medido de CC alto) en suero fue superior a 94,5 % y la precisión entre días fue inferior a 7,6 %; la exactitud entre días en plasma fue superior a 94,7 % y la precisión entre días fue inferior a 4,4 %. Se presentan los resultados en la Tabla 9.

Tabla 9. Exactitud y precisión entre días del CC de dilución 5X

SUERO					
	N-acetiltreonina (n=30)	Creatinina (n=30)	Fenilacetilglutamina (n=30)	Pseudouridina (n=30)	Triptófano (n=30)
Media (mg/ml)	1,80	177	17,0	33,6	83,3
% CV	7,6	5,8	7,0	6,0	6,8
% exactitud	97,9	101	94,5	95,0	107
PLASMA					
	N-acetiltreonina (n=30)	Creatinina (n=30)	Fenilacetilglutamina (n=30)	Pseudouridina (n=30)	Triptófano (n=30)
Media (mg/ml)	1,66	163	15,5	30,3	76,3
% CV	3,7	4,0	3,2	3,9	4,4
% exactitud	100	101	94,7	99,6	107

Se evaluó la precisión en el LIDC. La relación señal-ruido para cada analito era superior a 5:1. Se analizaron tres réplicas de las muestras de LDIC en dos tandas por día durante 15 días, para un total de 30 tandas. Se incluyó un total de 90 réplicas del LIDC en los cálculos del % CV entre días para cada analito. Toda la precisión intradía y entre días fue inferior a 2,8 % CV; los datos se muestran en la Tabla 10. Estos resultados indican que la cuantificación de la pluralidad de analitos en el límite inferior era altamente precisa.

Tabla 10. Precisión intradía y entre días en el LIDC.

Día	Concentración LIDC (µg/ml)				
	0,0200	2,00	0,100	0,400	1,00
	N-acetiltreonina (% RSD)	Creatinina (% RSD)	Fenilacetil-glutamina (% RSD)	Pseudouridina (% RSD)	Triptófano (% RSD)
1 (n=6)	5,2	5,8	11,2	4,7	9,6
2 (n=6)	7,6	6,3	10,0	5,4	10,9
3 (n=6)	5,7	3,3	6,5	4,8	7,0
4 (n=6)	9,9	2,6	4,7	3,2	5,3
5 (n=6)	4,6	4,2	4,2	3,7	3,5
6 (n=6)	6,1	7,6	3,7	7,6	8,1
7 (n=6)	10,1	8,1	8,1	9,8	6,2
8 (n=6)	4,3	8,8	5,5	4,1	6,8
9 (n=6)	3,1	5,5	6,6	10,1	9,2
10 (n=6)	8,9	3,1	7,1	6,0	5,7
11 (n=6)	5,1	5,3	5,7	4,6	6,5
12 (n=6)	7,1	9,9	8,6	5,7	6,1
13 (n=6)	4,9	3,7	3,6	8,4	12,8
14 (n=6)	5,0	6,6	12,3	5,9	7,2
15 (n=6)	5,0	6,5	4,6	5,9	5,3
Entre días (n=90)	6,5	6,4	8,6	7,0	9,3

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, se fortificaron las muestras de CC en suero y plasma con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron las muestras de CC fortificadas junto con las muestras de CC regulares por triplicado. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. Las recuperaciones para los cinco analitos se determinó que eran de entre 97,4 % y 113 % en suero y de entre 103 % y 110 % en plasma para los cinco analitos. Se presentan los datos en la Tabla 11.

Tabla 11. Recuperación de analitos

SUERO					
	N-acetiltreonina	Creatinina	Fenilacetil-glutamina	Pseudouridina	Triptófano
% de recuperación	103	97,4	98,5	103	113
PLASMA					
	N-acetiltreonina	Creatinina	Fenilacetil-glutamina	Pseudouridina	Triptófano
% de recuperación	105	110	105	103	109

Para evaluar la interferencia del tipo de muestra en la cuantificación de los analitos, se llevó a cabo un experimento de infusión posterior a la columna con una solución de patrón interno, concurrentemente con el análisis de diez lotes individuales de muestras de plasma y suero extraídas sin patrones internos. Se monitorizaron las transiciones del patrón interno y se observó el nivel de supresión/mejora en los tiempos de retención de los analitos. El triptófano mostró un efecto de matriz en la superficie de retención y eluyó justo antes de una supresión que aparentemente excedía el 25 % de la señal no afectada. Sin embargo, dado que los patrones internos que co-eluían en el presente ensayo estaban marcados isotópicamente, cualquier efecto leve del tipo de muestra debería ocurrir de manera similar tanto para el analito como para el patrón interno. Mediante la utilización de la relación de superficies de pico de analito y de patrón interno para la cuantificación, se compensa de esta manera el efecto del tipo de muestra en el cálculo final.

También se evaluó la interferencia para ictericia, lipidemia, isómeros conocidos de los analitos y productos farmacéuticos, incluyendo estatinas, los AINE, analgésicos, antihistamínicos y antidiabéticos. Se determinó que la combinación del método cromatográfico 1 y el método de EM/EM 1 estaba libre de interferencias de las condiciones de interferencia sometidas a ensayo.

#### B. Método cromatográfico 2 y método de EM/EM 2

El rendimiento analítico de la combinación de método cromatográfico 2 y método de EM/EM 2 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta seis analitos seleccionados del grupo que consistía en pseudouridina, N-acetiltreonina, meso-eritritol, arabitol, mio-inositol y N-acetilserina en una sola inyección con un tiempo de ejecución de 7,0 minutos.



Se evaluó la precisión del método para medir una pluralidad de seis analitos en un lote representativo de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y seis réplicas para suero en tres tandas. La precisión entre tandas fue inferior a 7,3 % en plasma y a 20 % en suero. Se presentan los resultados en la Tabla 12.

Tabla 12. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=18)	% RSD entre tandas (n=18)
pseudouridina	0,645	2,6	0,778	20
N-acetiltreonina	0,0657	4,5	0,0721	10
mesoeritritol	0,459	7,3	0,749	5,3
arabitol	0,530	2,8	0,522	3,6
mioinositol	3,58	2,5	5,08	2,8
N-acetilserina	0,100	6	0,102	4,3

Se evaluaron la precisión y exactitud en el LIDC. La relación señal-ruido para cada analito era superior a 5:1. Se analizaron seis réplicas de las muestras de LIDC en tres tandas. Se incluyó un total de 18 réplicas del LIDC en los cálculos de % RSD y exactitud entre tandas para cada analito en cada matriz. La precisión entre tandas fue inferior a 18,0 % en plasma y a 13 % en suero. La exactitud entre tandas fue de entre 98,7 % y 104 % para plasma y de entre 95,7 % y 101,1 % para suero. Se presentan los datos en la Tabla 13.

Tabla 13. Precisión y exactitud entre tandas en el LIDC

Analito	Plasma (n=18)			Suero (n=18)		
	Media entre tandas (µg/ml)	% RSD entre tandas	Exactitud entre tandas (%)	Media entre tandas (µg/ml)	% RSD entre tandas	Exactitud entre tandas (%)
pseudouridina	0,0252	4,7	101	0,0249	13	100,4
N-acetiltreonina	0,00744	11,9	99,1	0,0075	9,4	100,67
mesoeritritol	0,0311	18	104	0,0304	9,0	98,5
arabitol	0,049	7,2	98,7	0,0495	8,7	101,1
mioinositol	0,1	6,8	100	0,1043	7,8	95,7
N-acetilserina	0,015	4,8	99	0,0150	5,9	100

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, se fortificaron las muestras de CC en suero y plasma con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron las muestras de CC fortificadas junto con las muestras de CC regulares por triplicado. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. Las recuperaciones para los seis analitos se determinó que eran de entre 80,4 % y 97,5 % en plasma y de entre 75,6 % y 96,0 % en suero para los seis analitos. Se presentan los datos en la Tabla 14.

Tabla 14. Recuperación de analitos

Analito	Plasma	Suero
	% medio de recuperación	% medio de recuperación
pseudouridina	94,4	75,6
N-acetiltreonina	90,7	89,4
mesoeritritol	97,5	93,4
arabitol	91,4	96,0
mioinositol	87,2	93,5
N-acetilserina	80,4	79,9

### C. Método cromatográfico 3 y método de EM/EM 3

El rendimiento analítico de la combinación del método cromatográfico 3 y el método de EM/EM 3 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta nueve analitos seleccionados del grupo compuesto por N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxiprolina, quinurenina y urea en una sola inyección con un tiempo de ejecución de 7,0 minutos.

Se evaluó la precisión del método para medir una pluralidad de nueve analitos en un lote representativo de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y seis réplicas para suero en tres tandas. La precisión entre tandas fue inferior a 6,2 % en plasma y a 6,0 % en suero. Se presentan los resultados en la Tabla 15.

Tabla 15. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=18)	% RSD entre tandas (n=18)
N-acetiltreonina	0,0717	4,9	0,0847	4,4
fenilacetilglutamina	0,252	4,5	0,64	2,2
triptófano	11,0	4,2	15,04	4,1
creatinina	7,880	2,8	9,72	3,3
N-acetilalanina	0,160	6,2	0,20	6,0
3-metilhistidina	0,891	5,7	1,13	4,1
trans-4-hidroxiprolina	1,97	4,8	2,08	4,2
quinurenina	0,228	3,9	0,437	4,1
urea	209	3,1	481	2,2

Se evaluaron la precisión y exactitud en el LIDC. La relación señal/ruido para cada analito fue superior a 5:1. Se analizaron seis réplicas de las muestras LIDC en tres tandas. Se incluyó un total de 18 réplicas del LIDC en los cálculos de % RSD y exactitud entre tandas para cada analito en cada matriz. La precisión entre tandas fue inferior a 14,4 % para plasma y a 9,5 % para suero. La exactitud entre tandas fue de entre 91,7 % y 102 % para plasma y de entre 92,6 % y 101,9 % para suero. Se presentan los datos en la Tabla 16.

Tabla 16. Precisión y exactitud entre tandas en el LIDC

Analito	Plasma (n=18)			Suero (n=18)		
	Media entre tandas (µg/ml)	% RS entre tandas D	Exactitud entre tandas (%)	Media entre tandas (µg/ml)	% RS entre tandas D	Exactitud entre tandas (%)
N-acetiltreonina	0,00754	8,4	101	0,008	7,9	95,5
fenilacetilglutamina	0,0124	4,8	98,9	0,0127	8,0	98,2
triptófano	0,2	14,4	92,8	0,206	8,0	96,9
creatinina	0,176	4	101	0,188	7,6	92,6
N-acetilalanina	0,007	7,2	98,4	0,0078	9,1	96,0
3-metilhistidina	0,0409	13,5	102	0,081	4,9	99,13
trans-4-hidroxiprolina	0,0493	5,5	98,6	0,050	9,5	100,17
quinurenina	0,0229	6,2	91,7	0,025	7,3	101,9
urea	9	7,6	93,4	10,5	7,4	94,6

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, se fortificaron las muestras de CC en suero y plasma con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron las muestras de CC fortificadas junto con las muestras de CC regulares por triplicado. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. Las recuperaciones para los nueve analitos se determinó que eran de entre 86,1 % y 96,4 % en plasma y de entre 91,5 % y 98,3 % en suero para los nueve analitos. Se presentan los datos en la Tabla 17.

Tabla 17. Recuperación de analitos

Analito	Plasma	Suero
	% medio de recuperación	% medio de recuperación
N-acetiltreonina	89,9	94,3
fenilacetilglutamina	91,8	94,8
triptófano	96,4	91,5
creatinina	93,6	93,7
N-acetilalanina	89,5	95,4
3-metilhistidina	86,1	98,3
trans-4-hidroxiprolina	86,3	93,7
quinurenina	86,6	92,7
urea	96,1	93,2

D. Método cromatográfico 4 y método de EM/EM 4

El rendimiento analítico de la combinación de método cromatográfico 4 y método de EM/EM 4 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta tres analitos seleccionados del grupo que consistía en triptófano, C-glucosilriptófano y 3-indoxilsulfato en una sola inyección con un tiempo de ejecución de 3,30 minutos.

La precisión del método para medir triptófano y/o 3-indoxilsulfato fue evaluada en un lote representativo de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y seis réplicas para suero en tres tandas. La precisión entre tandas fue inferior a 4,4 % en plasma y a 5,8 % en suero. Se presentan los resultados en la Tabla 18.

Tabla 18. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=18)	% RSD entre tandas (n=18)
triptófano	10,8	3,2	14,5	5,8
3-indoxilsulfato	0,6	4,4	0,865	5,8

Se evaluaron la precisión y exactitud en el LIDC. La relación señal/ruido para cada analito fue superior a 5:1. Se analizaron seis réplicas de las muestras LIDC en tres tandas. Se incluyó un total de 18 réplicas del LIDC en los cálculos de % RSD y exactitud entre días para cada analito en cada matriz. La precisión entre tandas fue inferior a 7,8 % en plasma y a 8,3 % en suero. La exactitud entre tandas fue de entre 106 % y 107 % en plasma y de entre 93,5 % y 94,2 % en suero. Se presentan los datos en la Tabla 19.

Tabla 19. Precisión y exactitud entre tandas en el LIDC

Analito	Plasma (n=18)			Suero (n=18)		
	Media entre tandas (µg/ml)	% RSD entre tandas	Exactitud entre tandas (%)	Media entre tandas (µg/ml)	% RSD entre tandas	Exactitud entre tandas (%)
triptófano	0,212	7,8	106	0,212	8,3	94,2
3-indoxilsulfato	0,0	4,3	107	0,0319	7,7	93,5

Para evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, las muestras CC en suero y plasma fueron fortificadas con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron seis réplicas de las muestras de CC fortificadas junto con muestras de CC regulares por triplicado. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. La recuperación para triptófano se determinó que era de 97,7 % en plasma y 90,9 % en suero; la recuperación para 3-indoxilsulfato se determinó que era de 94,3 % en plasma y 96,3 % en suero.

#### E. Método de cromatografía 6 y método de EM/EM 5

El rendimiento analítico de la combinación del método de cromatografía 6 y el método de EM/EM 5 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta diez analitos seleccionados del grupo que consiste en meso-eritritol, D-arabitol, inositol, 3-indoxilsulfato, L-triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina, N-acetilreonina y N-acetilserina en una sola inyección con una duración de la electroforesis de 7,0 minutos.

La precisión del método para medir una pluralidad de diez analitos se evaluó en lotes representativos de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y suero en tres operaciones de electroforesis. Se presentan los resultados en la Tabla 20.

Tabla 20. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)
mesoeritritol	0,542	9,8	0,687	7,6
Arabitol	0,424	10,1	0,463	8,1
Inositol	3,59	6,2	3,57	6
Sulfato de 3-indoxilo	1,19	31,7	1	26,1
triptófano	11,5	3,4	13,6	3,2
fenilacetilglutamina	0,234	9,3	0,196	12,4
creatinina	8,37	4,7	8,42	6,3
pseudouridina	0,671	7,2	0,693	6,9

(continuación)

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)
N-acetiltreonina	0,06655	5,6	0,0647	7,3
N-acetilserina	0,118	8,6	0,125	11,3

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, las muestras de CC en suero y plasma fueron fortificadas con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron seis muestras de CC fortificadas junto con seis muestras de CC regulares en plasma y suero. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. La recuperación para los diez analitos se determinó que era superior al 90 % en plasma y suero.

#### F. Método de cromatografía 7 y método de EM/EM 5

El rendimiento analítico de la combinación del método de cromatografía 7 y el método de EM/EM 5 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta cinco analitos seleccionados del grupo que consistía en arabitol, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltreonina en una sola inyección con una duración de la electroforesis de 2,7 minutos.

La precisión del método para medir una pluralidad de cinco analitos se evaluó en lotes representativos de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y suero en tres operaciones de electroforesis. Se presentan los resultados en la Tabla 21.

Tabla 21. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)
Arabitol	0,488	12,2	0,527	10
Fenilacetilglutamina	0,249	8	0,199	10,8
Creatinina	8,32	3,7	8,4	3,2
Pseudouridina	0,662	8,3	0,697	7,5
N-acetiltreonina	0,0653	7,2	0,0621	6

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, las muestras de CC en suero y plasma fueron fortificadas con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron seis muestras de CC fortificadas junto con seis muestras de CC regulares en plasma y suero. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. La recuperación de los analitos fenilacetilglutamina, creatinina y pseudouridina se determinó que era superior al 90 % en plasma y suero; la recuperación de los analitos arabitol y N-acetiltreonina se determinó que era superior al 85 %.

#### G. Método de cromatografía 8 y método de EM/EM 5

El rendimiento analítico de la combinación del método de cromatografía 8 y el método de EM/EM 5 resultó en la cuantificación de una pluralidad de hasta seis analitos seleccionados del grupo que consistía en mio-inositol, triptófano, fenilacetilglutamina, creatinina, pseudouridina y N-acetiltreonina en una sola inyección con una duración de la electroforesis de 3,2 minutos.

La precisión del método para medir una pluralidad de seis analitos se evaluó en lotes representativos de plasma y suero. Se analizaron doce réplicas para plasma y suero en tres operaciones de electroforesis. Se presentan los resultados en la Tabla 22.

Tabla 22. Precisión entre tandas para una pluralidad de analitos en plasma y suero.

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)
Inositol	3,53	7,6	3,59	6,6
Triptófano	11,6	2,1	13,3	3,5
Fenilacetilglutamina	0,257	10,5	0,208	9,7

(continuación)

Analito	Plasma		Suero	
	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)	Media entre tandas (µg/ml) (n=36)	% RSD entre tandas (n=36)
Creatinina	8,33	3,9	8,42	4
Pseudouridina	0,658	7,5	0,698	6,6
N-acetiltreonina	0,066	8	0,0633	8,2

Con el fin de evaluar la recuperación de los analitos durante la extracción, las muestras de CC en suero y plasma fueron fortificadas con concentraciones conocidas de analitos. Se extrajeron y analizaron seis muestras de CC fortificadas junto con seis muestras de CC regulares en plasma y suero. La recuperación de la cantidad fortificada se calculó después de restar la cantidad en las muestras de CC fortificadas. La recuperación de los seis analitos se determinó que era superior al 90 % en plasma y suero.

## APÉNDICE A

TABLA A

Se muestran las combinaciones de 2, 3 y 4 analitos para el método 1

Se muestran las combinaciones de 2, 3, 4 y 5 analitos para el método 5

Se muestran las combinaciones de 2 analitos para los métodos 2, 3, 4, 6, 7 y 8

Método 8	Método 8				8													
Método 7	Método 7			7	7													
Método 6	Método 6											6						
Método 5	Método 5																	5
Método 4		4														4		
Método 3	Método 3				Método 3													
Método 2	2				Método 2													
Método 1	Método 1																	
	pseudouridina	N-acetilteonina	fenilacetilglutamina	triptófano	creatinina	meso-eritritol	arabitol	mio-inositol	N-acetilserina	N-acetilalanina	3-metilhistidina	trans-4-hidroxiprolina	quinurenina	urea	3-indoxilsulfato	C-glucosil triptófano	TMAP	
Combinación 1	X	X																
Combinación 2	X		X															
Combinación 3	X			X														
Combinación 4	X				X													
Combinación 5		X	X															
Combinación 6		X		X														
Combinación 7		X			X													
Combinación 8			X	X														
Combinación 9			X		X													
Combinación 10				X	X													
Combinación 11	X	X	X															
Combinación 12	X	X		X														
Combinación 13	X	X			X													
Combinación 15	X		X	X														
Combinación 16	X		X		X													
Combinación 14	X			X	X													
Combinación 17		X	X	X														
Combinación 18		X	X		X													
Combinación 19		X		X	X													
Combinación 20			X	X	X													
Combinación 21	X	X	X	X														
Combinación 22	X		X	X	X													
Combinación 23		X	X	X	X													
Combinación 24	X	X		X	X													

Combinación 25	X	X	X	X													
Combinación 26	X					X											
Combinación 27	X						X										
Combinación 28	X							X									
Combinación 29	X								X								
Combinación 30		X				X											
Combinación 31		X					X										
Combinación 32		X						X									
Combinación 33		X							X								
Combinación 34						X	X										
Combinación 35						X		X									
Combinación 36						X			X								
Combinación 37							X	X									
Combinación 38							X		X								
Combinación 39								X	X								
Combinación 40		X								X							
Combinación 41		X									X						
Combinación 42		X										X					
Combinación 43		X											X				
Combinación 44		X												X			
Combinación 45			X							X							
Combinación 46			X								X						
Combinación 47			X									X					
Combinación 48			X										X				
Combinación 49			X											X			
Combinación 50				X						X							
Combinación 51				X							X						
Combinación 52				X								X					
Combinación 53				X									X				
Combinación 54				X										X			
Combinación 55					X					X							
Combinación 56					X						X						
Combinación 57					X							X					
Combinación 58					X								X				
Combinación 59					X									X			
Combinación 60										X	X						
Combinación 61										X		X					
Combinación 62										X			X				
Combinación 63										X				X			
Combinación 64											X	X					
Combinación 65											X		X				
Combinación 66											X			X			
Combinación 67												X	X				
Combinación 68												X		X			
Combinación 69													X	X			
Combinación 70					X										X		
Combinación 71					X											X	

Combinación 72																		X	X	
Combinación 73	X	X																		
Combinación 74	X		X																	
Combinación 75	X			X																
Combinación 76	X				X															
Combinación 77	X																			X
Combinación 78		X	X																	
Combinación 79		X		X																
Combinación 80		X			X															
Combinación 81		X																		X
Combinación 82			X	X																
Combinación 83			X		X															
Combinación 84			X																	X
Combinación 85				X	X															
Combinación 86				X																X
Combinación 87					X															X
Combinación 88	X	X	X																	
Combinación 89	X	X		X																
Combinación 90	X	X			X															
Combinación 91	X	X																		X
Combinación 92	X		X	X																
Combinación 93	X		X		X															
Combinación 94	X		X																	X
Combinación 95	X			X	X															
Combinación 96	X			X																X
Combinación 97				X	X															X
Combinación 98		X	X	X																
Combinación 99		X	X		X															
Combinación 100		X	X																	X
Combinación 101		X		X	X															
Combinación 102		X		X																X
Combinación 103		X			X															X
Combinación 104			X	X	X															
Combinación 105			X	X																X
Combinación 106			X		X															X
Combinación 107				X	X															X
Combinación 108	X	X	X	X																
Combinación 109	X	X	X																	X
Combinación 110	X	X	X		X															
Combinación 111	X	X		X	X															
Combinación 112	X	X		X																X
Combinación 113	X	X			X															X
Combinación 114	X		X	X	X															
Combinación 115	X			X	X															X
Combinación 116	X		X		X															X
Combinación 117	X		X	X																X
Combinación 118		X	X	X	X															



Combinación 119		X	X	X													X
Combinación 120		X	X		X												X
Combinación 121			X	X	X												X
Combinación 122		X		X	X												X
Combinación 123	X	X	X	X	X												
Combinación 124	X	X	X	X													X
Combinación 125	X	X	X		X												X
Combinación 126	X	X		X	X												X
Combinación 127	X		X	X	X												X
Combinación 128		X	X	X	X												X
Combinación 129	X	X															
Combinación 130	X		X														
Combinación 131	X			X													
Combinación 132	X				X												
Combinación 133	X					X											
Combinación 134	X						X										
Combinación 135	X							X									
Combinación 136	X								X								
Combinación 137	X														X		
Combinación 138		X	X														
Combinación 139		X		X													
Combinación 140		X			X												
Combinación 141		X				X											
Combinación 142		X					X										
Combinación 143		X						X									
Combinación 144		X							X								
Combinación 145		X														X	
Combinación 146			X	X													
Combinación 147			X		X												
Combinación 148			X			X											
Combinación 149			X				X										
Combinación 150			X					X									
Combinación 151			X						X								
Combinación 152			X													X	
Combinación 153				X	X												
Combinación 154				X		X											
Combinación 155				X			X										
Combinación 156				X				X									
Combinación 157				X					X								
Combinación 158				X												X	
Combinación 159					X	X											
Combinación 160					X		X										
Combinación 161					X			X									
Combinación 162					X				X								
Combinación 163					X											X	
Combinación 164						X	X										
Combinación 165						X		X									

Combinación 166						X			X								
Combinación 167						X										X	
Combinación 168							X	X									
Combinación 169							X		X								
Combinación 170							X									X	
Combinación 171								X	X								
Combinación 172								X								X	
Combinación 173									X							X	
Combinación 174	X	X															
Combinación 175	X		X														
Combinación 176	X				X												
Combinación 177	X						X										
Combinación 178		X	X														
Combinación 179		X			X												
Combinación 180		X					X										
Combinación 181			X		X												
Combinación 182			X				X										
Combinación 183					X		X										
Combinación 184	X	X															
Combinación 185	X		X														
Combinación 186	X				X												
Combinación 187	X				X												
Combinación 188	X							X									
Combinación 189		X	X														
Combinación 190		X			X												
Combinación 191		X			X												
Combinación 192		X						X									
Combinación 193			X	X													
Combinación 194			X		X												
Combinación 195			X					X									
Combinación 196					X	X											
Combinación 197					X			X									
Combinación 198					X			X									

## REIVINDICACIONES

1. Método para detectar y determinar en una muestra, mediante espectrometría de masas utilizando una única inyección, la cantidad de cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en N-acetiltreonina, fenilacetilglutamina, triptófano, creatinina y pseudouridina, en donde el método comprende:

- a) someter la muestra a una fuente de ionización bajo condiciones adecuadas para fragmentar un ion padre y producir uno o más iones hijo detectables mediante espectrometría de masas de cada uno de los cinco analitos, donde los analitos no se derivatizan antes de la ionización y donde la muestra ha sido purificada mediante cromatografía líquida antes de ser sometida a la fuente de ionización,
- b) medir, mediante espectrometría de masas, la cantidad del ion o iones hijo de cada uno de los cinco analitos, y
- c) utilizar la cantidad medida del ion o iones hijo para determinar la cantidad de cada uno de los cinco analitos en la muestra,
- donde, en el caso de que el espectrómetro de masas se opere en modo positivo, el ion padre y el ion o iones hijo se seleccionan de:

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
N-Acetil-DL-treonina	162,0 $\pm$ 0,5	74,1 $\pm$ 0,5	144,0, 126,1, 119,9, 116,1, 102,0, 97,9, 84,0, 70,0, 57,0, 56,0, 43,0, 28,1
fenilacetilglutamina	265,0 $\pm$ 0,5	91,0 $\pm$ 0,5	248,1, 219,1, 147,1, 136,0, 130,0, 129,1, 101,1, 84,0, 83,0, 65,0, 56,0, 50,9, 44,0, 40,9, 39,1, 28,0
Creatinina	113,9 $\pm$ 0,5	43,0 $\pm$ 0,5	86,0, 72,0, 44,1, 42,0, 28,1
L-triptófano	205,0 $\pm$ 0,5	146,0 $\pm$ 0,5	188,1, 170,0, 159,1, 144,0, 143,0, 142,0, 140,0, 132,0, 130,1, 128,1, 126,9, 117,9, 116,9, 114,9, 103,0, 91,0, 89,9, 89,0, 77,0, 74,9, 74,0, 64,9, 63,0, 62,0, 61,0, 50,9, 49,9, 39,2, 28,0
pseudouridina	244,9 $\pm$ 0,5	191,0 $\pm$ 0,5	209,0, 179,0, 167,0, 163,0, 154,8, 151,0, 148,0, 139,0, 125,0, 120,0, 111,8, 109,8, 107,8, 96,0, 92,0, 84,0, 82,0, 80,0, 68,0, 65,2, 55,0, 54,0, 43,0, 41,0, 39,0

donde, en el caso de que el espectrómetro de masas se opere en modo negativo, el ion padre y el ion o iones hijo se seleccionan de:

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
Pseudouridina	242,9 $\pm$ 0,5	42,0 $\pm$ 0,5 o 153,0 $\pm$ 0,5	182,8, 151,9, 139,9, 138,9, 124,0, 110,8, 109,9, 96,0, 82,0, 55,0, 41,0
Acetil-L-treonina	159,9 $\pm$ 0,5	73,9 $\pm$ 0,5	118,1, 115,8, 97,9, 71,9, 70,9, 70,1, 56,1, 54,0, 42,0, 40,9, 26,0
L-Triptófano	202,9 $\pm$ 0,5	115,9 $\pm$ 0,5	185,9, 158,9, 141,9, 130,0, 74,1, 72,2, 59,0, 44,9
Fenilacetilglutamina	262,9 $\pm$ 0,5	42 $\pm$ 0,5	
Creatinina	111,9 $\pm$ 0,5	67,9 $\pm$ 0,5	

2. Método según la reivindicación 1, en el que el método detecta y determina, además, la cantidad de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en TMAP, meso-eritritol, arabitól, mio-inositol, N-acetilserina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, trans-4-hidroxi-prolina, quinurenina, urea, C-glucosil triptófano, 3-indoxilsulfato y combinaciones de los mismos,

donde, en el caso de que el espectrómetro de masas se opere en modo positivo, el ion padre y el ion o iones hijo se seleccionan de:

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos $\pm 0,5$ )
TMAP	229,1 $\pm$ 0,5	142,2 $\pm$ 0,5 o 70,0 $\pm$ 0,5	170,1, 126,0, 124,0, 116,0, 114,0, 98,0, 96,0, 68,0, 60,0, 59,1, 58,1, 54,9
N-Acetil-L-alanina	131,9 $\pm$ 0,5	89,9 $\pm$ 0,5	114,1, 86,1, 44,0
3-Metil-L-histidina	170,0 $\pm$ 0,5	94,9 $\pm$ 0,5	109,1, 97,0, 96,0, 92,9, 83,0, 81,0, 80,1, 70,2, 67,9, 67,0, 55,0, 54,0, 42,0, 41,0

<i>trans</i> -4-Hidroxi-L-prolina	131,9±0,5	68,0±0,5	114,2, 86,0, 58,0, 41,0
L-quinurenina	209,0±0,5	94,0±0,5	192,1, 191,2, 174,0, 164,1, 163,1, 150,0, 146,1, 136,0, 119,9, 118,1, 98,9, 88,0, 73,9
Urea	60,9±0,5	29,2±0,5	44,0, 43,0, 42,1, 28,0, 27,1

donde, en el caso de que el espectrómetro de masas se opere en modo negativo, el ion padre y el ion o iones hijo se seleccionan de:

Analito	Ion padre (m/z)	Ion hijo para la cuantificación (m/z)	Iones hijo adicionales (m/z) (todos ±0,5)
<i>meso</i> -Eritritol	120,9±0,5	88,9±0,5	120,0, 119,0, 105,9, 103,0, 100,9, 93,9, 92,8, 79,9, 77,0, 70,9, 67,9, 65,8, 65,0, 58,9, 52,0, 43,2, 40,0
D-Arabitól	150,9±0,5	88,9±0,5	149,1, 136,0, 133,0, 131,1, 119,0, 112,8, 108,2, 103,1, 100,9, 96,8, 91,8, 84,9, 83,0, 81,9, 78,8, 77,0, 73,0, 70,9, 68,9, 66,9, 59,0, 57,0, 55,0, 45,0, 42,9, 41,2
<i>mio</i> -Inositol	178,9±0,5	87,0±0,5	177,2, 161,0, 159,0, 146,8, 141,0, 134,9, 128,8, 125,0, 122,7, 117,0, 112,8, 110,9, 100,9, 98,9, 97,0, 95,0, 90,8, 89,0, 85,0, 82,9, 81,0, 78,8, 74,8, 73,1, 70,9, 68,9, 59,0, 56,9, 55,0, 45,1, 43,0, 41,0
N-acetilserina	145,9±0,5	74,0±0,5	119,0, 116,0, 104,9, 103,9, 103,0, 97,9, 84,0, 81,0, 72,0, 70,0, 64,9, 60,8, 57,0, 42,0, 40,9
3-indoxilsulfato	211,8±0,5	79,9±0,5 o 103,9±0,5	132,0, 80,9, 77,0
Mano-L-triptófano	365,2±0,5	245,0±0,5	130,0, 142,0, 156,0, 116,0

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el espectrómetro de masas se opera en modo positivo.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el método detecta y determina, además, la cantidad de uno o más analitos seleccionados del grupo consistente en TMAP, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, *trans*-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea y combinaciones de los mismos.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el espectrómetro de masas se opera en modo negativo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo de ejecución es de 7 minutos o inferior.
7. Método según la reivindicación 2, en el que el método detecta y determina, además, la cantidad de *mio*-inositol.
8. Método según la reivindicación 2, en el que el método detecta y determina, además, la cantidad de *meso*-eritritol, arabitól, *mio*-inositol, 3-indoxilsulfato y N-acetilserina.
9. Kit que comprende uno o más análogos isotópicamente marcados como patrones internos para cada uno de los cinco analitos seleccionados del grupo que consiste en N-aciltreonina, pseudouridina, fenilacetilglutamina, triptófano y creatinina, y material de empaquetamiento e instrucciones para utilizar el kit.
10. Kit según la reivindicación 9, en el que los uno o más patrones internos comprenden N-acetil-d<sub>3</sub>-DL-treonina-d<sub>2</sub>, fenilacetilglutamina-ds, L-triptófano-ds, creatinina-d<sub>3</sub> o pseudouridina-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub>.
11. Kit según la reivindicación 9 o 10, en el que el kit comprende, además, uno o más análogos isotópicamente marcados como patrones internos para cada uno del analito o analitos seleccionados del grupo que consiste en TMAP, *meso*-eritritol, arabitól, *mio*-inositol, N-acetilserina, N-acetilalanina, 3-metilhistidina, *trans*-4-hidroxiprolina, quinurenina, urea, C-glucosiltryptófano, 3-indoxilsulfato y combinaciones de los mismos.
12. Kit según la reivindicación 11, en el que el patrón o patrones internos comprenden <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-L,L-TMAP, eritritol-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, D-arabitol-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, *mio*-inositol-d<sub>6</sub>, acetilserina-d<sub>3</sub>, N-acetil-L-alanina-d<sub>4</sub>, 3-metil-L-histidina-d<sub>3</sub>, *trans*-4-hidroxi-L-prolina-d<sub>3</sub>, quinurenina-d<sub>6</sub>, urea-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, 2-(α-D-manopiranosil)-L-triptófano-d<sub>4</sub> o 3-indoxilsulfato-d<sub>4</sub>.

Fig. 1A

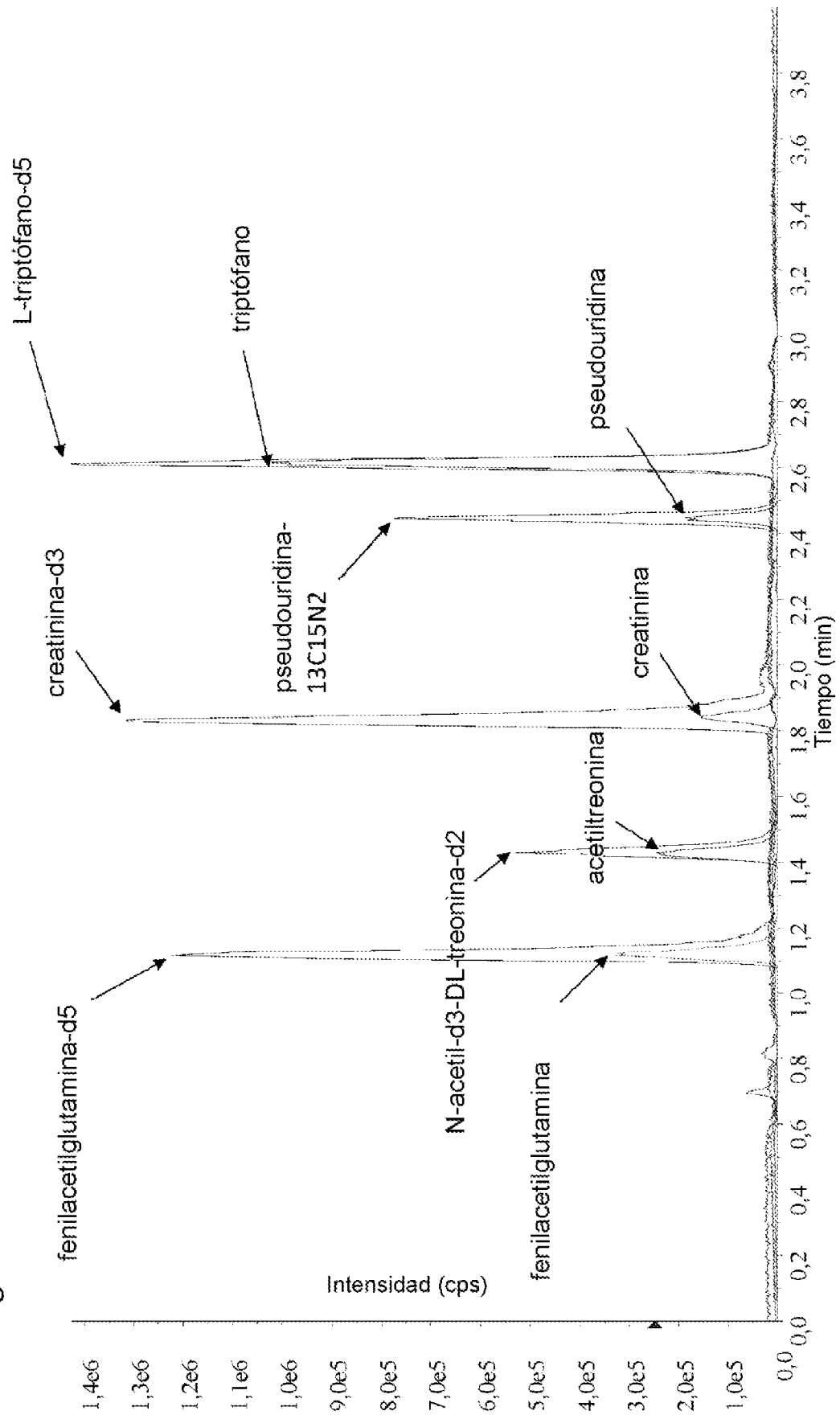


Fig. 1B

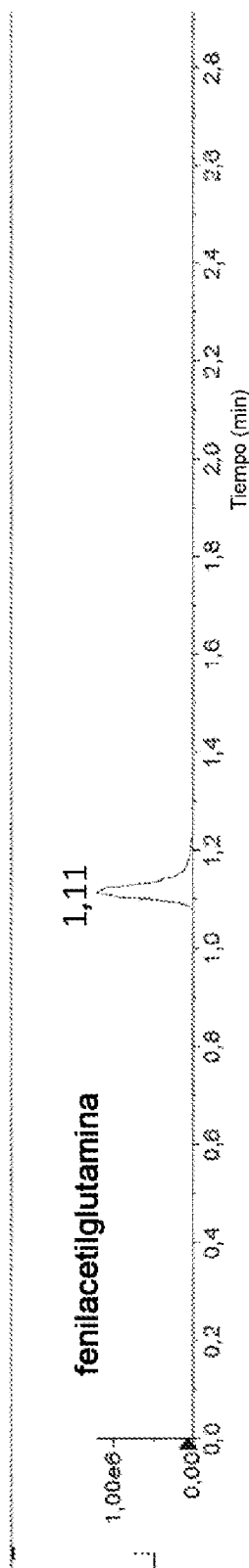


Fig. 1C

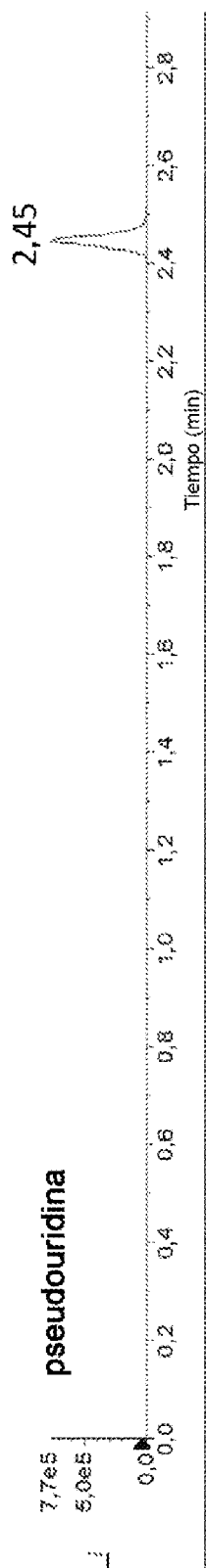


Fig. 1D

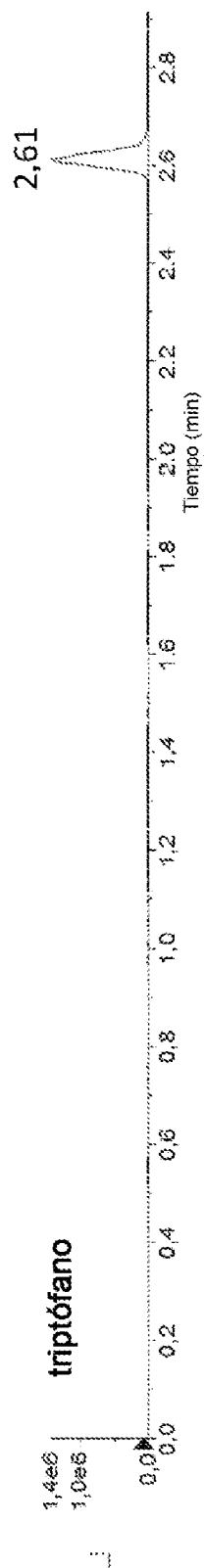


Fig. 1E

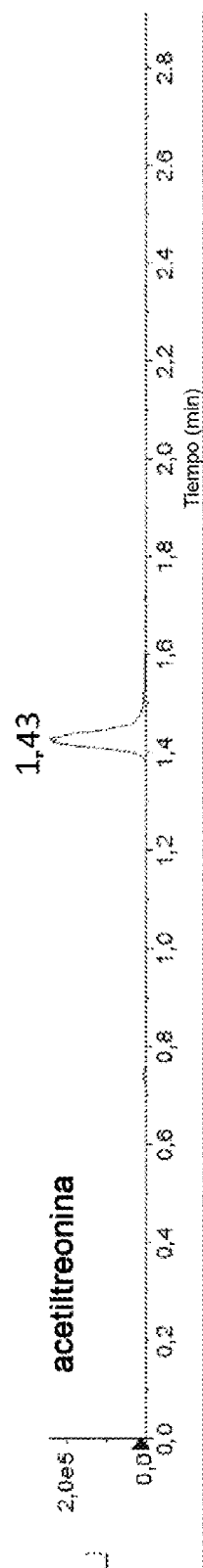
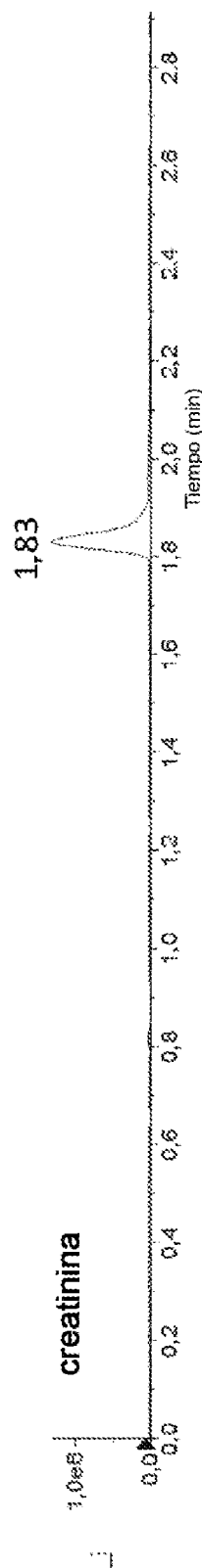
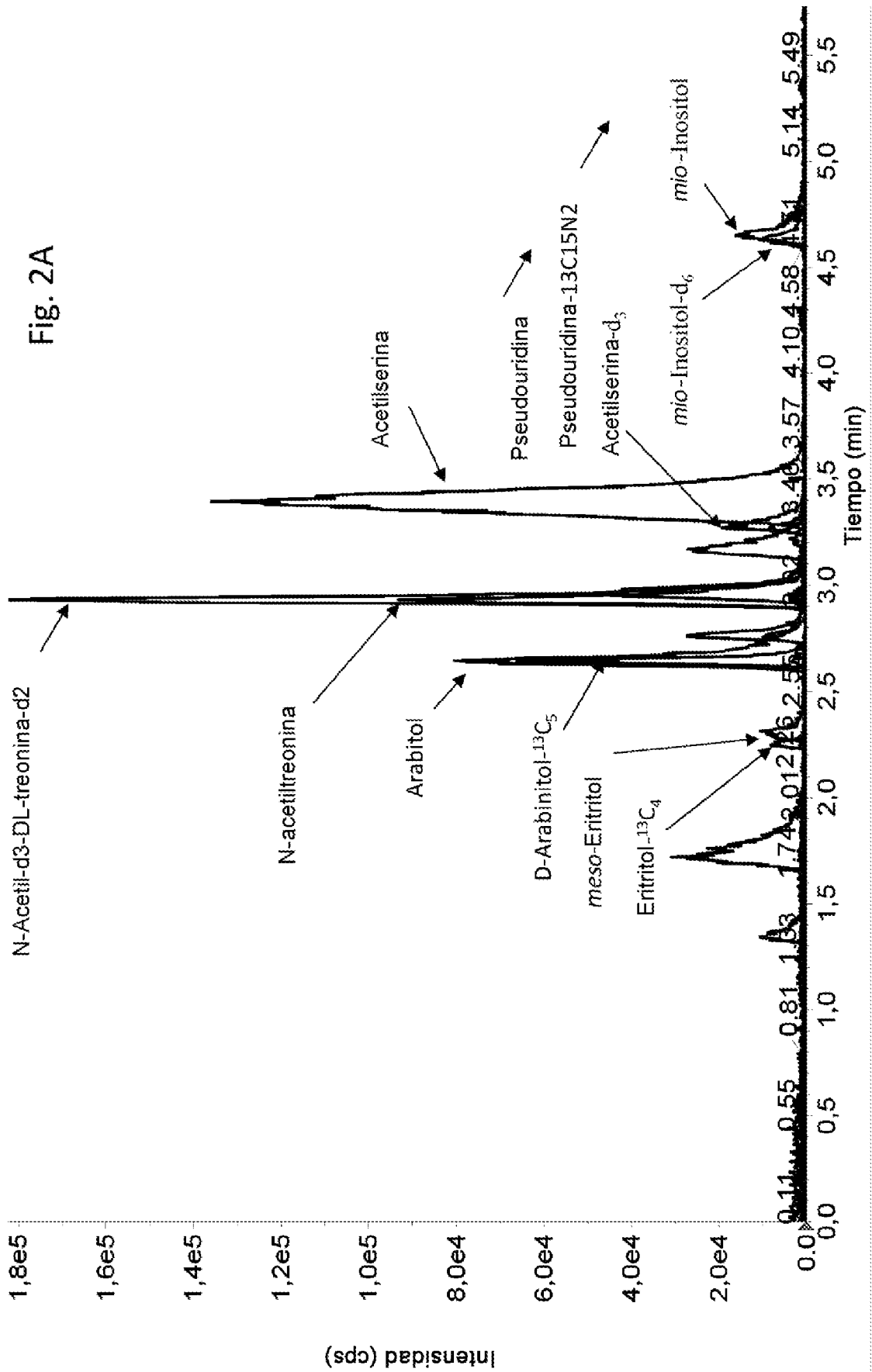


Fig. 1F





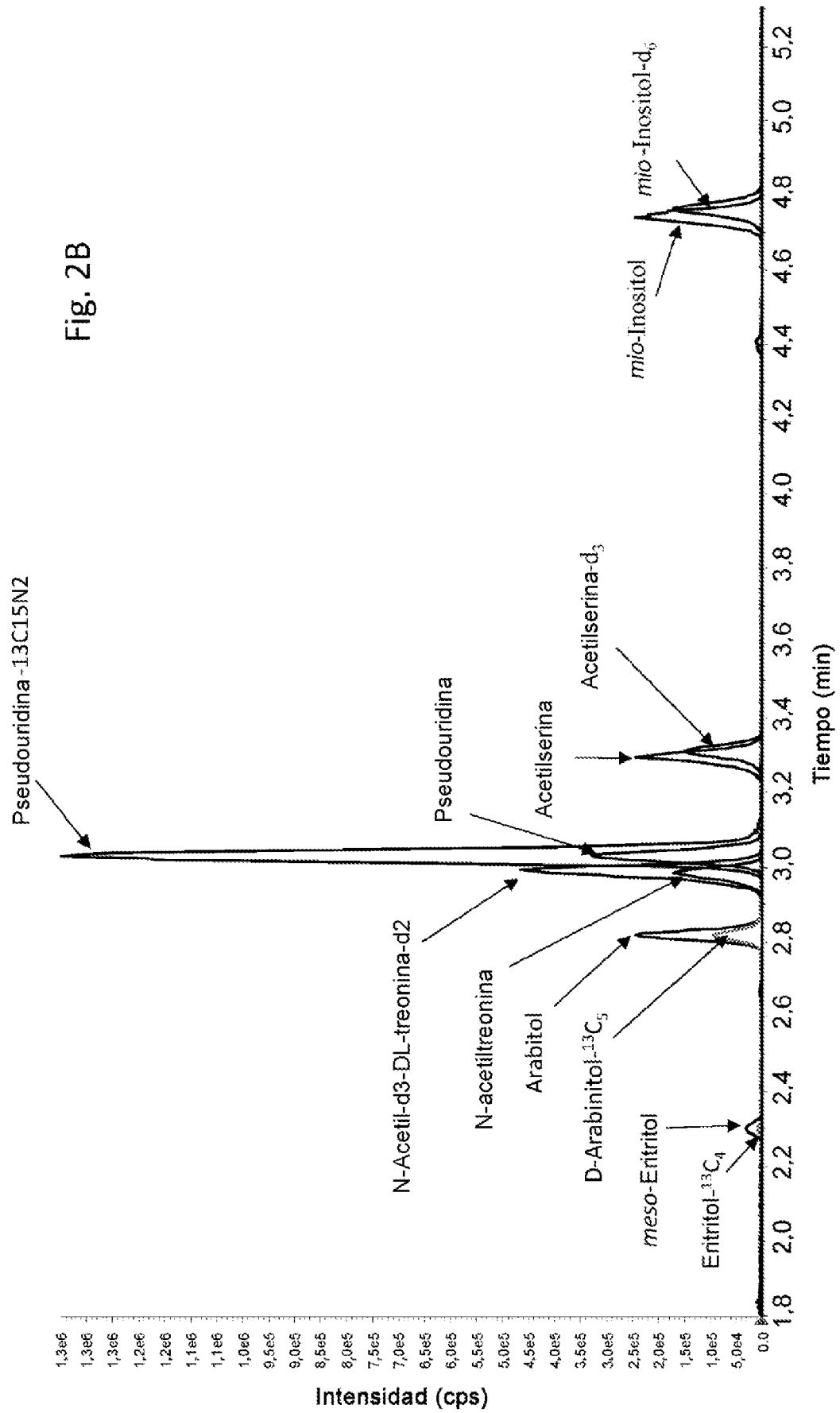




Fig. 2C

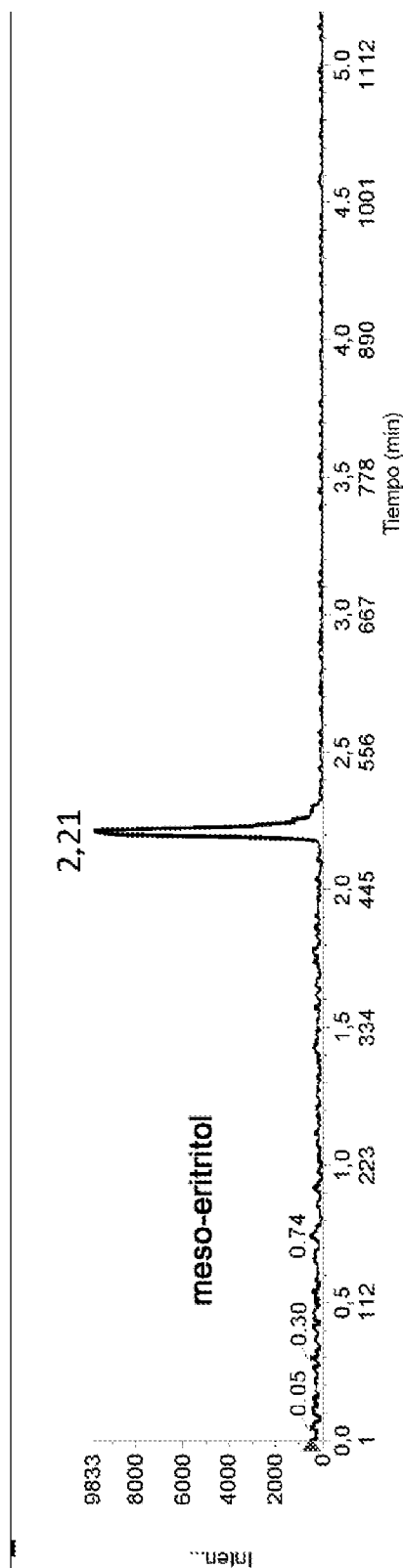


Fig. 2D

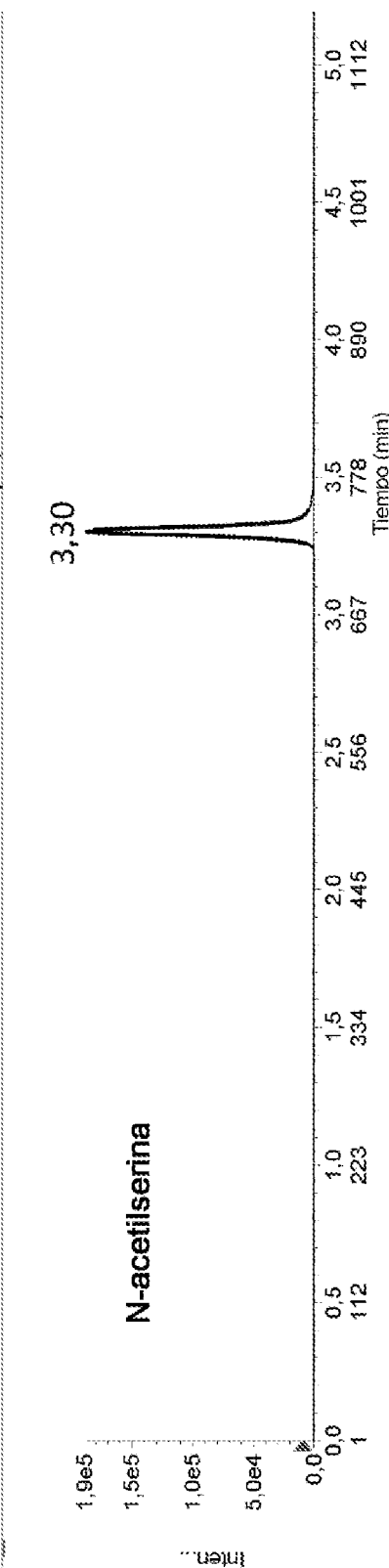
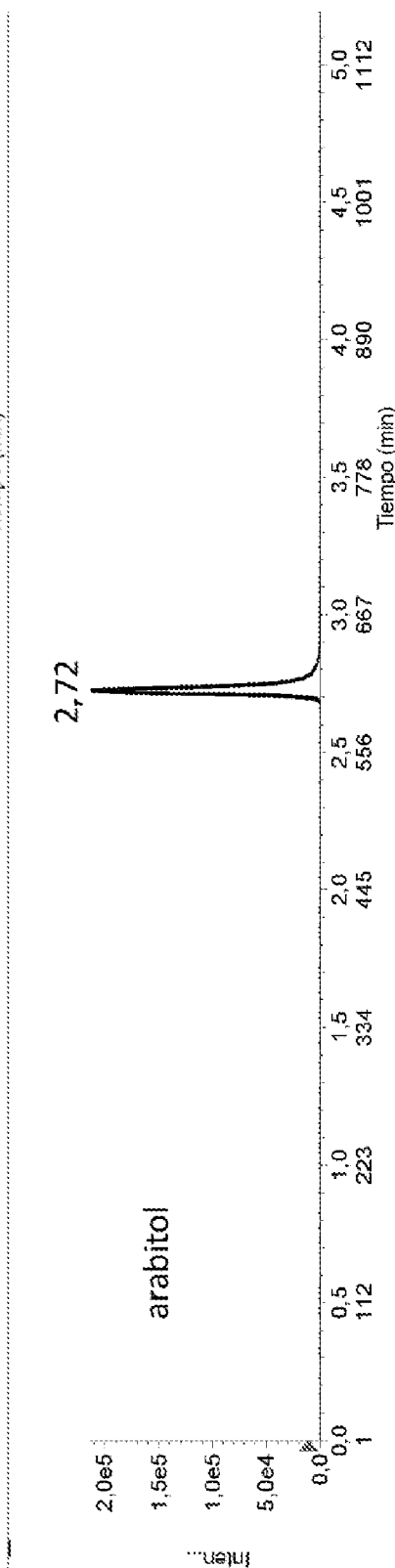
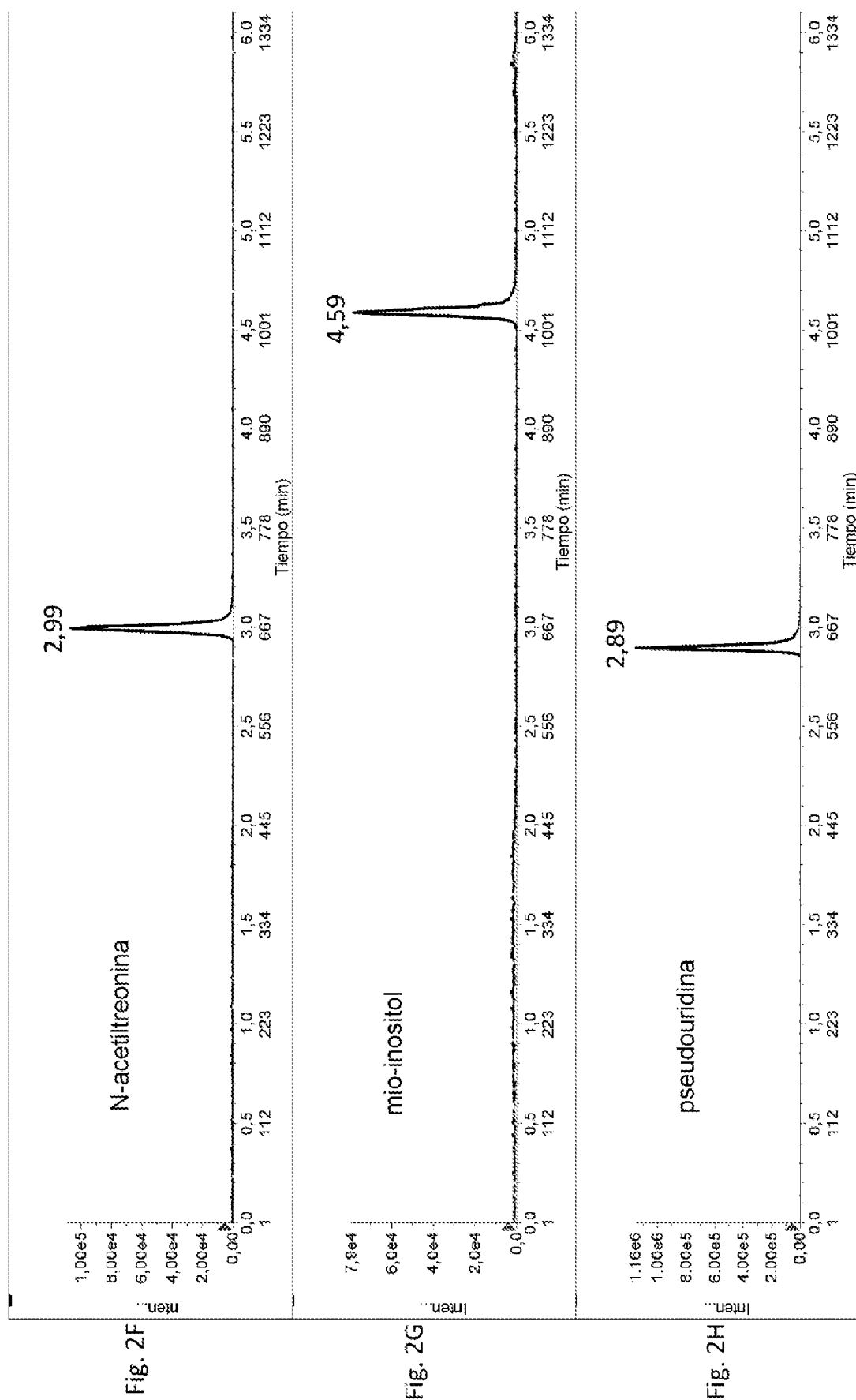
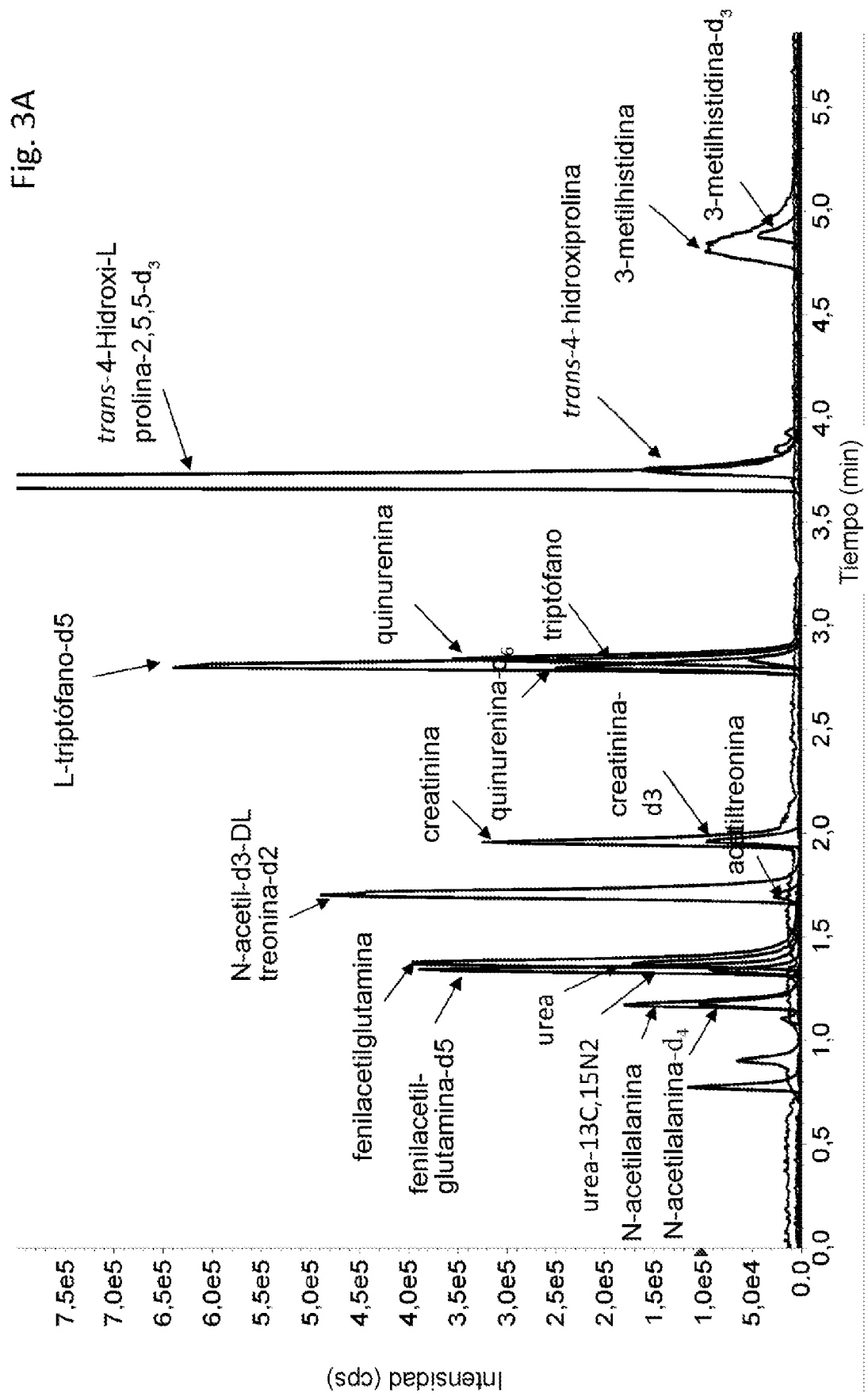
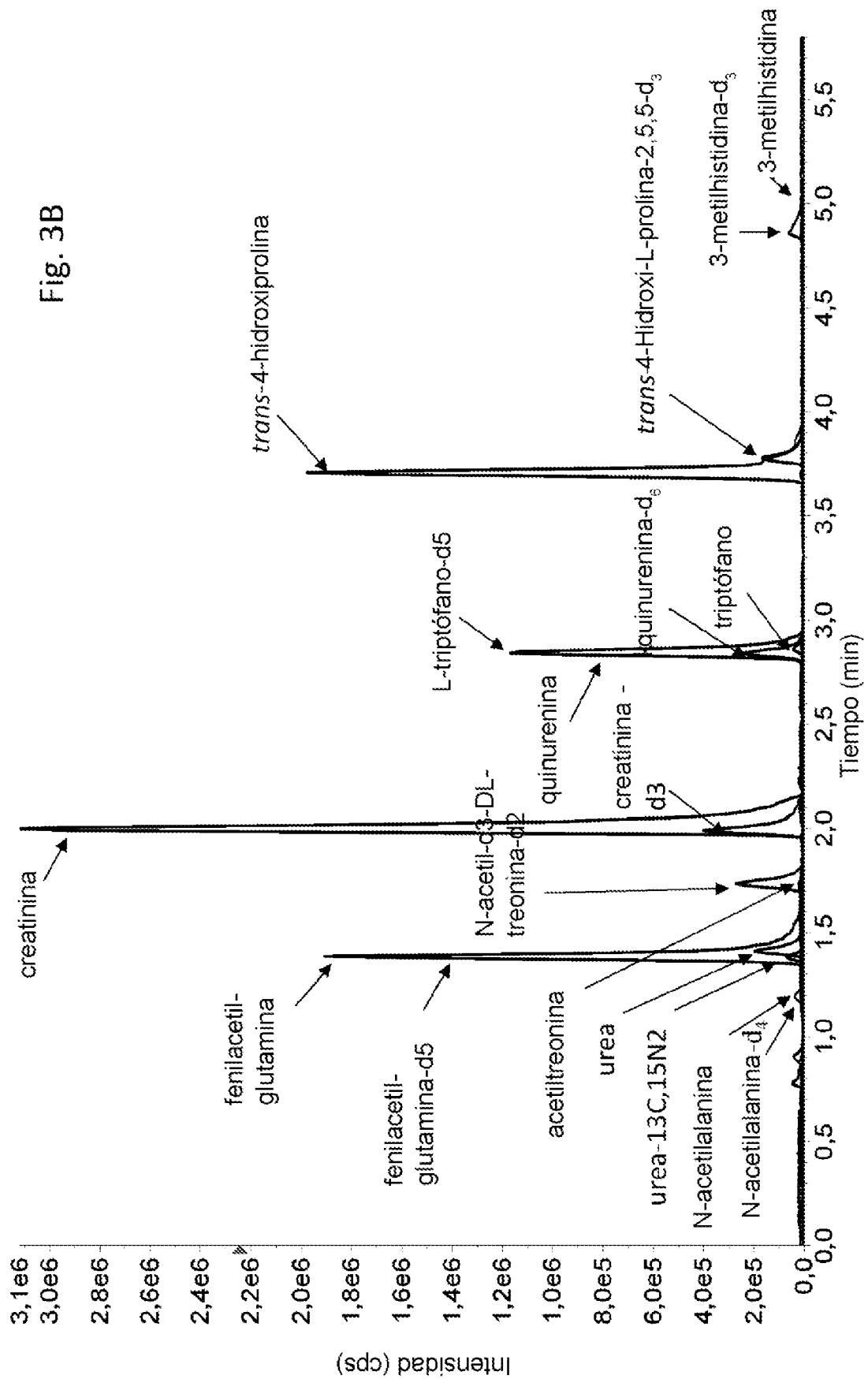


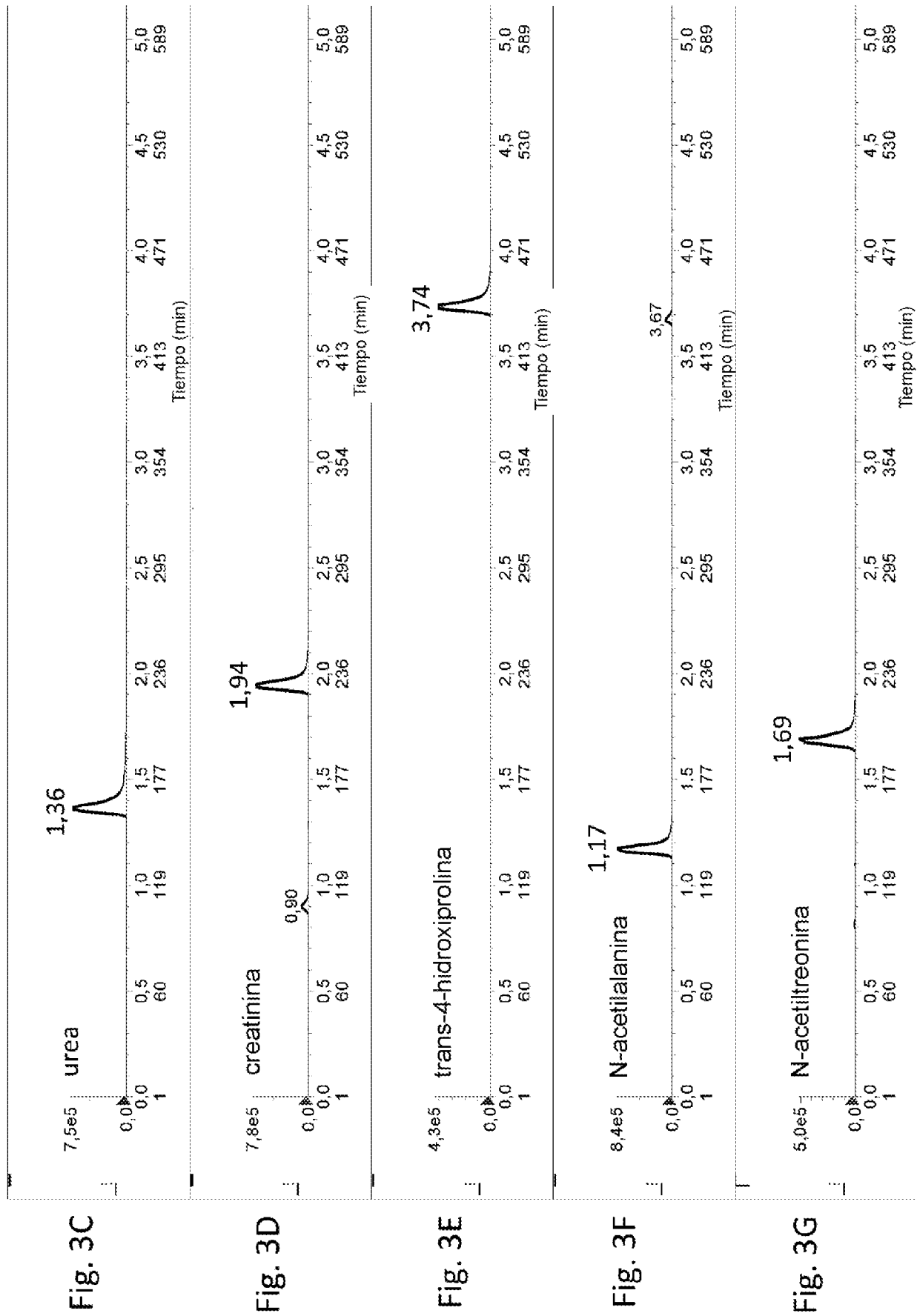
Fig. 2E

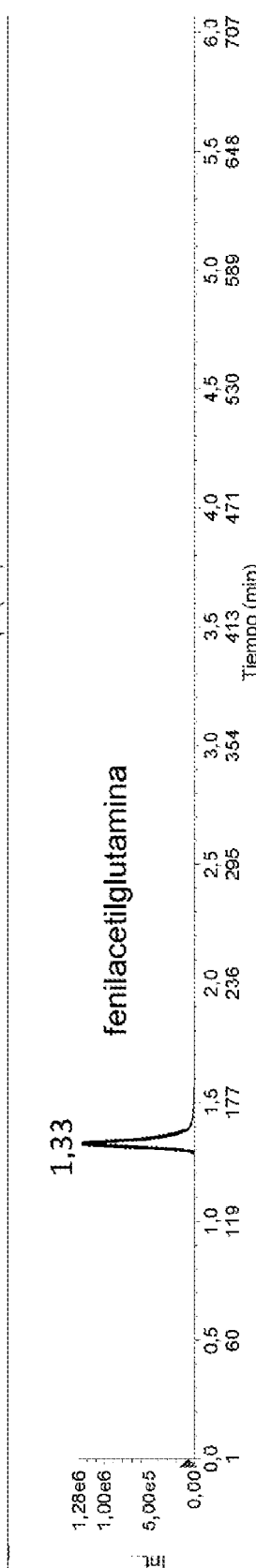
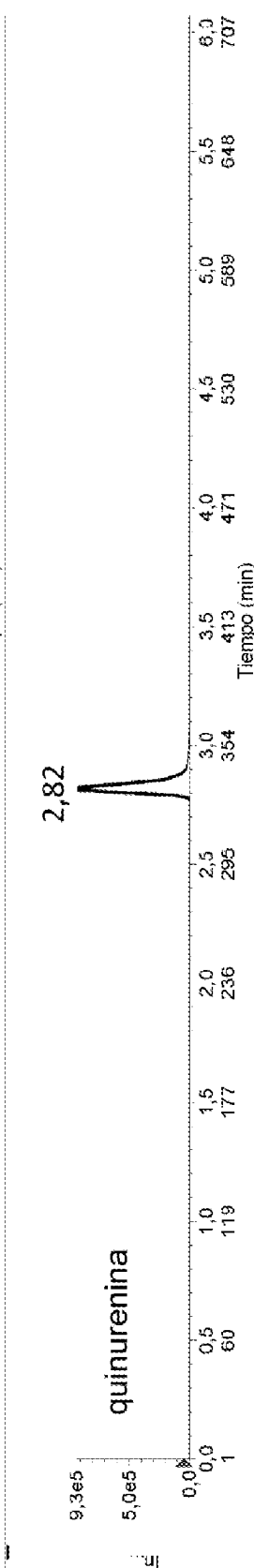
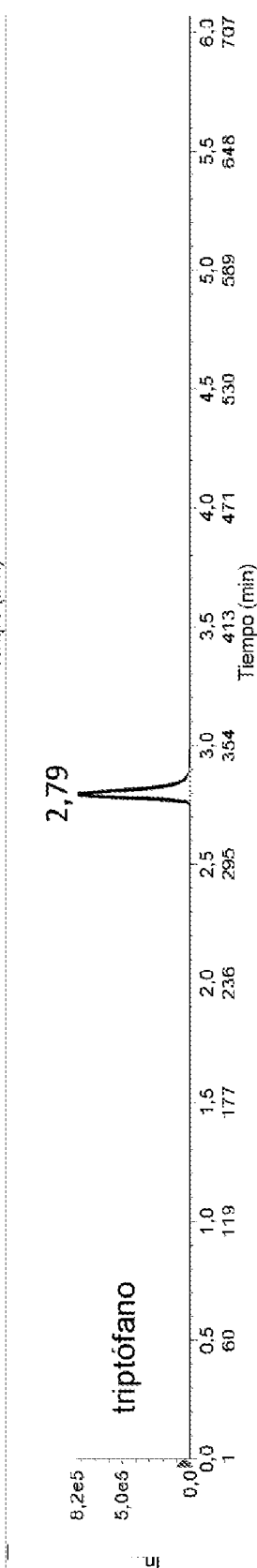
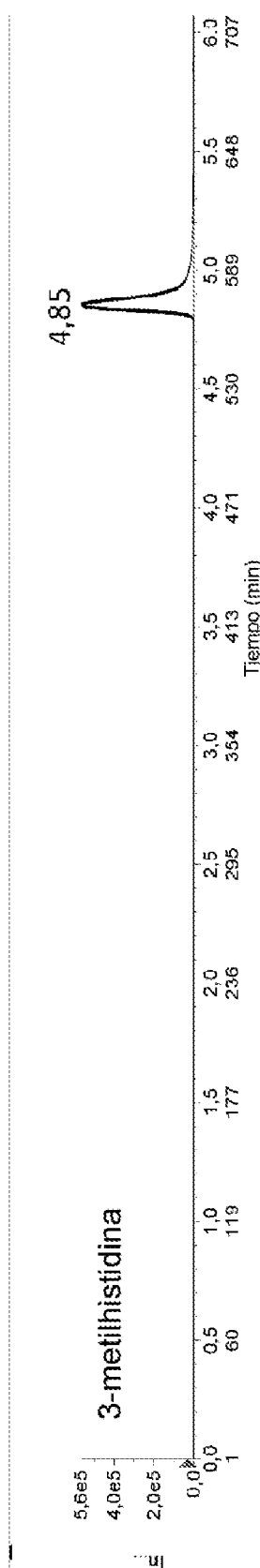


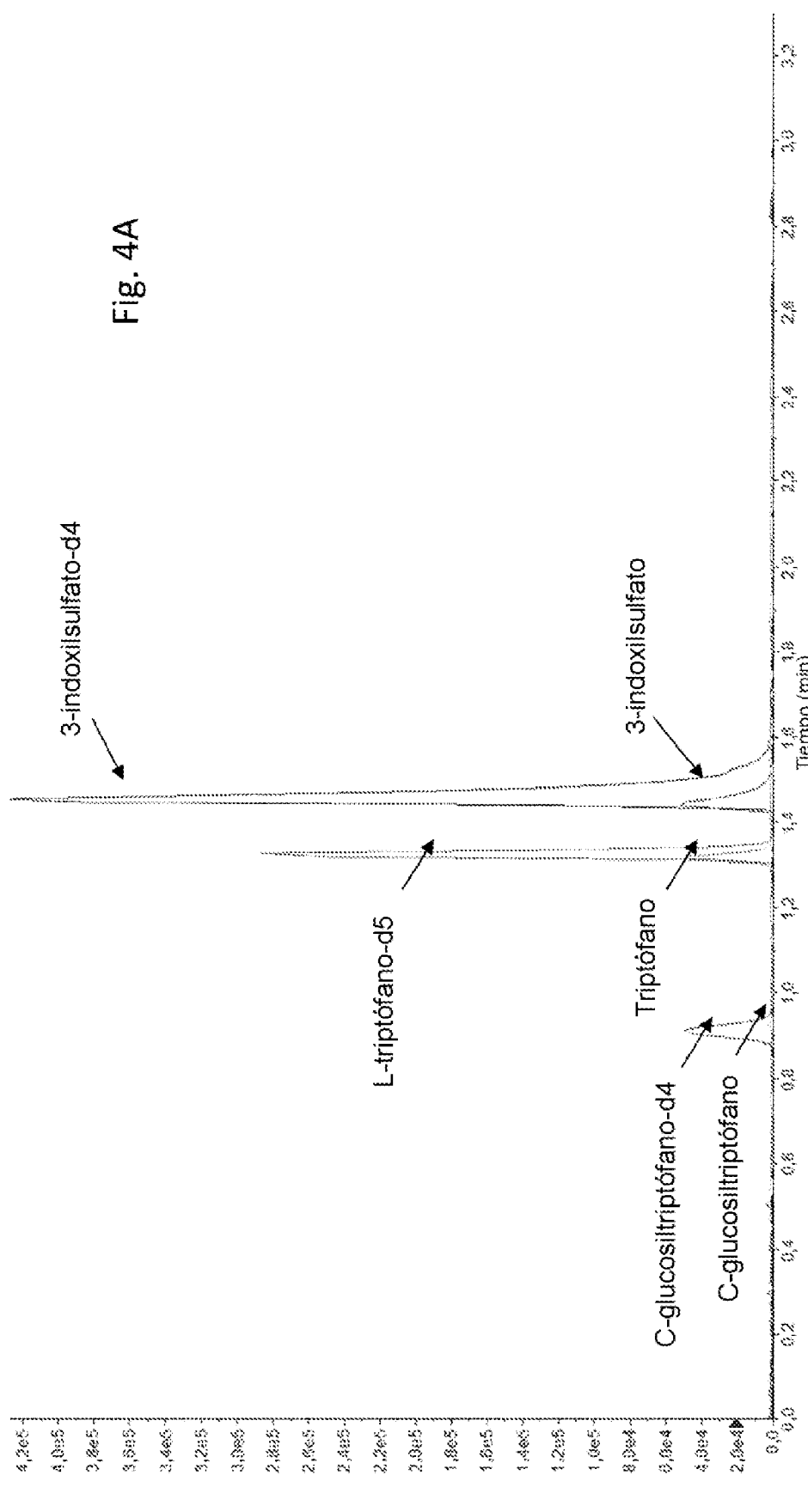


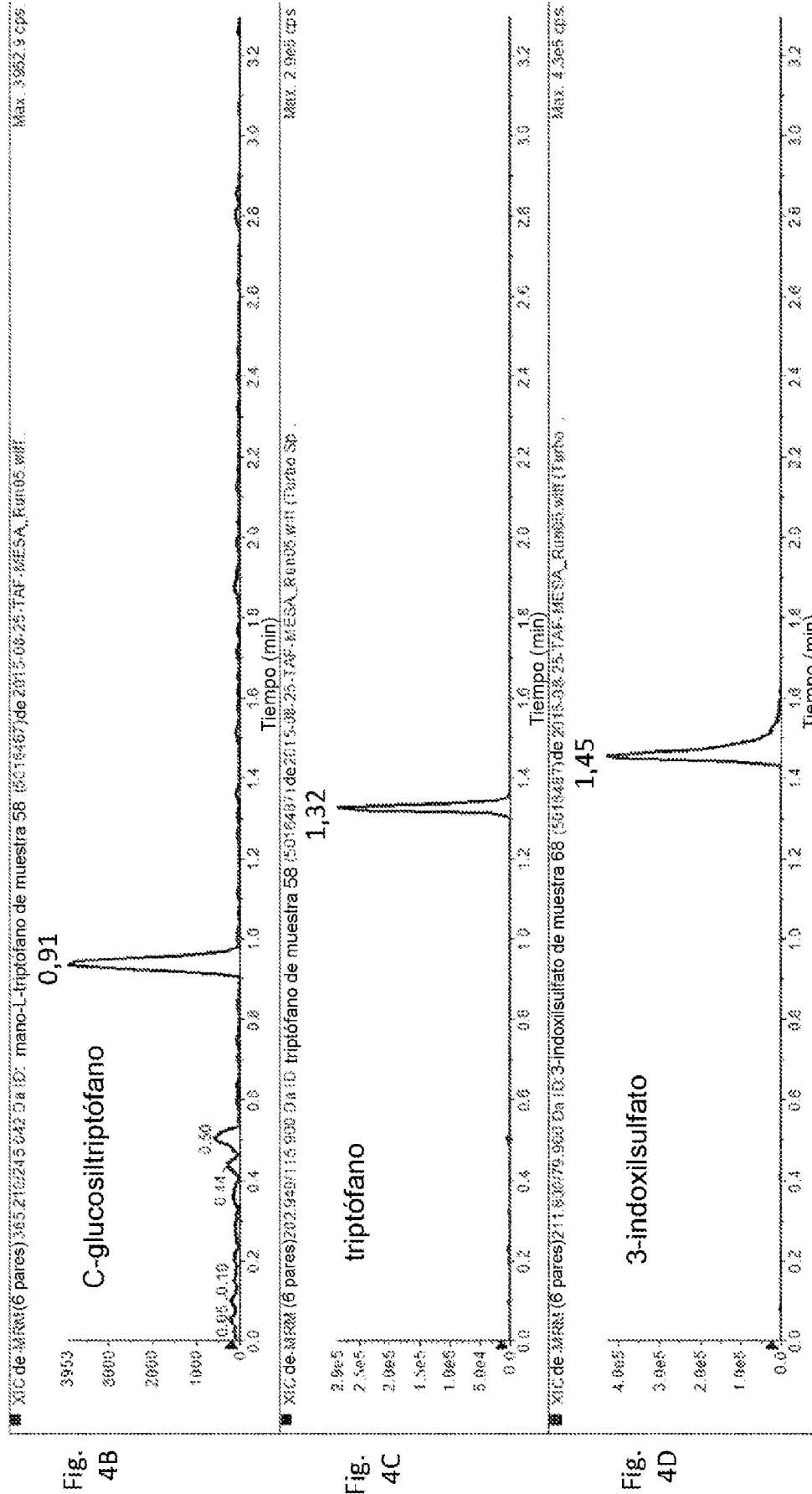




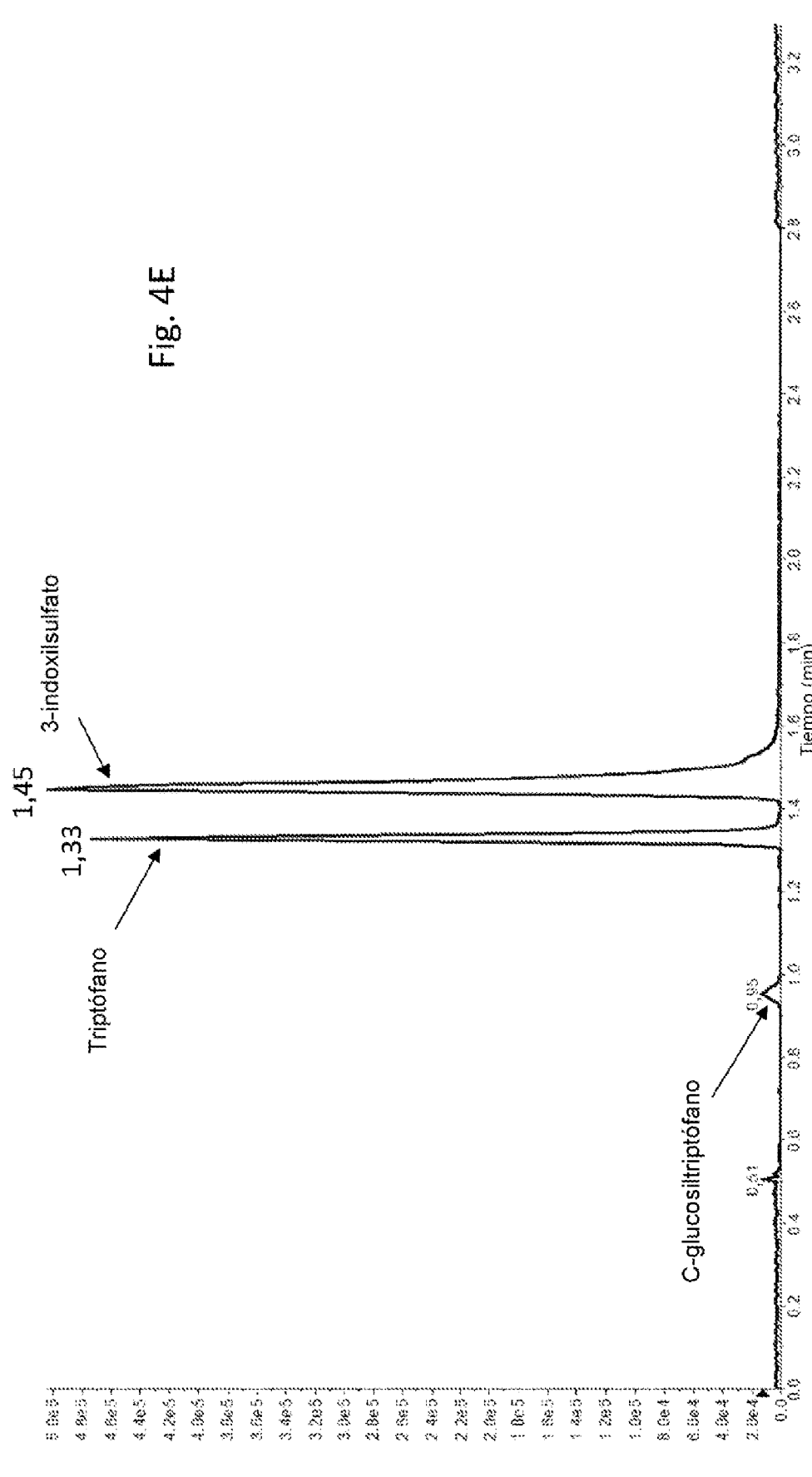


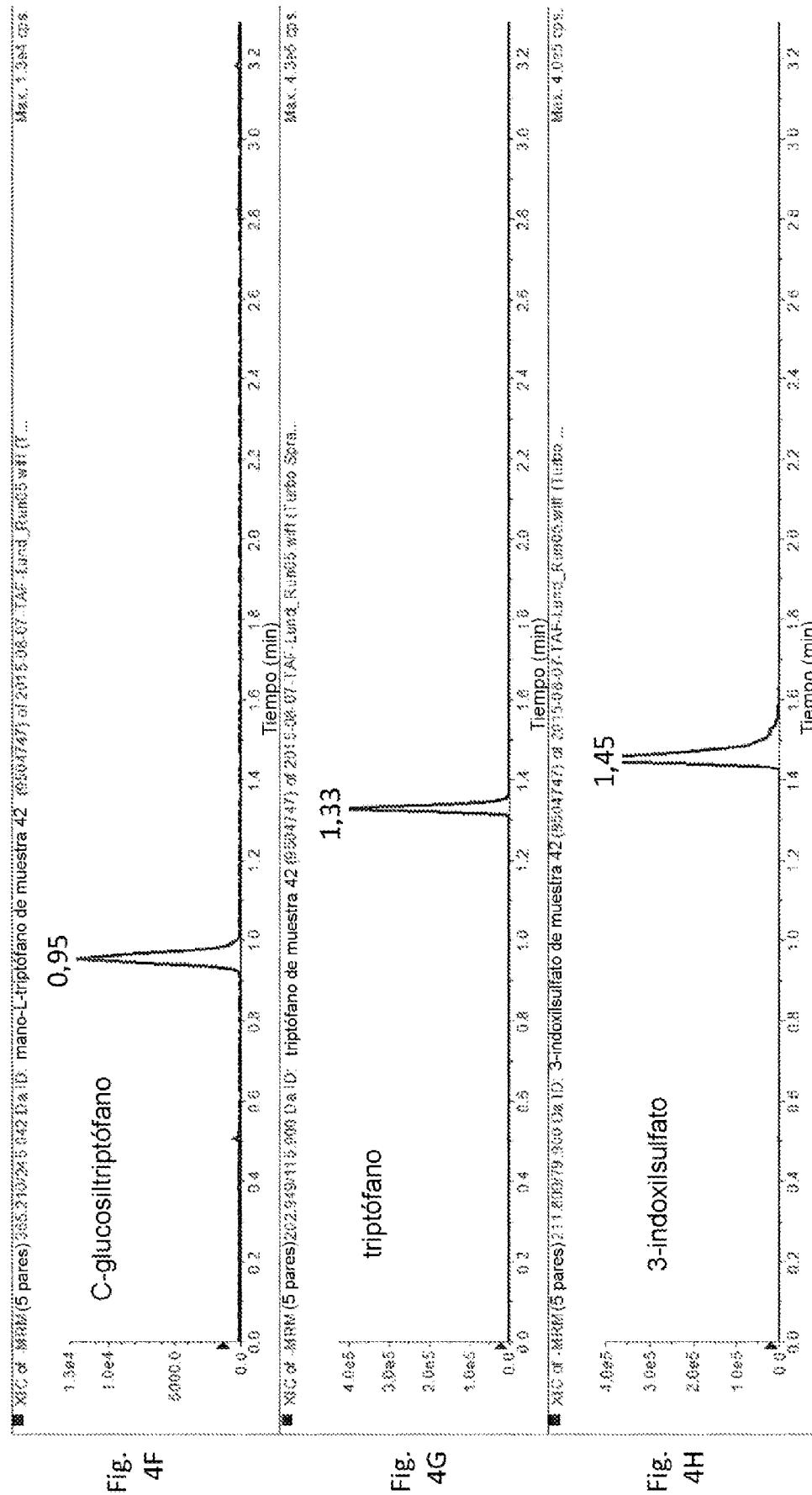


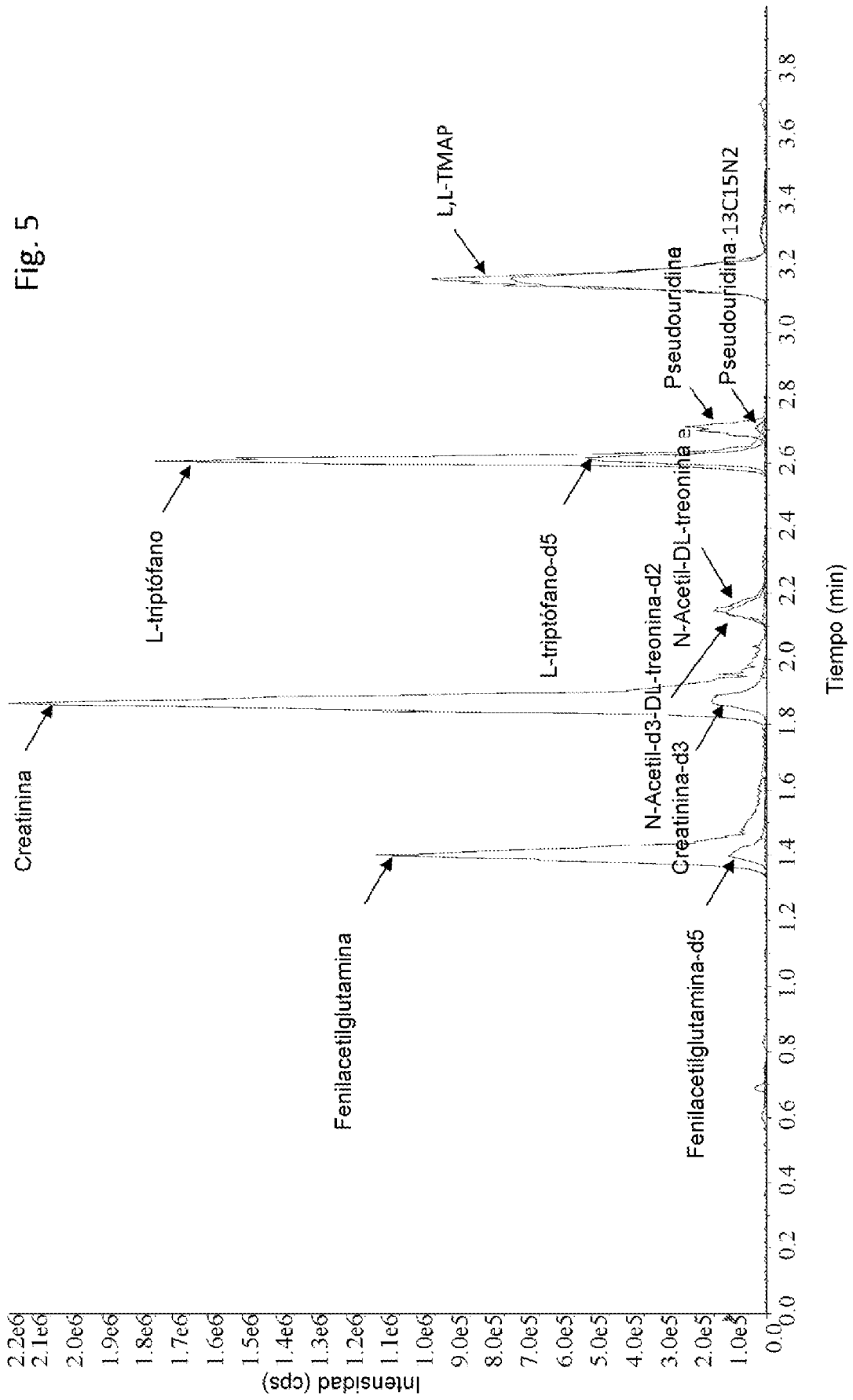


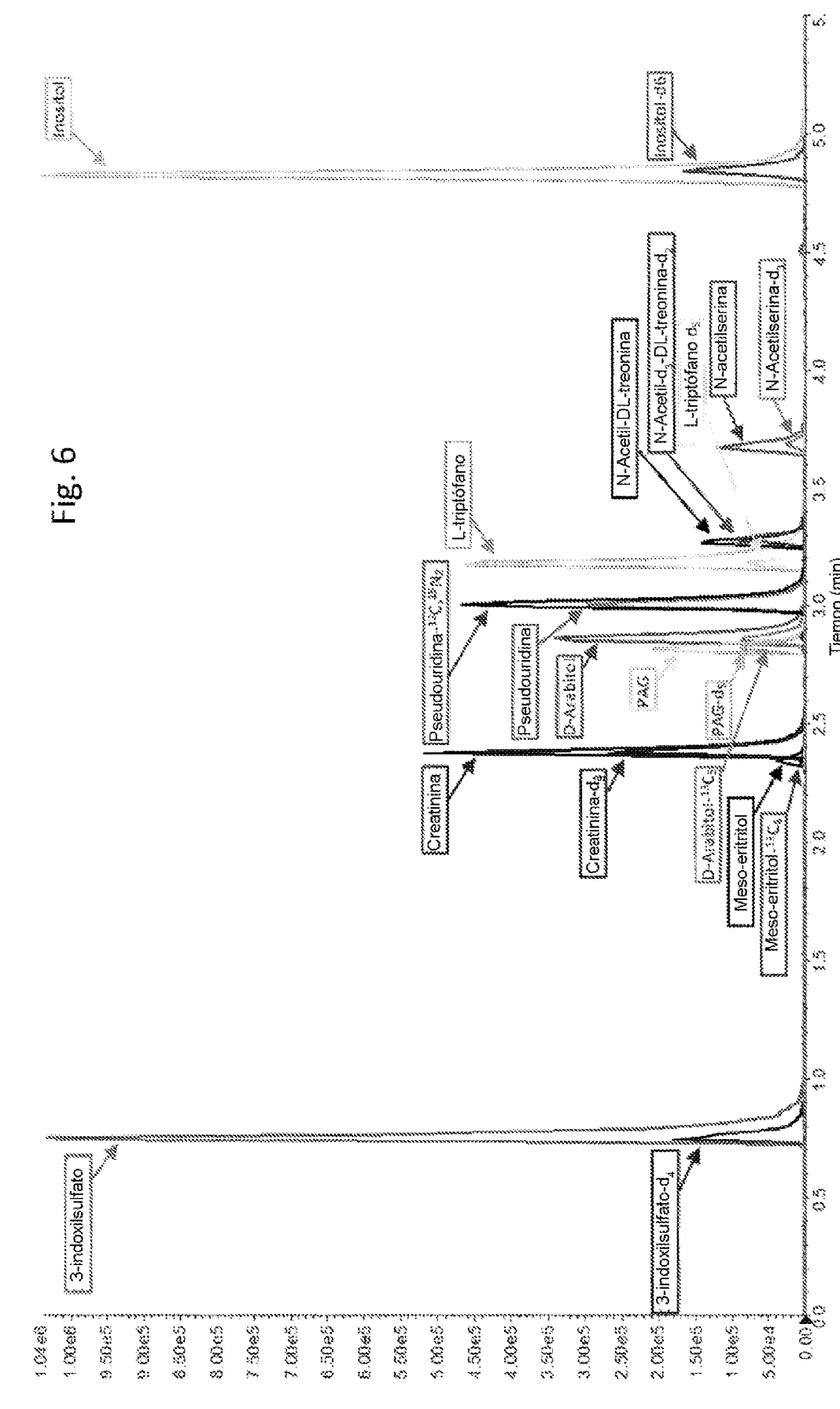












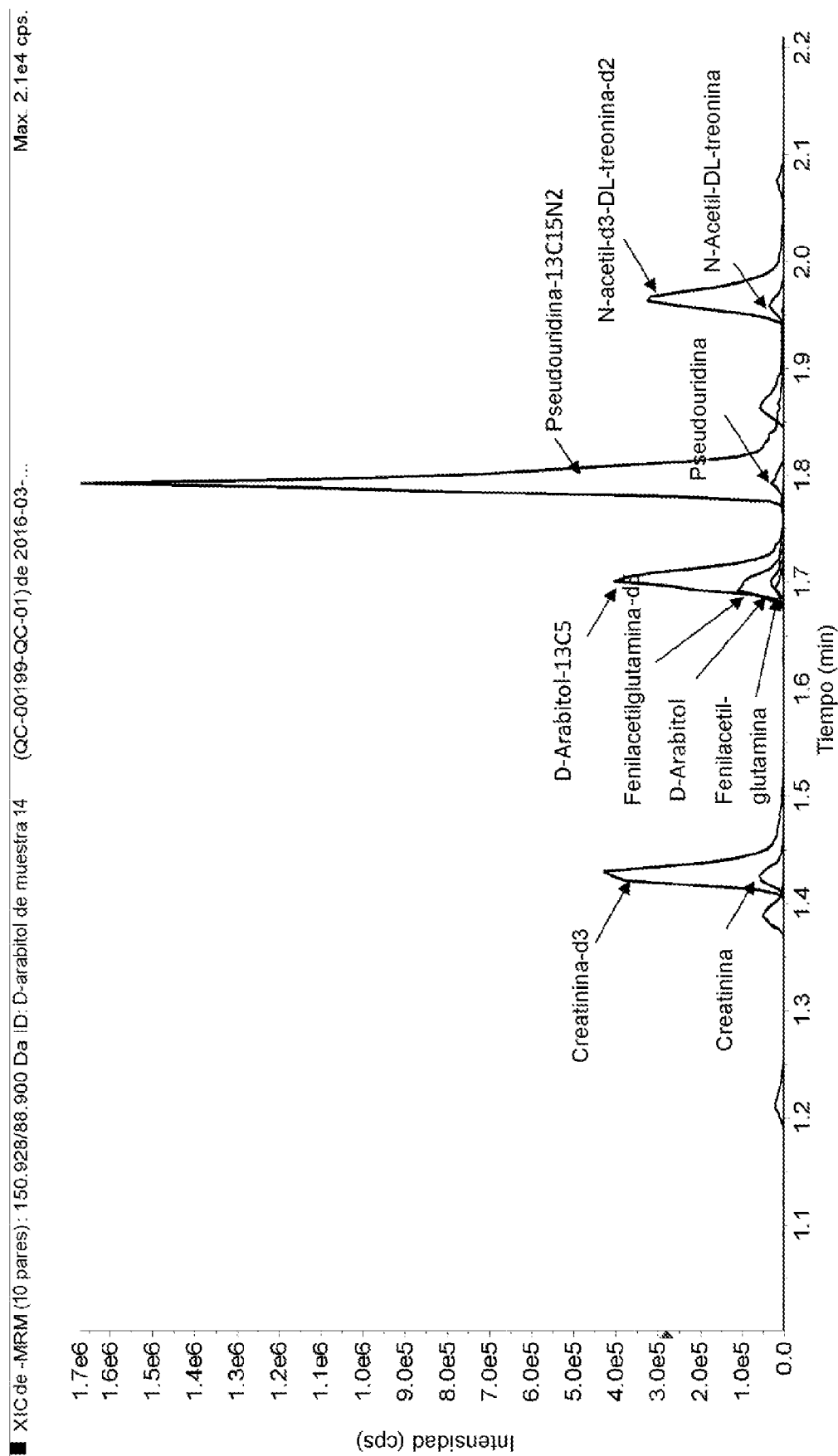


Fig. 7

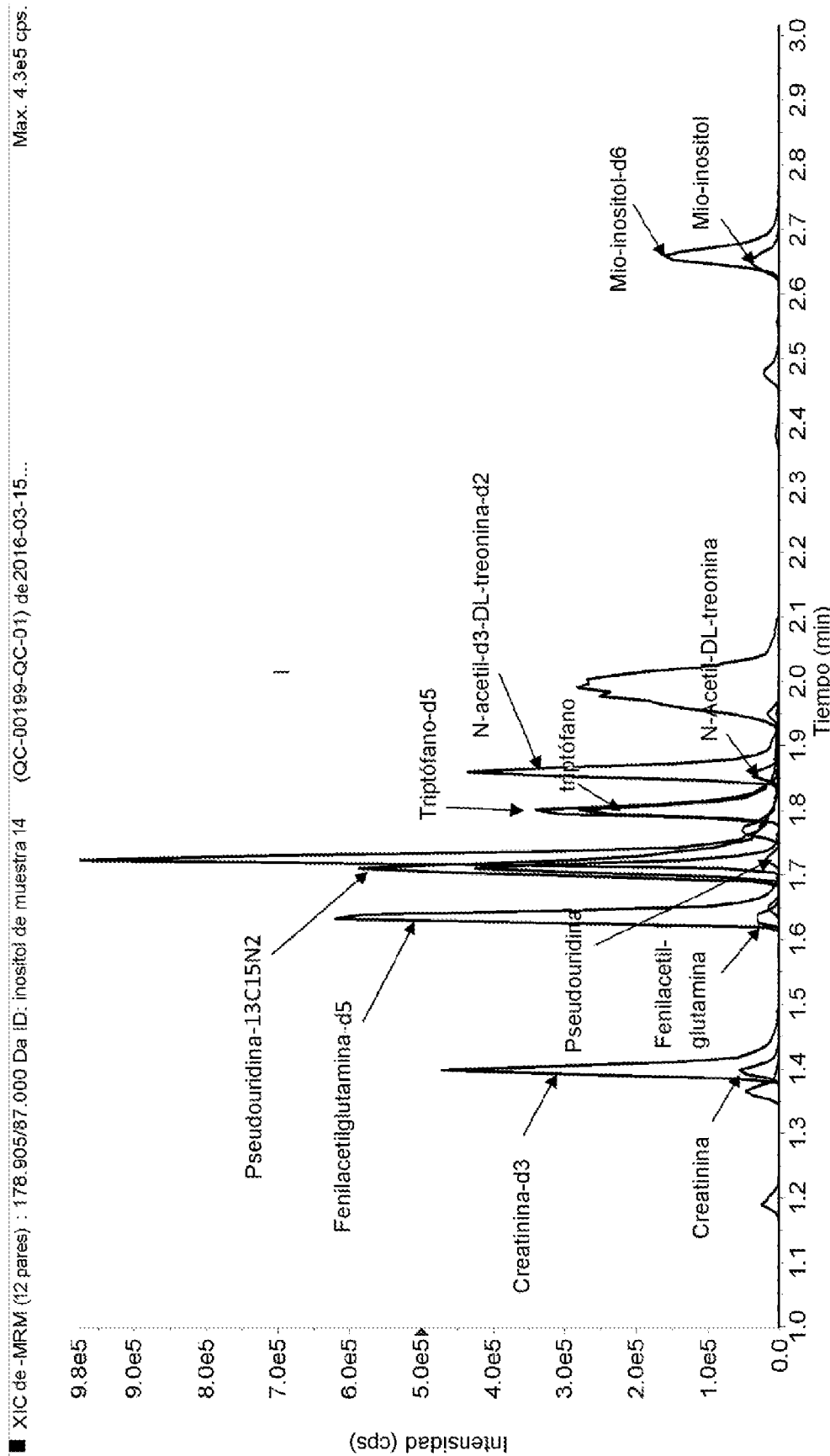


Fig. 8

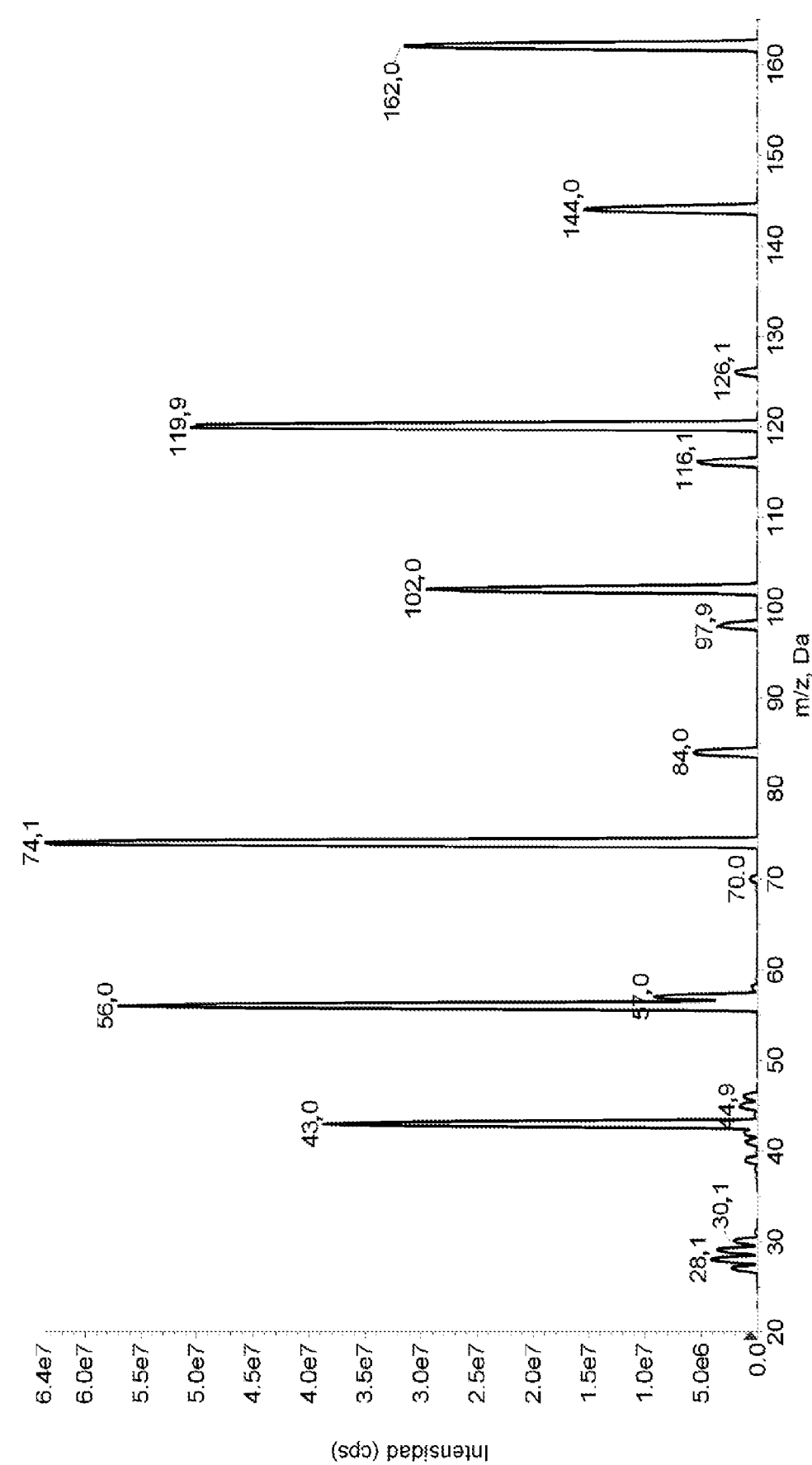


Fig. 9

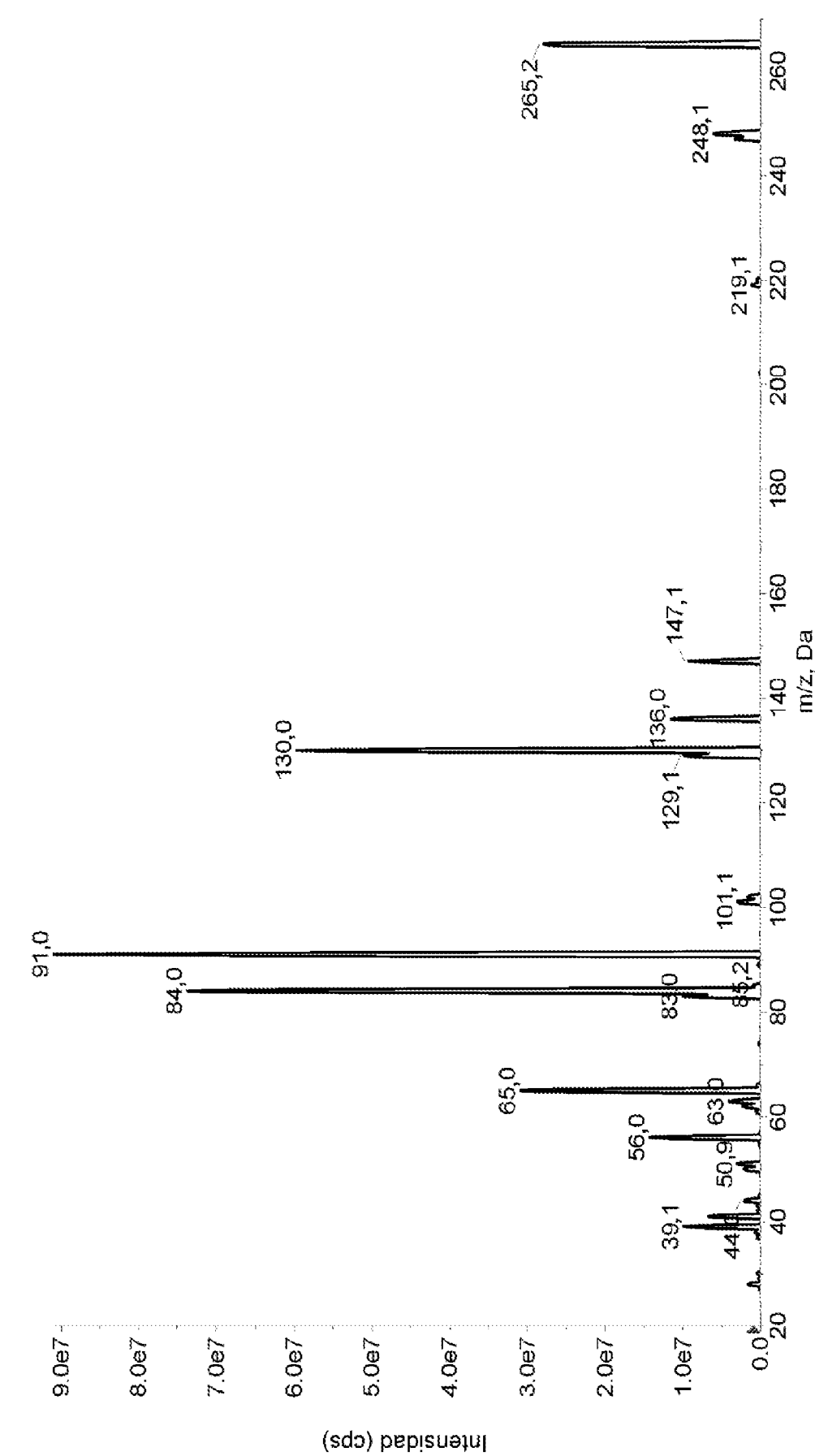


Fig. 10



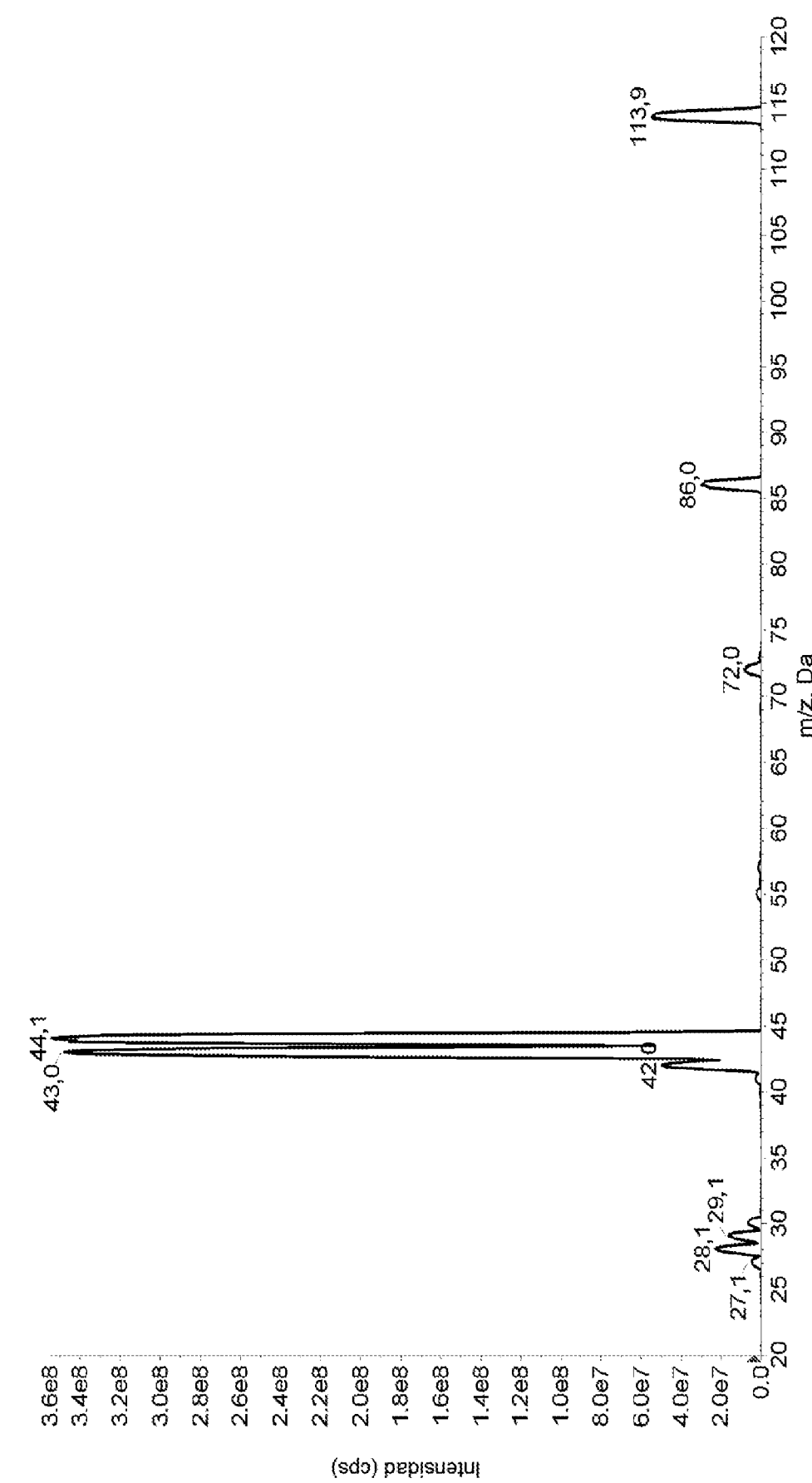


Fig. 11

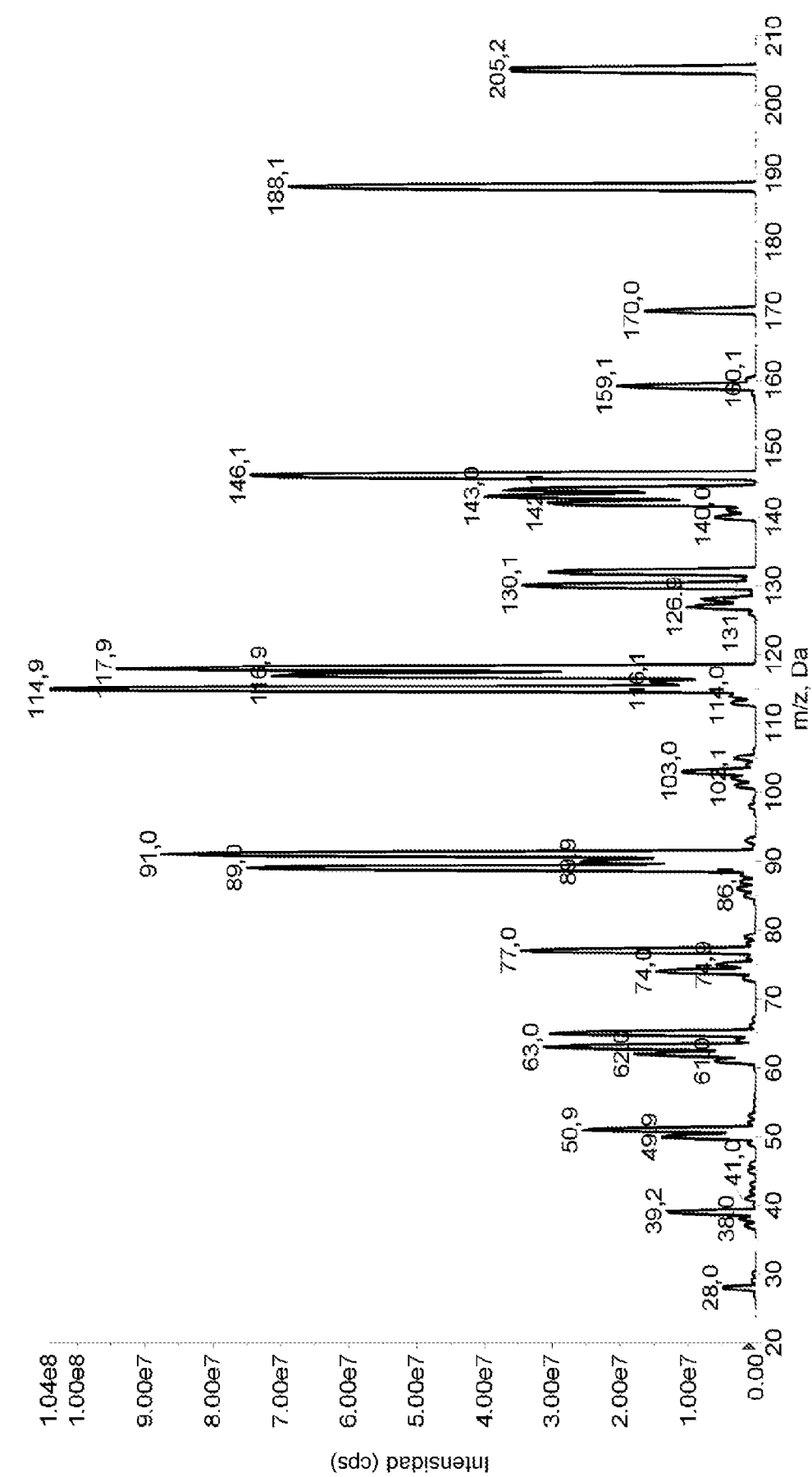


Fig. 12

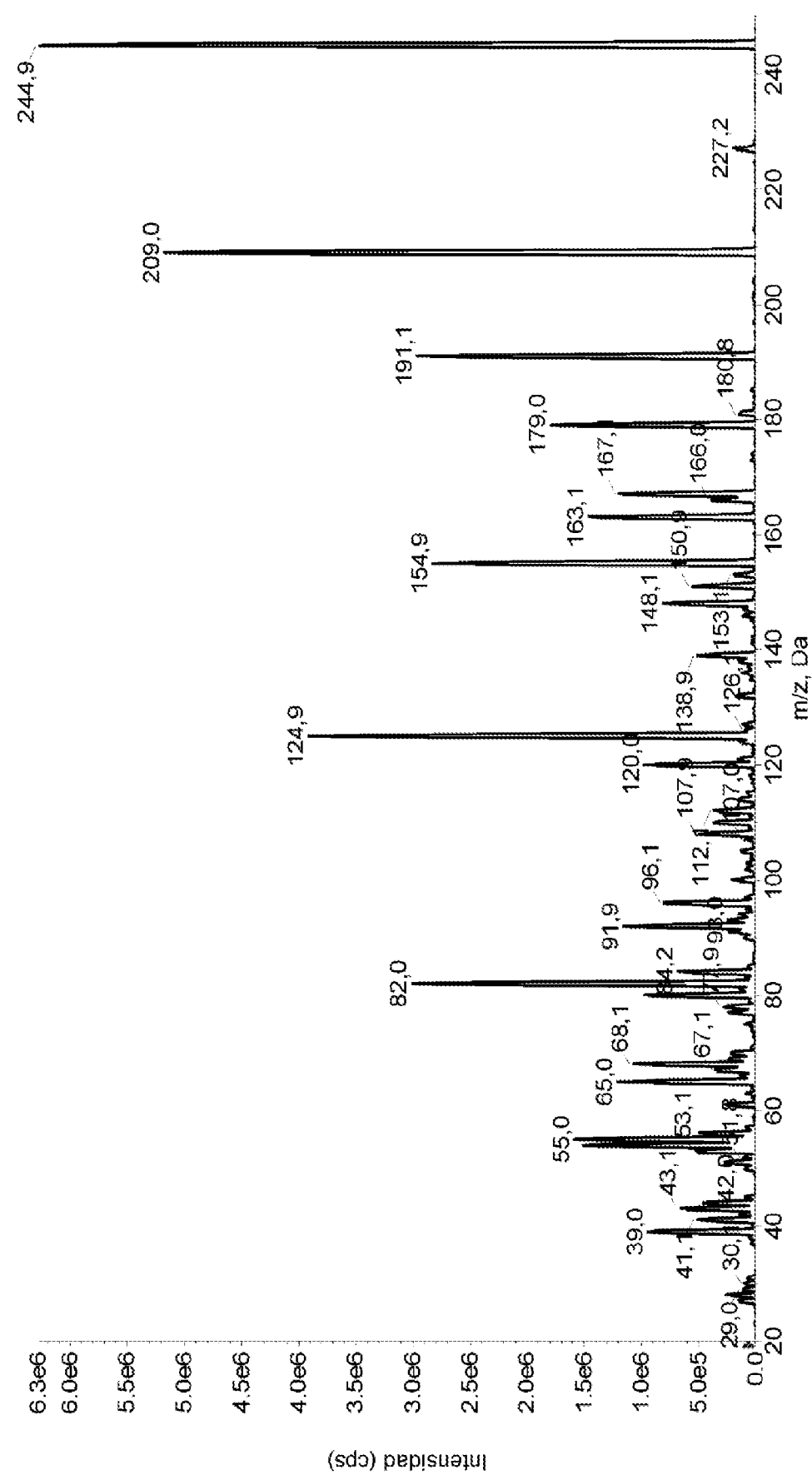


Fig. 13

Fig. 14A

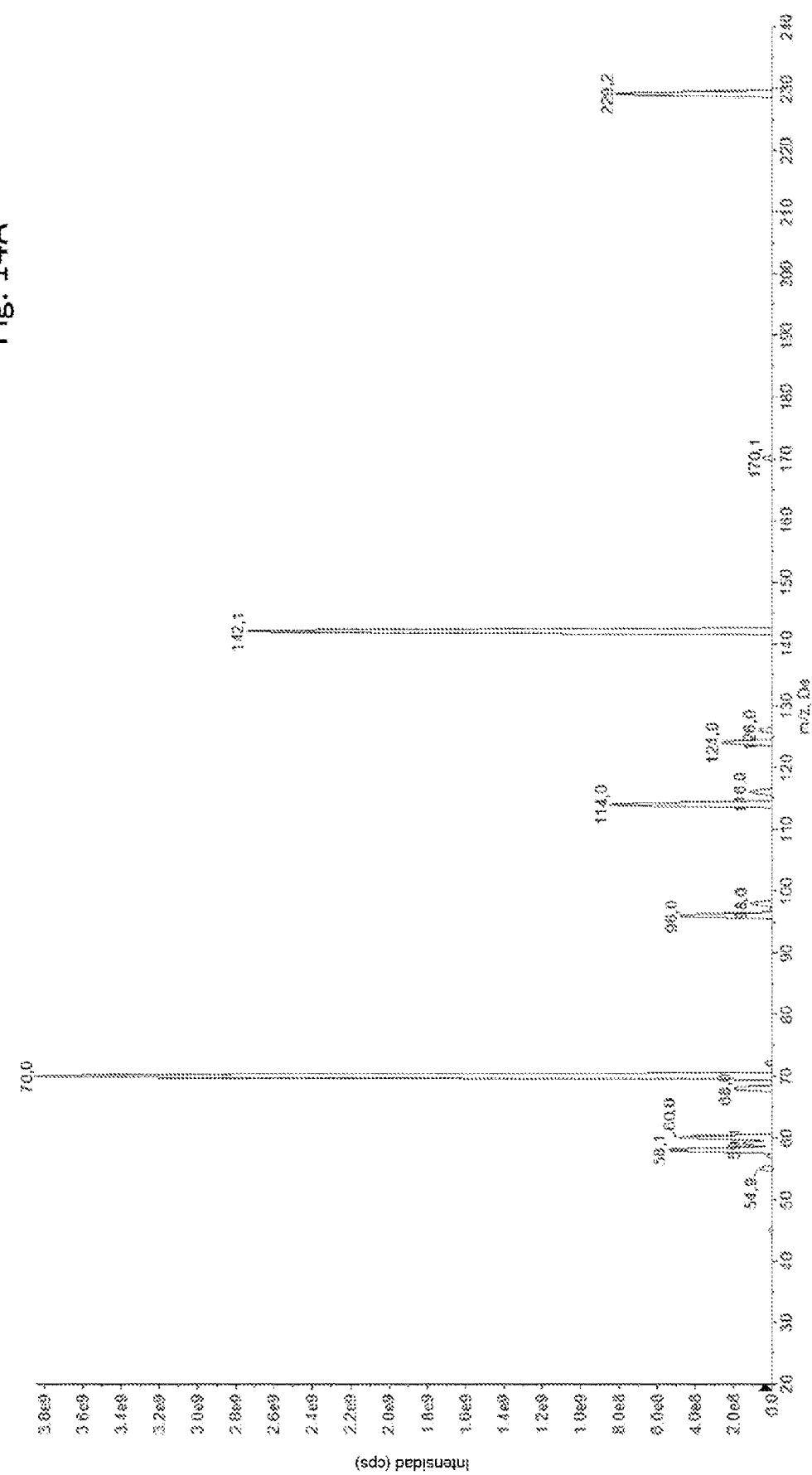


Fig. 14B

