

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 392**

21 Número de solicitud: 201131153

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.02.2013

71 Solicitantes:

**ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI (100.0%)
C/ DONOSTIA-SAN SEBASTIAN, 1
01010 VITORIA-GASTEIZ (Araba/Álava) ES**

72 Inventor/es:

**ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA AZUARA, Luis;
ANDRADE LODEIRO, Fernando y
LAGE MEDINA, Sergio**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ARGININA Y SUS DERIVADOS METILADOS.**

57 Resumen:

Método de detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados.

La presente invención se refiere a un método para la determinación, detección y/o cuantificación, de la concentración de arginina (Arg) y sus derivados metilados (ADMA, SDMA, MMA) en muestras biológicas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) que comprende la preparación de la muestra mediante la adición de estándares internos o análogos marcados isotópicamente ($^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA) y la centrifugación de la mezcla anterior.

ES 2 396 392 A1

DESCRIPCIÓN

Método de determinación de arginina y sus derivados metilados

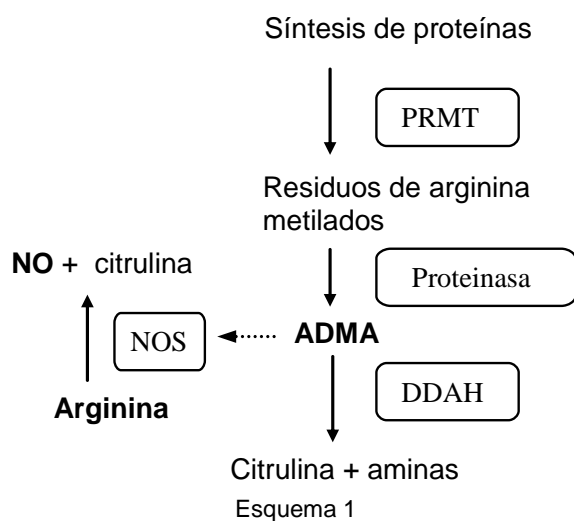
5 La presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados. Además, se refiere a un kit para llevar a cabo dicho método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La L-Arg (L-Arginina) puede oxidarse a L-citrulina y óxido nítrico (NO) por acción de óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial, de la cual es el principal sustrato. En cambio, los residuos de Arg de las proteínas pueden metilarse de diferente manera para que su posterior proteólisis de lugar a tres tipos de compuestos: ADMA, SDMA y L-NMMA. La metilación de la Arg está catalizada por la proteína arginina metiltransferasa I y II (PRMT I y II), cuya actividad depende de la S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo. PRMT I produce ADMA, y PRMT II da lugar a L-NMMA y SDMA. El ADMA se produce en todas las células del organismo y compite con la Arg por las isoformas de la NOS. El enzima PRMT I se expresa predominantemente en el endotelio y en las células del músculo liso del sistema cardiovascular. En condiciones de estrés oxidativo, la actividad de PRMT I en las células endoteliales se incrementa dando lugar a un aumento en la producción de ADMA. Aunque el SDMA no inhibe la síntesis de NO de forma directa, puede competir con el transportador de aminoácidos catiónicos en la membrana de las células endoteliales, acentuando así la deficiencia de Arg y alterando la producción de NO indirectamente, ya que el propio SDMA reduce significativamente la reabsorción de Arg en el asa de Henle de las nefronas en las ratas. Por estas razones y debido a que el SDMA se elimina predominantemente por la orina, se ha estudiado su correlación con la función renal y como marcador de la arterioesclerosis.

25 La mayor parte del ADMA, pero no de SDMA, se degrada a citrulina y dimetilamina (esquema 1) por acción de la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH), que se encuentra distribuida ampliamente por el organismo, principalmente en el hígado y el riñón, regulando así los niveles de ADMA, y por tanto de la síntesis de NO. Por estas razones, el descenso en la actividad de DDAH puede ser el principal mecanismo para la elevación de los niveles de ADMA.

30



35 En diversos estudios, se ha relacionado los niveles plasmáticos de ADMA en sujetos sanos sin enfermedad cardiovascular aparente, con la edad, presión arterial, intolerancia a la glucosa y el espesor de la carótida íntima-media. Esto sugiere que un incremento en los niveles de ADMA son un marcador de un cambio arterioesclerótico. Por eso, se han utilizado los niveles de ADMA para valorar el riesgo cardiovascular, conociendo que el ADMA es predominantemente absorbido por las células endoteliales. Por lo que se debe tener en cuenta que un ligero cambio en los niveles plasmáticos de ADMA son suficientes para alterar significativamente los niveles intracelulares de ADMA y por tanto de modificar la producción de NO contribuyendo al desarrollo de la enfermedad cardiovascular. En condiciones patológicas, podría darse un incremento de 3 a 9 veces los niveles de ADMA en plasma, que inhibirían el 30-70 % de la producción de NO. Así, fueron estudiados los niveles plasmáticos de ADMA en pacientes con intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina o diabetes, mostrándose valores elevados de este metabolito. También se han relacionado niveles elevados de ADMA con el estrés oxidativo y la hipocolesterolemia, mediante una disminución de la actividad de DDAH. Recientemente se ha comprobado que el tabaquismo aumenta las concentraciones de ADMA y disminuye los de Arg, que podría deberse a que el sistema de transporte y+ se expresa de forma deficiente debido al humo del tabaco.

45

La producción de NO endotelial está reducida en enfermos renales, en parte por limitación en la síntesis del substrato Arg, y porque el ADMA, que es un inhibidor competitivo de la NOS, está aumentado. El ADMA se acumula en pacientes con fallo renal crónico, inhibiendo la actividad de la NOS, lo que podría explicar al menos en parte, la hipertensión y la disfunción endotelial que sufren estos pacientes. Cabe destacar que los niveles de ADMA se encuentran ya incrementados en pacientes con enfermedad renal incipiente e incluso con valores aún normales de función renal, lo que sugiere que sólo una mínima parte del ADMA circulante se excreta por la orina aunque se correlacione inversamente con la filtración glomerular. También niños que han sufrido un trasplante renal presentan niveles elevados de ADMA con respecto a niños sanos, además de un bajo poder de metilación, aunque ambas variables no se correlacionan. Recientemente se ha mostrado una actividad reducida de DDAH en modelo animal con fallo renal, mostrando elevación de los niveles de ADMA, los cuales dependen en mayor proporción de la actividad de su enzima degradatorio que de la filtración glomerular.

Por todas estas razones, se han desarrollado diversos métodos analíticos para cuantificar la Arg y sus derivados metilados, y satisfacer así la demanda generada. En el método ELISA con cuantificación por fotometría de placas (DLD Diagnostika GmbH fue el primer fabricante de estos métodos) el ADMA en las muestras está acilado y compete con el ADMA unido a la fase sólida para un determinado número de lugares de antisuero de conejo anti-ADMA ADMA (Schulze F et al., *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(12): 1377-83). Cuando el sistema se encuentra en equilibrio, los antígenos y los complejos antígeno-antisuero libres son eliminados mediante lavado. La cantidad de anticuerpo unida a la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de ADMA en las muestras. Los inconvenientes de este método radican en que sólo se puede determinar un compuesto de forma simultánea, en este caso ADMA o SDMA, y una baja precisión en las medidas unida a errores sistemáticos. Pero el campo del HPLC-MS/MS aporta una mayor robustez a los métodos analíticos, permitiendo cuantificar Arg, ADMA y SDMA en el mismo experimento.

Los primeros métodos cromatográficos desarrollados incluían una derivatización de Arg, ADMA y SDMA previa a su separación cromatográfica, empleando orto-ftaldialdehído de forma que los compuestos producidos pueden ser cuantificados a través de un detector de fluorescencia (Teerlink T, et al., *Anal Biochem.* 2002; 303(2): 131-7). La mayor desventaja de estos métodos es la extracción de los compuestos y su derivatización, que además de ser laboriosa, puede relacionarse con pérdida de sensibilidad y precisan un elevado tiempo de preparación de las muestras. Otros métodos donde el HPLC está acoplado a un espectrómetro de masas simple necesitan derivatizar las muestras para conseguir los butil ésteres derivados de los compuestos objeto de estudio (Schwedhelm E, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851(1-2):211-9).

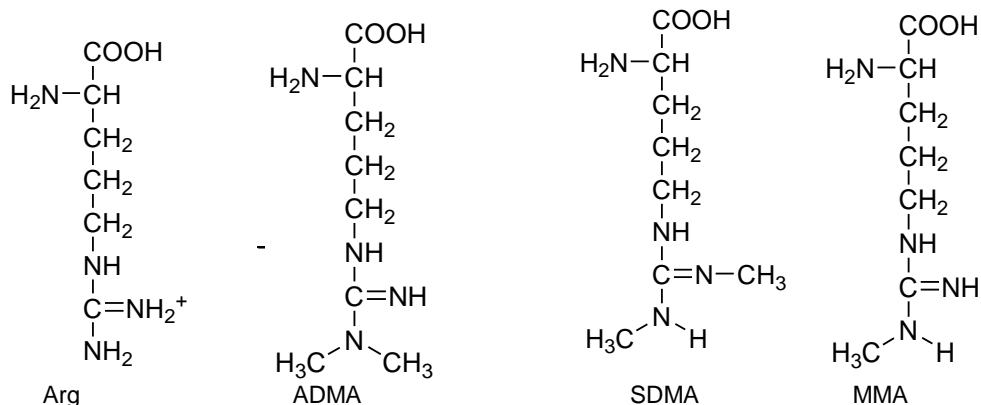
También existen métodos que no utilizan la cromatografía para separar los isómeros ADMA y SDMA, pero dichos métodos emplean una transición m/z menos sensible que la 203.2 m/z \rightarrow 70.1 m/z para cuantificar ADMA y SDMA, por lo que se pierde mucha sensibilidad. El fragmento 70.1 m/z es el más abundante cuando rompemos las moléculas de ADMA y SDMA en el espectrómetro de masas (Weaving G, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 874(1-2):27-32). Además de separar cromatográficamente los compuestos, el HPLC es necesario porque minimiza los efectos asociados a la matriz de la muestra y elimina potencialmente la interferencia de otros compuestos presentes en la muestra (Martens-Lobenhoffer J, et al., *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(27):3261-6).

Por tanto, la espectrometría de masas ha permitido emplear métodos más sencillos de preparación de las muestras, conservando precisión y exactitud en la cuantificación. Inicialmente se utilizó $^{13}\text{C}_6$ -Arg únicamente como estándar interno, siendo necesario el empleo de acetonitrilo y una posterior derivatización de los compuestos (Wang S, et al., *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(10):1305-12). Los métodos que emplean disolventes orgánicos para la precipitación de las proteínas en las muestras precisan también de una posterior evaporación de esos disolventes. Respecto a la derivatización de las muestras con métodos de HPLC-MS/MS, consume una serie de reactivos adicionales e incrementa el tiempo de preparación de la muestra, que a veces no provocan una mejora de los resultados cuantitativos (ES 2332218T3).

Por tanto, los inconvenientes de los métodos descritos anteriormente, se basan en la necesidad de emplear disolventes orgánicos en la precipitación de proteínas de las muestras, la falta de cuantificación de MMA a la vez que sus análogos ADMA y SDMA, y por último, la falta de separación cromatográfica de ADMA y SDMA que permitiera el empleo de la transición de más abundancia (203.2 m/z \rightarrow 70.1 m/z) para ambos compuestos dado que son isómeros estructurales y dicha transición es la más intensa.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para la determinación de la concentración de arginina (Arg) y sus derivados metilados en muestras biológicas, preferiblemente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (HPLC-MS/MS). Los derivados metilados de la Arg se pueden seleccionar de entre dimetilarginina asimétrica (ADMA), dimetilarginina simétrica (SDMA) y monometilarginina (MMA), y sus estructuras químicas son las siguientes:



5 La preparación de la muestra consiste en la adición de los estándares internos marcados isotópicamente ($^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA) y la centrifugación de la mezcla en filtros de ultracentrífuga para la eliminación de proteínas.

10 Una de las ventajas del método de la invención es la minimización de la preparación de la muestra. Además, se suministran una serie de disoluciones patrón de los compuestos a analizar que pueden ser almacenados en nevera, a partir de las cuales se realizan las correspondientes disoluciones hijas que permiten calibrar la técnica de análisis.

15 Esta invención además permite eliminar la utilización de disolventes orgánicos para la precipitación de proteínas de las muestras. Se cuantifica MMA a la vez que sus análogos ADMA y SDMA. Y entre otras ventajas, hace posible separar cromatográficamente ADMA y SDMA con el fin de emplear la transición de masas más intensa ($203.2 \text{ m/z} \rightarrow 70.1 \text{ m/z}$) para ambos isómeros estructurales.

20 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados seleccionados de entre dimetilarginina (ADMA) asimétrica, dimetilarginina simétrica (SDMA) y monometilarginina (MMA) en muestras biológicas aisladas mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), caracterizado porque la preparación de la muestra comprende:

-la adición de los estándares internos o análogos marcados isotópicamente ($^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA); y

25 -la centrifugación de la mezcla anterior en filtros de ultracentrífuga para la eliminación de proteínas a una velocidad de entre 15000 y 5000 rpm durante 60-20 minutos, más preferiblemente a una velocidad de entre 14000 a 10000 durante 50-30 minutos.

30 En caso de ser necesario, a la muestra con los estándares internos se le añadiría agua, para que esta mezcla contenga el mismo volumen que las disoluciones de los estándares (arginina, ADMA, SDMA y MMA) utilizados en el calibrado, porque el agua ayuda a diluir la muestra y además a mejorar la ultracentrifugación.

La técnica utilizada en la presente invención, LC-MS/MS, para la detección y/o cuantificación de la arginina y sus derivados metilados, es conocida por cualquier experto en la materia.

35 Después de la preparación de la muestra se procede a la separación física de los distintos componentes mediante cromatografía líquida (LC). Preferiblemente la cromatografía líquida es de alta resolución (HPLC).

40 En la cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija o estacionaria, y una móvil que fluye permanente durante el análisis. En la presente invención la fase estacionaria puede ser columnas de alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico conocidas en el estado de la técnica y por cualquier experto en la materia. En una realización preferida las columnas más utilizadas son las de sílice. El tamaño de estas columnas puede ser variable.

45 Por otro lado, la fase móvil preferiblemente está formada por al menos un formador de pares iónicos. Y más preferiblemente el formador de pares iónicos se selecciona de entre ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético (TFA), aún más preferiblemente el formador de pares iónicos es TFA.

En una realización preferida la separación cromatográfica se lleva a cabo a un pH ácido superior a 1,5 y más preferiblemente a un pH de entre 2 y 3.

50 Separados físicamente los componentes de la muestra se detecta y/o cuantifica cada uno de ellos, de manera simultánea, mediante el acoplamiento del cromatógrafo a un espectrómetro de masas en tandem. En una realización

preferida, la detección y/o cuantificación por medio de la espectrometría de masas en tandem se realiza teniendo en cuenta cualquiera de los siguientes fragmentos de masa:

| | |
|-----------------------------------|----------------------|
| Arg | 175.0 m/z → 70.0 m/z |
| ¹³ C ₆ -Arg | 181.2 m/z → 74.1 m/z |
| MMA | 189.2 m/z → 70.1 m/z |
| ADMA-SDMA | 203.2 m/z → 70.1 m/z |
| D ₇ -ADMA | 210.1 m/z → 77.0 m/z |

5 En la técnica de la presente invención se emplean estándares (arginina, ADMA, SDMA y MMA) y estándares internos o análogos para calcular la relación entre diferentes analitos, y poder así calibrar y cuantificar cada uno de los analitos que se pretenden determinar. Preferiblemente se utilizan los mismos compuestos marcados isotópicamente como estándares internos, pero concretamente en la presente invención se han utilizado los análogos de arginina y ADMA marcados isotópicamente (¹³C₆-Arg y D₇-ADMA).

10 Por "muestra biológica" se entiende en la presente invención a una muestra obtenida de un mamífero, preferiblemente humano, y que puede ser un fluido biológico o una muestra de tejido. El fluido biológico se puede seleccionar, pero sin limitarse a plasma, orina o líquido cefalorraquídeo. Por otro lado la muestra de tejido puede ser una muestra de biopsia o un cultivo de tejidos o células derivadas de ellos.

15 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la determinación mediante LC-MS/MS de arginina y sus derivados metilados seleccionados de entre ADMA, SDMA y MMA en muestras biológicas aisladas que comprende:

20 - los estándares (arginina, ADMA, SDMA y MMA) y los estándares internos o análogos marcados isotópicamente (¹³C₆-Arg y D₇-ADMA),
 -filtros de ultracentrífuga, y
 -fase móvil.

25 Por "determinación" se entiende la detección y/o cuantificación de cada uno de los analitos, es decir, arginina y sus derivados metilados (ADMA, SDMA y MMA).

En una realización preferida la fase móvil contiene un formador de pares iónicos como los descritos anteriormente y se encuentra a un pH ácido mayor a 1,5, preferiblemente a un pH de entre 2 y 3.

30 En otra realización preferida, el kit también incluye instrucciones y procedimiento normalizado de dicho kit.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit para la determinación de la arginina y sus derivados metilados. Esta determinación es de aplicación para su utilización como marcador cardiovascular y de arterioesclerosis, además, los niveles de ADMA y SDMA están relacionados directamente con la disfunción endotelial o estrés oxidativo y con la función renal.

35 Por tanto, en la presente invención tanto el método como el kit son de utilidad para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades relacionadas con la arginina y/o sus derivados metilados, como por ejemplo pero sin limitarse a enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, disfunción endotelial, enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo o enfermedades renales.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 Fig. 1.- Filtros de centrifuga con la mezcla compuesta por la muestra, los estándares internos y agua destilada.

Fig. 2.- Cromatograma característico del análisis de Arg, ADMA, SDMA y MMA en plasma.

Fig. 3.- Cromatograma característico del análisis de Arg, ADMA, SDMA y MMA en orina.

55 Fig. 4.- Curvas de calibrado de ADMA, SDMA, MMA y Arg en plasma.

EJEMPLOS

El material fungible necesario para desarrollar esta invención es el siguiente:

Microviales con inserto

Filtros de centrifuga (Millipore (Amicon Ultra 0.5mL 10K Cat No: UFC501096))

Los equipos empleados son un cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tandem y una ultracentrífuga.

Los reactivos iniciales de los que se parte previamente para realizar las correspondientes disoluciones de partida son:

L-Arg

ADMA

SDMA

MMA

¹³C₆-Arg

D₇-ADMA

Ácido trifluoroacético (TFA)

Formiato amónico

Inicialmente se preparan las siguientes disoluciones madre partiendo de los reactivos descritos anteriormente:

Arg 500 µM

ADMA 250 µM

SDMA 100 µM

MMA 280 µM

¹³C₆-Arg 500 µM

D₇-ADMA 380 µM

Estas disoluciones madre son estables durante al menos un año si se les añade un 0,1 % de fenol como conservante y se guardan en nevera (4° C aproximadamente), por lo que serán alicuotadas en viales de pequeño tamaño para su distribución a través de un kit, junto con los filtros de centrifuga, la fase móvil y el procedimiento a seguir que se detallan a continuación.

A partir de estas disoluciones madre se prepara una mezcla de estos compuestos añadiendo 2 ml de Arg 500 µM, 40 µl de ADMA 250 µM, 100 µl de SDMA 100 µM y 20 µl de MMA 250 µM hasta 5 ml con agua destilada, dando como resultado una disolución hija de Arg 200 µM, ADMA 2 µM, SDMA 2 µM y MMA 1 µM. Para preparar las disoluciones hijas de los estándares internos se pipetearon 1 ml ¹³C₆-Arg 500 µM hasta 5 ml, y 26.3 µl de D₇-ADMA 380 µM hasta 5 ml, dando como resultados ¹³C₆-Arg 100 µM y D₇-ADMA 2 µM. Todas las soluciones preparadas se guardan en nevera si se van a utilizar en un corto periodo de tiempo (un mes), aunque es necesario alicuotarlas y almacenarlas en el congelador si las disoluciones hijas se van a utilizar con posterioridad.

Para la separación cromatográfica de ADMA y SDMA es aconsejable la presencia de un formador de pares iónicos como el TFA en una concentración optimizada de 0,2% en la fase móvil. Al utilizar una columna cromatográfica C18 de 15 cm, el pH será superior a 2 para no estropearla, por lo que se empleó formiato amónico para obtener un pH en torno a 2,5. Posteriormente se filtró a vacío la disolución, manteniendo estable a temperatura ambiente al menos durante 3 meses aunque si se va a almacenar durante más tiempo se recomienda guardar en el frigorífico.

Para la preparación de la muestra, se mezclan 50 µl de plasma y 50 µl de cada uno de los estándares internos. Para que la mezcla contenga el mismo volumen que los calibradores se añaden 75 µl de agua. La mezcla resultante vertida en los filtros de centrifuga (Fig. 1) se centrifuga durante 45 minutos a 13000 rpm. La solución filtrada se lleva a un vial con inserto para inyectar en el HPLC-MS/MS.

Para calibrar esta técnica usaremos el método de adiciones estándar, de tal manera que el procedimiento se realiza igual que una muestra, añadiendo a diferentes eppendorf 50µl de cada estándar interno, 50µl de plasma, y 0, 10, 25, 50 y 75 µl de la mezcla de estándares que contienen Arg (200 µM), ADMA (2 µM), SDMA (2 µM) y MMA (1 µM), dando como resultado las siguientes concentraciones en la curva de calibrado (Tabla 1):

Tabla 1:

| Volumen (µl) | Arg (200 µM) | ADMA (2 µM) | SDMA (2 µM) | MMA (1 µM) |
|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 40 | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| 25 | 100 | 1 | 1 | 0,4 |
| 50 | 200 | 2 | 2 | 1 |
| 75 | 300 | 3 | 3 | 1,5 |

A cada uno de estos puntos de calibrado se la añaden respectivamente 75, 65, 50, 25 y 0 μl de agua para que cada mezcla posea el mismo volumen.

5 Las condiciones del equipo para procesar las muestras de plasma son 10 μl como volumen de inyección y un flujo de 0,4 ml/min de fase móvil en modo isocrático. Teniendo en cuenta que la fase móvil A es la fase acuosa que contiene TFA, y la B corresponde al acetonitrilo (AcCN), el gradiente empleado para la limpieza de la columna y su preparación para el pinchazo de la muestra posterior es el siguiente (Tabla 2):

Tabla 2:

| Tiempo (min) | %A (TFA) | %B (AcCN) | Flujo |
|--------------|----------|-----------|-------|
| 0 | 100 | 0 | 0,4 |
| 11 | 100 | 0 | 0,4 |
| 12 | 10 | 90 | 1,5 |
| 18 | 10 | 90 | 1,5 |
| 19 | 100 | 0 | 1 |
| 22 | 100 | 0 | 1 |
| 22,5 | 100 | 0 | 0,4 |
| 23 | 100 | 0 | 0,4 |

10

Con respecto a las muestras de orina, las disoluciones hija mezcla de estos compuestos se preparan pipeteando 200 μl de Arg 500 μM , 400 μl de ADMA 250 μM , 1 ml de SDMA 100 μM y 100 μl de MMA 250 μM hasta 5 ml en agua destilada, dando como resultado una disolución de Arg 20 μM , ADMA 20 μM , SDMA 20 μM y MMA 5 μM . Para preparar las disoluciones hijas de los estándares internos, se llevó 100 μl de $^{13}\text{C}_6$ L-Arg 500 μM a 5 ml dando como lugar 10 μM . Respecto al D₇-ADMA, se cogieron 263 μl de la disolución madre de 380 μM y se llevaron a 5 ml, dado como resultado una concentración de 20 μM .

15

Para determinar estos compuestos en orina son precisos 10 μl de orina y 50 μl de cada uno de los estándares internos.

20

Para calibrar la técnica en orina el procedimiento se realiza igual que en plasma pero añadiendo 10 μl de orina, 50 μl de cada estándar interno, y 0, 10, 25, 50 y 75 μl de la mezcla hija de estándares que contienen Arg (20 μM), ADMA (20 μM), SDMA (20 μM) y MMA (5 μM) completando hasta 185 μl totales con agua, dando como resultado las siguientes concentraciones en la curva de calibrado (Tabla 3):

25

Tabla 3:

| Volumen (μl) | Arg (20 μM) | ADMA (20 μM) | SDMA (20 μM) | MMA (5 μM) |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 20 | 20 | 20 | 5 |
| 25 | 50 | 50 | 50 | 12,5 |
| 50 | 100 | 100 | 100 | 25 |
| 75 | 150 | 150 | 150 | 37,5 |

Cuando se procesan muestras de orina en el HPLC-MS/MS se inyectan 2 μl de la muestra preparada a un flujo de 0,4 ml/min.

30

Tanto para muestras de plasma como de orina, el espectrómetro de masas se configura en modo MRM (*multiple reaction monitoring*) a través de las siguientes transiciones de masas (m/z) en polaridad positiva (Tabla 4):

Tabla 4:

| | |
|------------------------|--------------|
| Arg | 175,0 - 70,0 |
| $^{13}\text{C}_6$ -Arg | 181,2 - 74,1 |
| MMA | 189,2 - 70,1 |
| ADMA-SDMA | 203,2 - 70,1 |
| D ₇ -ADMA | 210,1 - 77,0 |

35

En la Fig. 2 y la Fig. 3 se observa la separación cromatográfica de los compuestos en plasma y orina, respectivamente.

La validación de este método da lugar a unos buenos resultados de precisión, exactitud, recuperación y coeficientes de correlación de las rectas de calibrado (Tabla 5).

Tabla 5:

| | Arg | ADMA | SDMA | MMA |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Repetitividad en el día % RSD | 3,1 | 3,6 | 3,6 | 11,4 |
| Repetitividad entre días % RSD | 7,4 | 2,5 | 1,9 | 12,5 |
| Intervalo lineal | Hasta 650 μM | Hasta 500 μM | Hasta 500 μM | Hasta 100 μM |
| Rango de calibración (plasma) | 0-300 μM | 0-3 μM | 0-3 μM | 0-1,5 μM |
| Rango de calibración (orina) | 0-150 μM | 0-150 μM | 0-150 μM | 0-37,5 μM |
| Rango de coeficientes de correlación del calibrado (R2) | 0,9895-0,9998 | 0,9876-0,9995 | 0,9899-0,9999 | 0,9891-0,9999 |
| Recuperación | 85,4 % | 94,3 % | 94,2 % | 98,9 % |
| Límite de detección (S/N=3) | 4,44 μM | 0,09 μM | 0,10 μM | 0,38 μM |

En la Fig. 4 se observan las curvas de calibrado de las muestras de plasma, aunque otros fluidos biológicos como la orina presentan resultados similares a los incluidos en la Tabla 4.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Método para la detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados seleccionados de entre dimetilarginina (ADMA) asimétrica, dimetilarginina simétrica (SDMA) y monometilarginina (MMA), en muestras biológicas aisladas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), caracterizado porque la preparación de la muestra comprende:
- 10 -la adición de los estándares internos marcados isotópicamente $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA y opcionalmente agua; y
-la centrifugación de la mezcla anterior en filtros de ultracentrífuga para la eliminación de proteínas a 15000-5000 rpm durante 60-20 minutos.
- 2.- Método según la reivindicación 1, donde la cromatografía de líquidos es cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- 15 3.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la separación cromatográfica de la arginina y sus derivados metilados se lleva a cabo en una columna de gel de sílice y una fase móvil que contiene un formador de pares iónicos.
- 20 4.- Método según la reivindicación anterior, donde el formador de pares iónicos se selecciona de entre ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético.
- 5.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la separación cromatográfica se lleva a cabo a un pH ácido superior a 1,5.
- 25 6.- Método según la reivindicación 5, donde el pH está entre 2 y 3.
- 7.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo a una transición de 203,2 m/z \rightarrow 70,1 m/z para ADMA y SDMA.
- 30 8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo a una transición de 175 m/z \rightarrow 70 m/z para arginina.
- 9.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo a una transición de 181,2 m/z \rightarrow 74,1 m/z para $^{13}\text{C}_6$ -Arg,
- 35 10.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo a una transición de 189,2 m/z \rightarrow 70,1 m/z para MMA.
- 11.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la detección y/o cuantificación se lleva a cabo a una transición de 210,1 m/z \rightarrow 77 m/z para D_7 -ADMA.
- 40 12.- Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las muestras biológicas se seleccionan de entre fluido biológico o tejido.
- 45 13.- Método según la reivindicación anterior, donde la muestra de fluido biológico se selecciona entre plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.
- 14.- Kit que comprende:
- los estándares (arginina, ADMA, SDMA y MMA) y los estándares internos marcados isotópicamente $^{13}\text{C}_6$ -Arg y D_7 -ADMA,
-filtros de ultracentrífuga,
-fase móvil.
- 50 15.- Kit según la reivindicación anterior, donde la fase móvil comprende un formador de pares iónicos y se encuentra a un pH ácido mayor a 1,5.
- 55 16.- Kit según la reivindicación 15, donde el formador de pares iónicos se selecciona de entre ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético.
- 60 17.- Kit según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la fase móvil se encuentra a un pH de entre 2 y 3.
- 18.- Uso del kit descrito según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, para la detección y/o cuantificación mediante LC-MS/MS de arginina y sus derivados metilados seleccionado de entre dimetilarginina (ADMA) asimétrica, dimetilarginina simétrica (SDMA) y monometilarginina (MMA), en muestras biológicas aisladas.

19.- Uso del kit según la reivindicación 18, donde la muestra es un fluido biológico o un tejido.

20.- Uso según la reivindicación anterior, donde la muestra de fluido biológico se selecciona entre plasma, orina y líquido cefalorraquídeo.

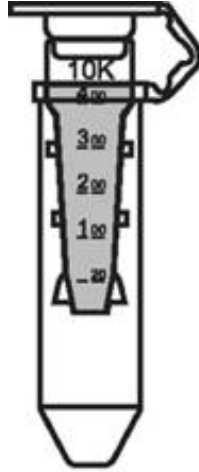


FIG.1

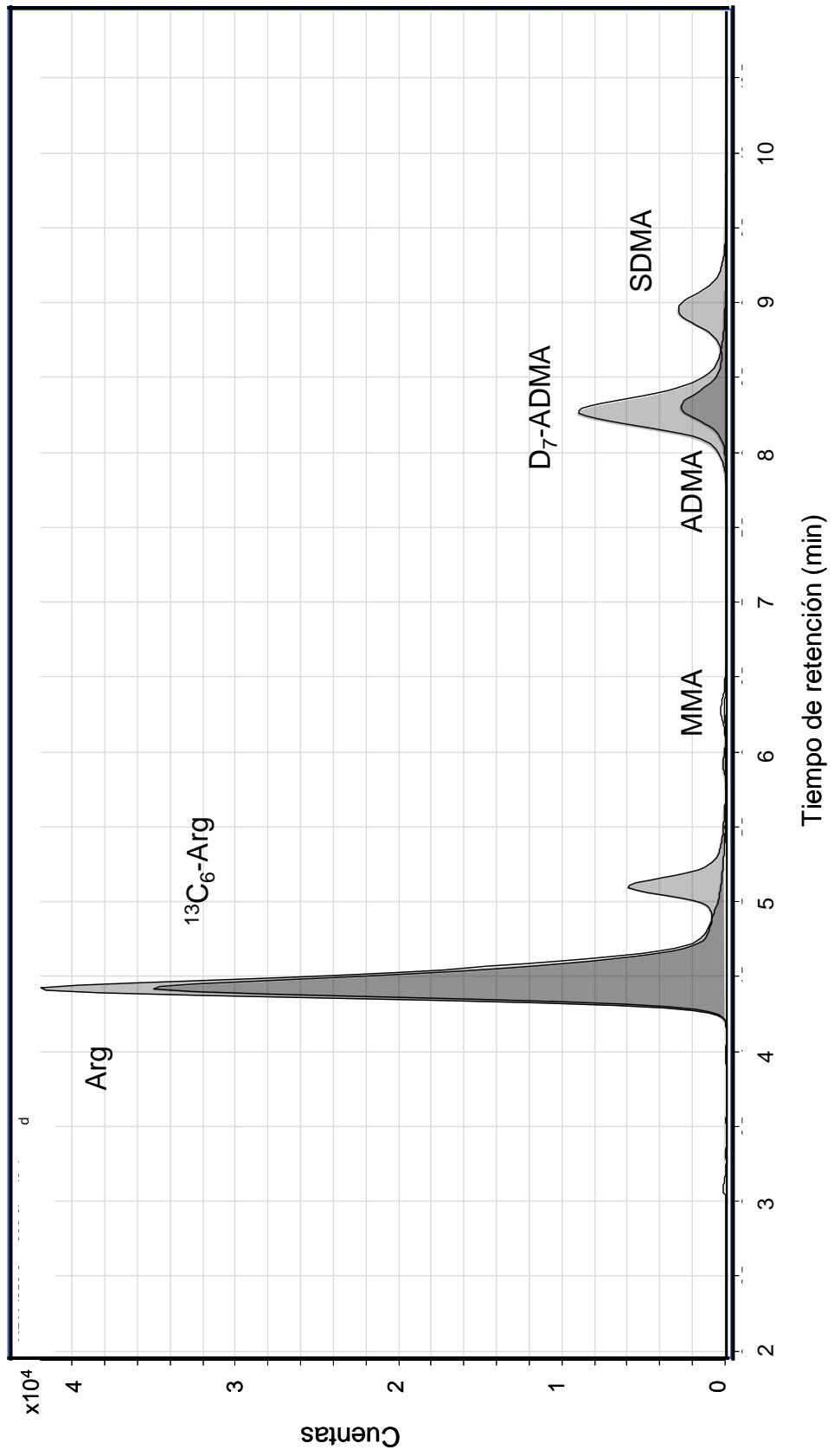


FIG. 2

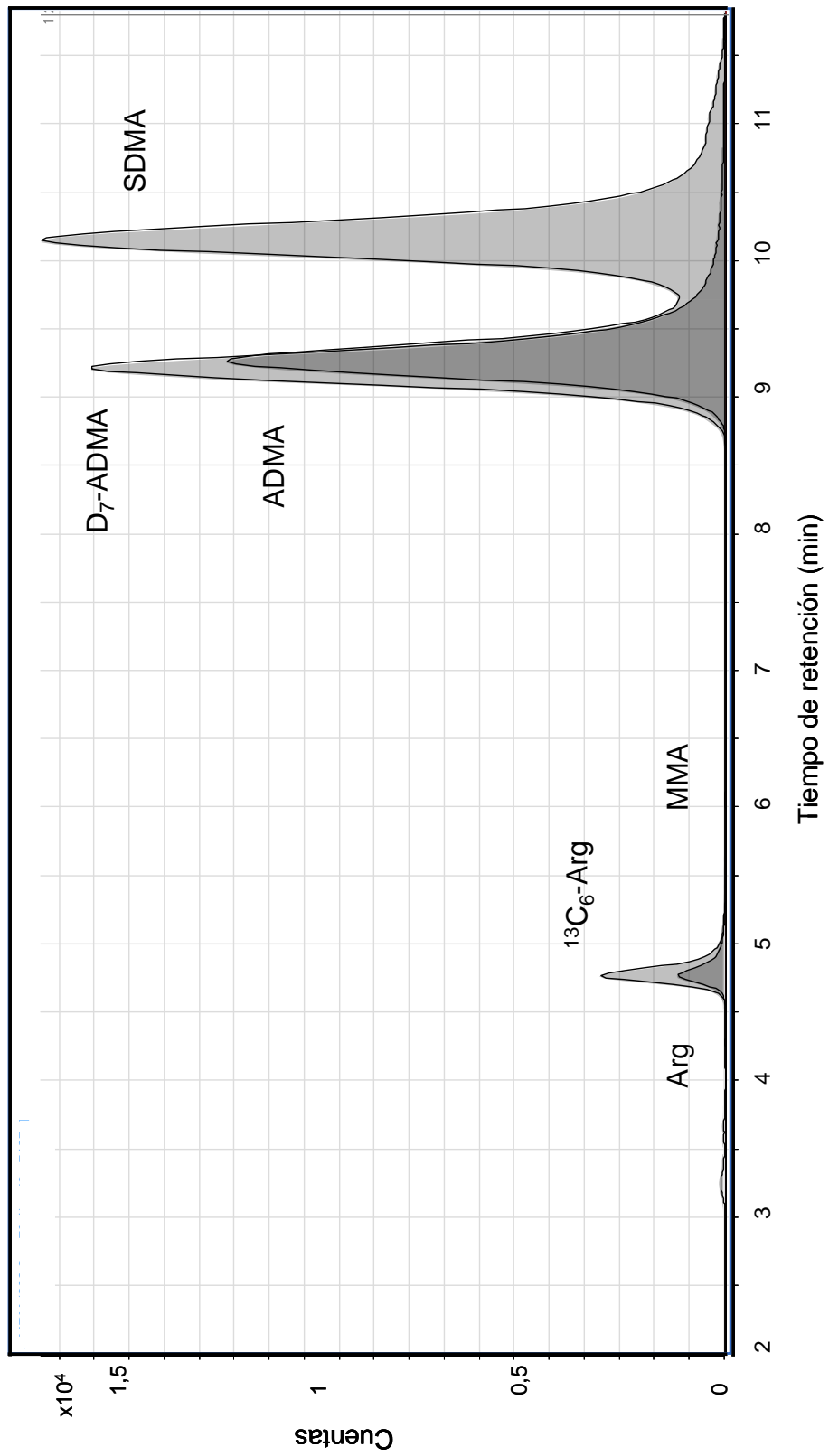


FIG. 3

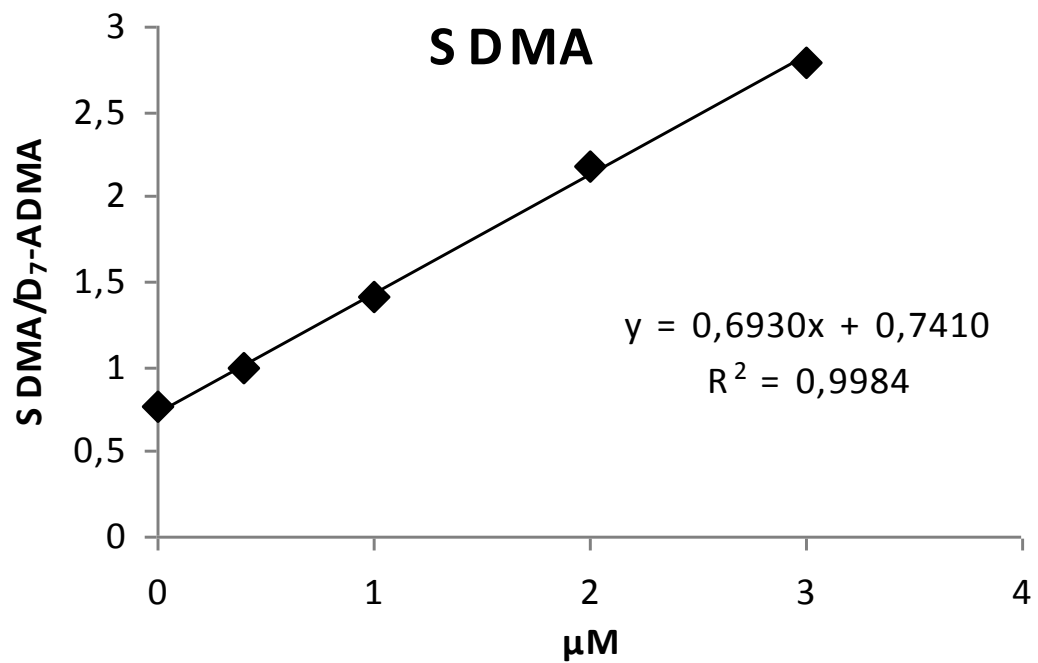
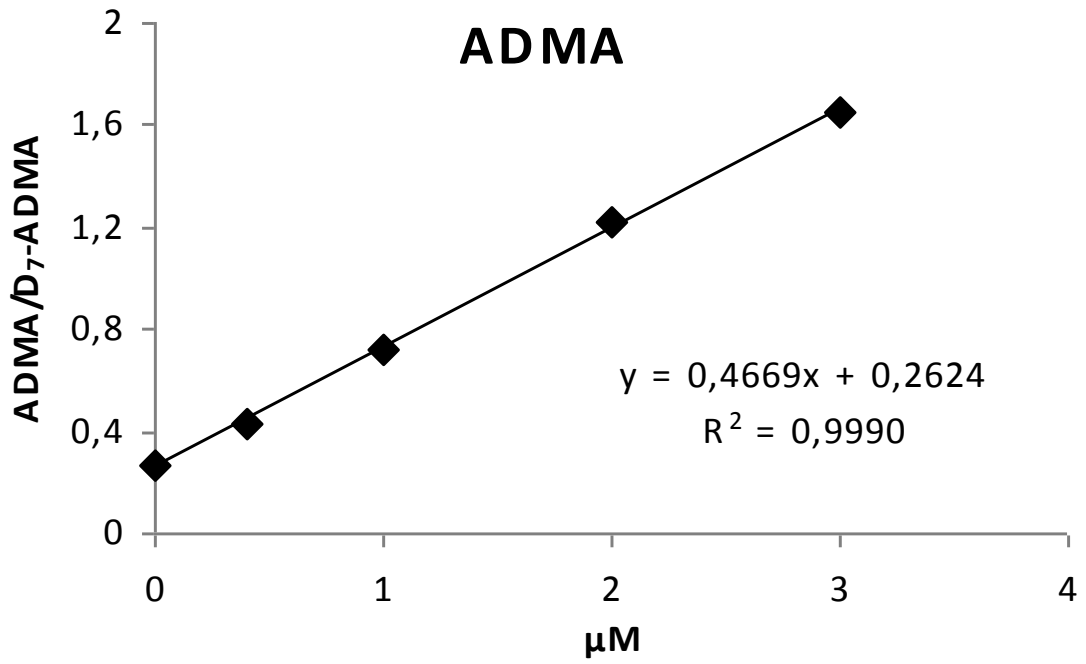


FIG. 4 (cont.)

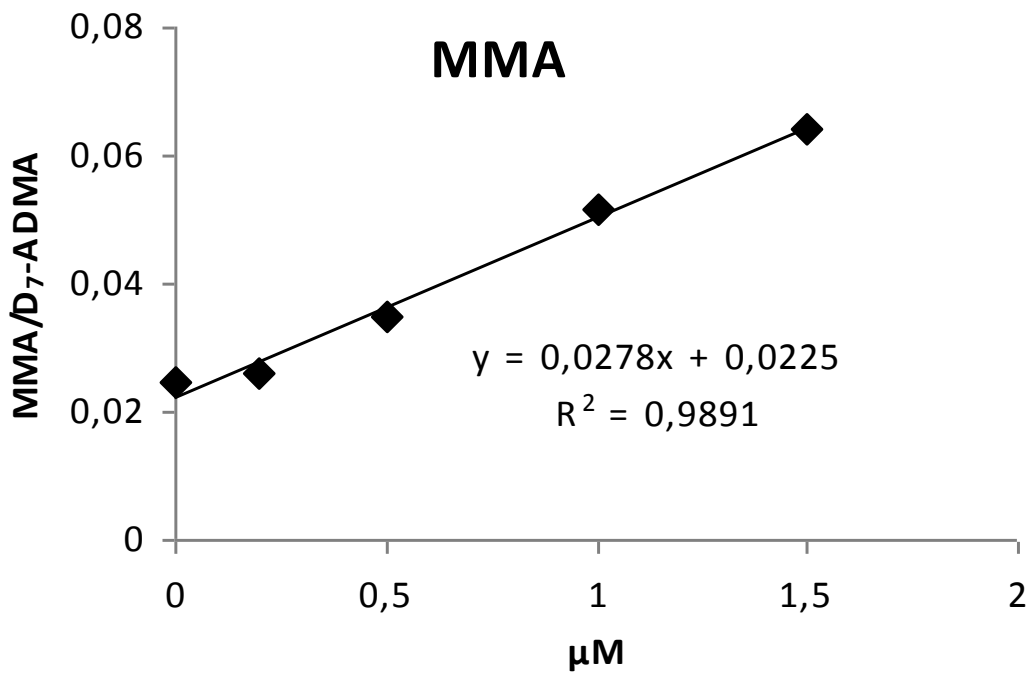
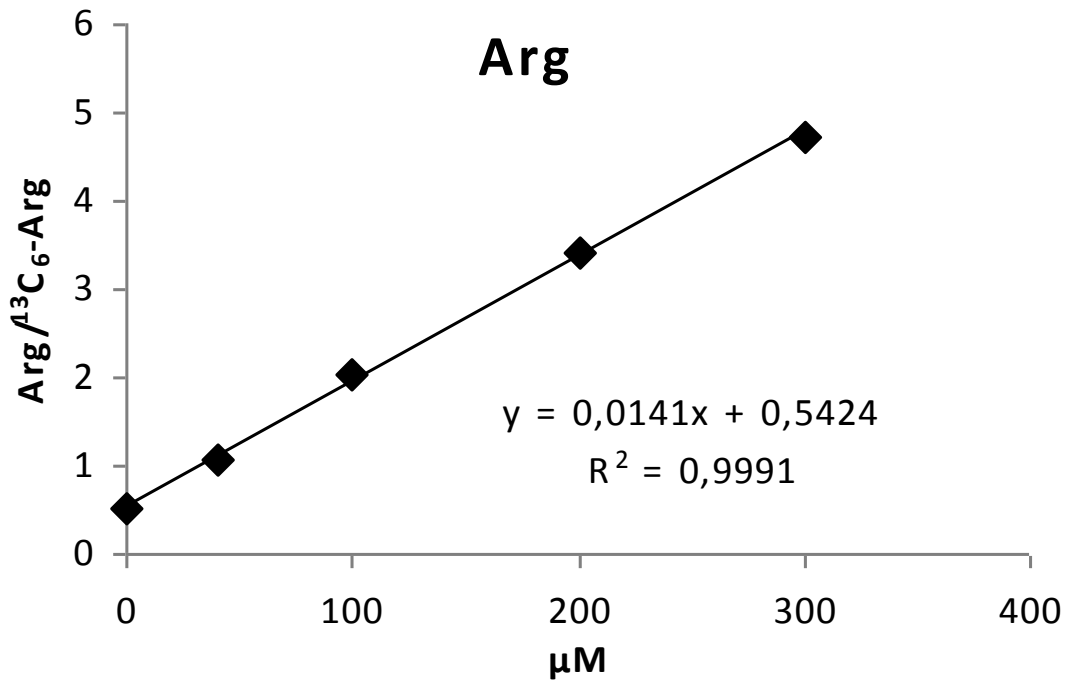


FIG. 4



- ②¹ N.º solicitud: 201131153
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 06.07.2011
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/50** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤ ⁶ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | SHIN SOYOUNG; FUNG SUN-MI; MOHAN SRINIDI; FUNG HO-LEUNG. Simultaneous bioanalysis of L-arginine, L-citrulline, and dimethylarginines by LC-MS/MS. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. B, ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES. Vol. 879, 01.03.2011, páginas 467-474. Resumen y página 4, apartados 2.6 y 2.7. | 1-20 |
| A | JENS MARTENS-LOBENHOFFER, STEFANIE M. BODE-BÖGER. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. EUR J CLIN PHARMACOL VOL. 62 (2006) PÁGINAS 61-68. Páginas 64 y 65. | 1-20 |
| A | MARTENS-LOBENHOFFER J; KRUG O; BODE-BOGER S M. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY. Vol. 39, 2004 páginas 1287-1294. Resumen y página 1289. | 1-20 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.01.2013

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.01.2013

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-20 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-20 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | SHIN SOYOUNG; FUNG SUN-MI; MOHAN SRINIDI; FUNG HO-LEUNG. Simultaneous bioanalysis of L-arginine, L-citrulline, and dimethylarginines by LC-MS/MS. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY. B, ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES. Vol. 879, 01.03.2011, páginas 467-474. Resumen y página 4, apartados 2.6 y 2.7. | |
| D02 | JENS MARTENS-LOBENHOFFER, STEFANIE M. BODE-BÖGER. Measurement of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma: from liquid chromatography estimation to liquid chromatography-mass spectrometry quantification. EUR J CLIN PHARMACOL VOL. 62 (2006) PÁGINAS 61-68. Páginas 64 y 65. | |
| D03 | MARTENS-LOBENHOFFER J; KRUG O; BODE-BOGER S M. Determination of arginine and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with the isotope dilution technique. JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY. Vol. 39, 2004 páginas 1287-1294. Resumen y página 1289. | |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente se refiere, tal y como ha sido presentada, a un método para la detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados seleccionados de entre dimetilarginina asimétrica (ADMA), dimetilarginina simétrica (SDMA) y monometilarginina (MMA), en muestras biológicas aisladas, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem caracterizado porque la preparación de la muestra comprende la adición de los estándares internos marcados isotópicamente $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA, y la centrifugación de la mezcla en filtros de ultracentrifuga para la eliminación de proteínas (reivindicación 1). La cromatografía de líquidos es una cromatografía de líquidos de alta resolución (reivindicación 2). La cromatografía se lleva a cabo en una columna de gel de sílice y con una fase móvil que contiene un formador de pares iónicos (reivindicación 3). El formador de pares iónicos se selecciona de entre ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido trifluoroacético (reivindicación 4). La cromatografía se lleva a cabo a un pH superior a 1,5 (reivindicaciones 5 y 6). La cuantificación se realiza a unas transiciones concretas para ADMA, SDMA y arginina (reivindicaciones 7-11). Las muestras biológicas se seleccionan de entre fluido biológico o tejido (reivindicaciones 12 y 13). Se reivindica

También el Kit para llevar a cabo dicho método (reivindicaciones 14-17) y por último el uso de dicho kit para la detecciones y/o cuantificación mediante LC-MS/MS de arginina y sus derivados metilados (reivindicaciones 18-20).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA PCT ARTS. 6 Y 8 DE LA LP.

El documento D01 hace referencia a un bioanálisis simultáneo de L-arginina, L-citrulina, y dimetilaargininas mediante LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem). Se desarrollo un método LC-MS/MS para cuantificar simultáneamente 6 compuestos relacionados con arginina utilizando 3 estándares internos separadamente (véase resumen). Para dicho bioanálisis se utilizaron estándares internos marcados isotópicamente, tales como $^{13}\text{C}_6$ -ARG, D_4 -CIT y D_7 -ADMA, para la detección de ARG, CIT y dimetilargininas, respectivamente. (Véase resumen). Después de la adición de los estándares internos marcados isotópicamente se llevó a cabo una centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos (véase página 4, apartado 2.6). La fase móvil contiene, entre otros ácido trifluoroacético (véase página 4, apartado 2.7).

El documento D02 se refiere a la cuantificación de dimetilarginina asimétrica (ADMA) en plasma humano mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada a espectrómetro de masas (véase resumen, páginas 63-64). Se utilizaron para ello estándares internos marcados isotópicamente para ARG (arginina) y ADMA, concretamente $^{13}\text{C}_6$ -arginina y D_6 -ADMA (véase página 64). En la cromatografía se utilizó ácido fórmico (véase página 65, columna izquierda) y las medición se llevo a cabo a una transición de 351 m/z para arginina, 357 m/z para $^{13}\text{C}_6$ -Arginina, 379 m/z para ADMA y SDMA, 385 m/z para D_6 -ADMA.

El documento D03 trata sobre la determinación de arginina y dimetilarginina asimétrica (ADMA) en plasma humano por cromatografía líquida/ espectrómetro de masas mediante la técnica de dilución isotópica (véase resumen). Los estándares internos utilizados marcados isotópicamente fueron $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_6 -ADMA (véase página 1289). En la cromatografía líquida se empleó ácido fórmico (véase página 1289) y la detección se llevó a cabo a una transición de 351 m/z para ARG, 357 m/z para $^{13}\text{C}_6$ -Arginina, 379 m/z para ADMA y SDMA y 385 para D_6 -ADMA.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados anteriormente, se puede decir que las reivindicaciones 1-4 carecen de novedad y actividad inventiva, por haberse encontrado un método de detección y/o cuantificación de arginina y sus derivados metilados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem que comprende la adición de estándares internos marcados isotópicamente $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA (véase documento D01, resumen y páginas 3 y 4), y posterior centrifugación a $10.000 \times g$ durante 20 minutos (véase documento D01, página 4, apartado 2.6), conteniendo, además, en la fase móvil, ácido trifluoroacético (véase documento D01, página 4, apartado 2.7). Aunque en el documento citado D01 se encuentren otros compuestos a parte de $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA, como son $^{15}\text{N}_4$ -ARG y D_4 -CIT, el hecho de que la reivindicación 1 de la presente solicitud de patente esté redactada como: método caracterizado porque la preparación de la muestra comprende, quiere decir que dicho método puede contener además de $^{13}\text{C}_6$ -Arginina y D_7 -ADMA otros componentes. En cuanto a las reivindicaciones referidas a las condiciones de pH y las m/z (reivindicaciones 5-11) a las que se llevan a cabo las transacciones, carecerían de novedad y actividad inventiva a no ser que el solicitante especificase que dichas condiciones suponen una mejora con respecto a las condiciones contenidas en el estado de la técnica. Y por último, el hecho de que el método se lleve a cabo en muestras biológicas es evidente para un experto en la materia (reivindicaciones 12-13) y lo mismo se puede decir para las reivindicaciones del kit y uso de dicho kit (reivindicaciones 14-20). Por consiguiente, las reivindicaciones 1-20 carecen de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.