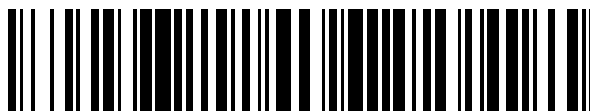


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 565**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08782638 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2188624**

54 Título: **Método para la generación y el uso de patrones isotópicos estables en datos de espectros de masas**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 954253 P

02.10.2007 US 976923 P

05.08.2008 US 186395

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

28.07.2014

73 Titular/es:

IROA TECHNOLOGIES LLC (100.0%)

7395 Warren Road

Ann Arbor, MI 48105 , US

72 Inventor/es:

WARD BEECHER, CHRISTOPHER, WILLIAM

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 480 565 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).

Método para la generación y el uso de patrones isotópicos estables en datos de espectros de masas**Descripción**

5 CAMPO TÉCNICO

10 La presente solicitud se refiere a la creación y al uso de patrones isotópicos estables en los análisis de espectros de masas. Estos patrones pueden introducirse a través métodos biológicos o no biológicos, o combinaciones de ambos. Más concretamente, un método contemplado utiliza un compuesto con un patrón isotópico estable predefinido y único como estándar. Las relaciones isotópicas no son modificadas por un sistema biológico.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 El uso de isótopos estables para determinar la información biológica tiene una larga e ilustre historia [véase, Hellerstein, *Metabolic Engineering* 6:85-100 (2004)]. El más antiguo y más frecuente de tales usos se encuentra en los estudios de investigación del metabolismo en los que se incorpora un isótopo estable a una molécula específica en un lugar específico. Esta molécula marcada isotópicamente, o "precursor", se alimenta a un organismo *in vivo*, sistema celular *in vitro* o sistema libre de células *in vitro* durante un periodo de tiempo breve o prolongado, después del cual se determina el destino del isótopo, ya sea mediante el uso de RMN, espectrometría de masas (EM), degradación química u otra técnica de detección.

20 A diferencia del uso de isótopos radiactivos, el uso de isótopos estables se considera generalmente seguro y libre de regulación. Aunque, en general, un estudio utiliza por lo general un único isótopo incorporado en un lugar específico con el fin de conseguir una precisión en la comprensión del destino metabólico de una molécula, otra forma de realización del uso de isótopos estables utiliza moléculas marcadas totalmente (> 99% de un átomo está reemplazado con un equivalente isotópico) o marcadas universalmente (el isótopo se distribuye universalmente dentro de la molécula diana por debajo de los niveles de saturación). Existen muchos estudios conocidos en los que se incorpora más de un isótopo en una molécula diana, y se examinan todos los fragmentos isotópicos para determinar sus destinos diferenciales. En todos los casos, estos métodos son análisis dirigidos; es decir, buscan la incorporación de un átomo marcado específico en otras moléculas específicas.

25 Otro uso de los compuestos estables marcados isotópicamente es como estándares internos para sus homólogos no marcados, como se describe en EE.UU. 2007 031911. En un uso de este tipo, se añade una molécula isotópicamente enriquecida a una muestra o extracto a una concentración conocida antes del análisis, y la medida final determina la concentración exacta del material no marcado por comparación. En este tipo de estudio, no es raro que un investigador añada más de un estándar isotópicamente distinto si va a cuantificarse más de una molécula.

30 De hecho, existen formas extremas en las que se prepara una mezcla extremadamente compleja desarrollando un organismo complejo en una materia prima definida isotópicamente de manera que todo el organismo esté compuesto en gran medida, si no completamente, de moléculas que consisten en un único isótopo [Wu *et al.*, *Anal Biochem* 336:164-171 (2005)]. En esta situación, se introduce el mismo estándar en todas las muestras, pero el estándar no porta información alguna salvo para fines de cuantificación relativa; es decir, el estándar no tiene ninguna relación con el experimento en cuestión. Históricamente, tales estándares se construyen cuidadosamente para que difieran de cualquier otro analito en una diferencia de masa específica.

35 En muchas áreas de la ciencia, la necesidad de separaciones cromatográficas reproducibles es fundamental. Sin embargo, el enfoque más común es poner a prueba de forma repetida el equipo antes de procesar la muestra a analizar, porque la variabilidad inherente de los sistemas cromatográficos es un problema desafortunado e irresoluble. Existen soluciones a este problema en las que se añaden o "fijan" compuestos no nativos de la muestra inyectada a concentraciones predeterminadas antes de la inyección, y se utilizan como puntos de referencia en el flujo de eluyente. Estos compuestos se denominan estándares cromatográficos.

40 En todos estos casos, el tiempo de elución (y, posiblemente, la cuantificación) se corrige(n) a continuación matemáticamente según la posición (y el tamaño) de los picos de los estándares. Cuando se hace esto, el cromatograma no se basa en el "tiempo de retención", sino en el "índice de retención". Esta estrategia funciona bien cuando los estándares pueden identificarse fácilmente y se separan de los demás constituyentes de la muestra, ya sea en tiempo o cualquier otra característica física, tal como la masa.

45 Lamentablemente, este no suele ser el caso. Si otro compuesto co-eluye de la columna cerca del estándar y comparte cualquier ion común, no puede utilizarse el estándar. Por esta razón, con frecuencia es necesario utilizar varios de tales estándares con el fin de asegurar que podrá utilizarse uno o más de los estándares.

50 La supresión iónica es un fenómeno que se produce durante los procesos de ionización espectroscópica de masas cuando la eficacia de ionización de la muestra se somete a variabilidad debido a las características de los compuestos analitos que se encuentran presentes. Por lo tanto, en su forma más común, el número de moléculas que podrían ionizarse excede la cantidad de carga disponible. En esta situación, las moléculas que se ionizan con

mayor eficacia son aquellas que pueden adquirir la carga más fuertemente, y las moléculas restantes se ionizan con una eficacia mucho menor.

5 La presente invención proporciona un método para crear y utilizar patrones de isótopo estable como estándares internos en los análisis de espectros de masas. Por lo tanto, un método contemplado utiliza como estándar un compuesto con una relación predefinida, única y no natural de isótopos estables y por lo tanto proporciona una solución a los problemas del análisis de espectro de masas asociados con la supresión iónica además de proporcionar un estándar más general que puede utilizarse en el ensayo de múltiples tipos de sistemas.

10 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

15 En su sentido más amplio, la invención se refiere a la materia objeto tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la invención contempla una composición que está concebida para el análisis de espectro de masas. La composición está compuesta por una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a analizar y (ii) un compuesto estándar. El analito puede ser una o varias moléculas cualesquiera que puedan analizarse mediante espectro de masas y por lo tanto tengan un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 unidades de masa atómica (uma), y preferentemente inferior a aproximadamente 1.000 uma. Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Esos dos isótopos se encuentran presentes en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos. Debido a la presencia de estos isótopos, cada compuesto adquiere un perfil molecular único de dos o más picos que los distingue fácilmente de cualquier compuesto natural.

25 Otro aspecto de la invención contempla un método para determinar la exactitud de un ensayo espectrográfico de masas de una muestra. El presente método contempla las etapas de proporcionar una muestra para el análisis que comprenda una composición concebida para el análisis de espectro de masas que contiene una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar. Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. También puede utilizarse más de un par de tales isótopos. Los dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas del compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos. Se lleva a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen los dos isótopos.

35 Se determina la relación de los dos picos entre sí. Esa relación de picos determinada se compara con la relación predeterminada de los picos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas. Una razón isotópica determinada que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas eran correctas y sirven para identificar el "estándar", mientras que una relación isotópica determinada que sea superior al error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas incluyen una contribución de una fuente inesperada. En este caso, la multiplicidad del contenido informativo proveniente del "estándar" permite eliminar la contribución inesperada.

45 Puede utilizarse otro método similar para determinar la exactitud de una separación cromatográfica de una muestra. En el presente método, se proporciona una muestra separada por cromatografía para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas que contiene una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar. Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Nuevamente, también puede utilizarse más de un par de tales isótopos. Los dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas del compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos.

55 Se lleva a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen los dos isótopos. Se determina la relación de los dos isótopos entre sí en los picos del compuesto estándar y a continuación se compara con la relación predeterminada de los isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas. Una relación isotópica determinada que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que se ha encontrado correctamente el estándar, mientras que una relación isotópica determinada que sea superior o inferior al error experimental de la relación predeterminada indica que se ha encontrado el estándar pero que estaba contaminado por otro componente.

60 Los aspectos de la invención son:

65 1. Una composición concebida para el análisis de espectro de masas compuesta por una cantidad determinable

- 5 por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar, en el que cada (una de las) molécula(s) del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica una, estando presentes dichos dos isótopos en las moléculas de dicho compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en la que el par de isótopos estables es Cl-35 y Cl-37, u O-6 y S-18, o Br-79 y Br-81, o una mezcla de dos o tres de esos pares isotópicos.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 15.000 uma o menos.
4. La composición según la reivindicación 3, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 uma o menos.
- 20 5. La composición según la reivindicación 4, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 uma o menos.
6. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene una pluralidad de analitos a ensayar.
- 25 7. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene un segundo compuesto estándar, en la que dicho segundo compuesto estándar contiene uno u otro de un segundo par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica, estando presentes dichos dos isótopos en las moléculas de dicho segundo compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos, siendo diferentes los pesos moleculares de los primeros compuestos estándares de los pesos moleculares de dicho segundo compuesto estándar.
- 30 8. La composición según la reivindicación 7, en la que dichos pares isotópicos primero y segundo son isótopos del mismo elemento.
- 35 9. La composición según la reivindicación 7, en la que dichos pares isotópicos primero y segundo son isótopos de un elemento diferente.
- 40 10 Un método para determinar la exactitud de un ensayo espectrográfico de masas de una muestra que comprende las etapas de:
- 45 a) proporcionar una muestra para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- b) llevar a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen dichos dos isótopos;
- 50 c) determinar la relación de dichos dos isótopos entre sí;
- d) comparar la relación isotópica determinada de la etapa c) con la relación predeterminada de dichos isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas, en el que una relación isotópica determinada en la etapa c) que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas de la etapa b) eran correctos, y una relación isotópica determinada en la etapa c) que sea superior al error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas de la etapa b) eran incorrectos.
- 55 11. Un método para determinar la exactitud de una separación cromatográfica de una muestra que comprende las etapas de:
- 60 a) proporcionar una muestra separada por cromatografía para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas según cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
- b) llevar a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen dichos dos isótopos;
- 65 c) determinar la relación de dichos dos isótopos entre sí en los picos del compuesto estándar;
- d) comparar la relación isotópica determinada de la etapa c) con la relación predeterminada de dichos isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas, en el que una relación isotópica determinada en la etapa c) que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados de la separación cromatográfica eran correctos, y una relación isotópica determinada en la etapa c) que sea superior al error experimental de la relación

predeterminada indica que los resultados de la separación cromatográfica eran incorrectos.

12. El método según la reivindicación 11, en el que dicho compuesto estándar se mezcla con la muestra separada por cromatografía una vez terminada la separación cromatográfica.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En los dibujos que forman parte de la presente descripción,

10 la Fig. 1, en cuatro paneles, Fig. 1A-D, ilustra los espectros de masas hipotéticos que muestran diversos patrones que puede crearse colocando los átomos de cloro 1 (1A), 2 (1B), 3 (1C) ó 4 (1D) en una molécula de azúcar $C_6H_{12}O_6$ en lugar de los átomos de hidrógeno, en los que el átomo de cloro que se utiliza en la síntesis tiene una relación inicial de Cl-35/Cl-37 (50:50).

15 la Fig. 2, en cuatro paneles, 2A-D, ilustra un espectro de masas hipotético de un compuesto que muestra el "pico principal" en "1" en el eje de abscisas y la diversidad de patrones que pueden crearse colocando 2 átomos de cloro en la molécula, en el que la relación inicial de Cl-35/Cl-37 se modifica en 1/1 (2A), 2/1 (2B), 3/1 (2C) y 1/2 (2D).

20 La presente invención tiene varios beneficios y ventajas.

Un beneficio es que utilizando relaciones isotópicas diseñadas específicamente puede identificarse el pico del estándar dentro de la totalidad de los picos de analito observados en el espectro, independientemente de la complejidad del espectro. Concretamente, cualquier señal del espectro puede a) proceder del cultivo de control, o b) del cultivo experimental, o c) ser un artefacto adquirido durante la preparación de la muestra, o d) proceder del estándar aplicado desde el exterior. Cada una de estas clases de compuestos tiene características únicas y firmas isotópicas según el diseño experimental; sin embargo, el estándar tiene patrones que no pueden conseguirse por medios naturales.

30 Una ventaja de la invención es que la variación que se introduce experimentalmente; es decir, el "ruido", puede anularse estadísticamente y/o minimizarse en gran medida.

Otra ventaja de la invención es que en la interfaz cromatografía de líquidos-espectro de masas, existe una pérdida de señal debido a la "supresión iónica". La supresión iónica se produce siempre que hay más compuesto que disponibilidad de carga. En esta situación, algunos compuestos se cargan a expensas de otros compuestos. La variabilidad de la eficacia de ionización es tal que algunas moléculas no pueden cuantificarse con precisión. El método de la presente invención elimina casi por completo el problema de la supresión iónica debido a que la capacidad de un compuesto para ionizarse está en función de su estructura y no se ve modificada significativamente por su distribución isotópica.

40 En un análisis de cromatografía de líquidos existe alguna variación de menor importancia que puede corregirse incluyendo un estándar cromatográfico para el tamaño de inyección, y la alineación. Otro beneficio de la invención proporciona un medio de esta corrección, de manera que pueda entenderse mejor la variación entre muestras.

45 En el procesamiento de cualquier muestra biológica para un análisis existe también una cierta variación de menor importancia que puede entenderse como parte de un programa de Garantía de Calidad/Control de Calidad (QA/QC). En algunos casos, puede corregirse la información proveniente de estas variaciones o, si no, deben ignorarse los resultados. Otra ventaja de la invención es que proporciona medios por los que puede entenderse mejor esta corrección de la variación entre muestras.

Otros beneficios y ventajas más de la invención resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la siguiente descripción.

55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención contempla una composición que está concebida para el análisis de espectro de masas. La composición está compuesta por una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a analizar y (ii) un compuesto estándar. El analito puede ser una o varias moléculas cualesquiera que puedan analizarse mediante el espectro de masas y por lo tanto tengan un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 unidades de masa atómica (uma), y preferentemente inferior a aproximadamente 1.000 uma.

60 Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Esos dos isótopos se encuentran presentes en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos. Debe entenderse que puede estar presente más de uno de tales pares y que cuando está presente más de

65

un par en una molécula estándar determinada, esos átomos pueden ser isótopos del mismo elemento o de elementos diferentes. Por lo tanto, un único compuesto estándar puede tener un par de Cl-35 y Cl-37 en sus moléculas, o dos o más de tales pares. Además, el estándar puede tener un par de átomos Cl-35 y Cl-37 y un par de átomos Br-79 y Br-81, y similares.

5 Otro aspecto de la invención contempla un método para determinar la exactitud de un ensayo espectrográfico de masas de una muestra. El presente método contempla proporcionar una muestra para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas que contiene una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar. Una composición analizada anteriormente es una de tales muestras.

10 Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. También puede utilizarse más de un par de tales isótopos, como se ha analizado anteriormente. Los dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas del compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos. La relación isotópica del compuesto estándar tiene que ser sólo lo suficientemente distinta de la relación natural para que esa relación no pueda darse en la naturaleza. Se lleva a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen los dos isótopos.

15 Se determina la relación del par de dos isótopos (o pares de isótopos adicionales que puedan estar presentes) entre sí. Esa relación isotópica determinada se compara con la relación predeterminada de los isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas. Una relación isotópica determinada que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que se ha encontrado el estándar correctamente y que no está contaminado, mientras que una relación isotópica determinada que sea superior o inferior al error experimental de la relación predeterminada indica que se ha encontrado la molécula estándar pero está contaminada por iones de otro compuesto.

20 En una manifestación contemplada del presente método, se introducen los compuestos estándares en una muestra para el análisis de espectro de masas, generalmente una vez terminado el tratamiento biológico, sin suponer que se transformarán, sino más bien con relaciones isotópicas específicas, predeterminadas y altamente diagnósticas en su composición de manera que puedan identificarse (véanse las figuras 1 y 2) en presencia de otros materiales.

25 Por ejemplo, puede mezclarse un compuesto con un perfil isotópico distinto que no abunda de forma natural con una muestra como estándar interno para determinar su porcentaje de recuperación, derivatización, inyección u otra característica de un proceso. Si se sintetiza el estándar para que tenga un patrón no natural específico en su composición isotópica, puede identificarse fácilmente mediante análisis espectroscópico de masas. Además de la fácil identificación del estándar, si uno de los picos isotópicos de analito buscados ha sido contaminado por un compuesto aleatorio, ese hecho resulta evidente debido a que ese analito tendrá una relación inesperada con respecto al resto del patrón "normal". Esta situación es fácilmente identificable y puede corregirse la cuantificación para determinar la presencia de un contaminante.

30 En muchas áreas de la ciencia, la necesidad de separaciones cromatográficas reproducibles es fundamental. Sin embargo, el enfoque más común es poner a prueba de forma repetida el equipo antes de procesar la muestra a analizar, porque la variabilidad inherente de los sistemas cromatográficos es un problema desafortunado e irresoluble. Existen soluciones a este problema en las que se añaden o "fijan" compuestos no nativos de la muestra inyectada a concentraciones predeterminadas antes de la inyección, y se utilizan como puntos de referencia en el flujo de eluyente. Estos compuestos se denominan estándares cromatográficos.

35 En tales casos, el tiempo de elución (y, posiblemente, la cuantificación) se corrige matemáticamente según la posición (y el tamaño) de los picos de los estándares. Cuando se hace esto, el cromatograma no se basa en el "tiempo de retención", sino en el "índice de retención". Esta estrategia funciona bien cuando los estándares pueden identificarse fácilmente y se separan de los demás constituyentes de la muestra, ya sea en tiempo o cualquier otra característica física, tal como la masa. Lamentablemente, este no suele ser el caso. Si otro compuesto co-eluye de la columna cerca del estándar y comparte cualquier ion común, no puede utilizarse el estándar. Por esta razón, con frecuencia es necesario utilizar varios de tales estándares con el fin de asegurar que podrá utilizarse uno o más de los estándares. Los estándares para su uso en las separaciones cromatográficas tienen por lo general pesos moleculares de aproximadamente 500 amu a aproximadamente 750 amu.

40 En el método de la presente invención, los compuestos analito a utilizar como estándares tienen dos o más picos cuando se ensayan en un espectrómetro de masas, y estos picos tienen relaciones cuidadosamente predeterminadas. En esta situación, debido a que el patrón introduce un determinado nivel de redundancia, cualquiera de los picos lleva toda la información, y por lo tanto es mucho menos probable que un compuesto utilizado como estándar deje de ser útil debido a la contaminación en un espectrómetro de masas. Además, tales estándares son muy fáciles de localizar utilizando sistemas automatizados o software de búsqueda.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención contempla un método para determinar la exactitud de una separación cromatográfica. En este caso, se proporciona una muestra separada por cromatografía para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas que contiene una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar. Cada una de las moléculas del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Esos dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas de dicho compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos, como se ha analizado anteriormente.

Se lleva a cabo un análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen dichos dos isótopos. Se determina la relación de los dos isótopos entre sí en los picos del compuesto estándar. Esa relación isotópica determinada se compara con la relación predeterminada de los isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas. Una razón isotópica determinada de esta manera que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados de la separación cromatográfica eran correctos. Por el contrario, una relación isotópica determinada que sea superior al error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados de la separación cromatográfica eran incorrectos.

Un método contemplado prevé el uso y la presencia de dos o más compuestos estándares distintos de diferente peso molecular en la muestra. Esos dos o más compuestos estándares pueden contener los mismos o diferentes pares isotópicos primero y segundo. Cuando se utilizan dos o más de los mismos pares isotópicos, las relaciones predeterminadas de isótopos pueden ser iguales o diferentes.

El compuesto estándar puede mezclarse con la muestra para el análisis de espectro de masas antes o después de haber separado la muestra por cromatografía. Sin embargo, resulta preferente mezclar el estándar con la muestra separada por cromatografía una vez terminada la separación cromatográfica.

En otra forma de realización (no biológica) del presente método, se utiliza un compuesto que tiene un átomo de cloro, oxígeno, bromo (o cualquier otro elemento que tenga dos isótopos estables). El método requiere que el compuesto se prepare de forma individual a partir de isótopos seleccionados de cloro, por ejemplo, y a continuación se ajuste la distribución isotópica del estándar para la óptima identificación.

A modo de ejemplo ilustrativo, el cloro tiene dos isótopos principales que son Cl-35 (abundancia natural del 75%) y Cl-37 (abundancia natural del 24%). Si la molécula que se utiliza como estándar tiene sólo un átomo de cloro, puede obtenerse una molécula que aparezca en el espectro tanto en su masa de base; es decir, aquel con el Cl-35, como en un M+2 con una altura igual por la incorporación de una mezcla igual de los dos isótopos de cloro en la molécula (véanse las figuras 1 y 2), en vez de utilizar las abundancias naturales. Puede utilizarse de esta manera una molécula que tenga un solo átomo de cloro dentro de la molécula con el fin de encontrar moléculas que sean químicamente estables y tengan una gran variedad de características químicas. Si se utiliza una molécula que tenga dos o más átomos de cloro, los patrones que pueden conseguirse son bastante complejos; es decir, con dos átomos de cloro hay tres picos. En otras manifestaciones, pueden emplearse de manera similar otros elementos con distribuciones isotópicas estables adecuadas; éstos pueden incluir oxígeno (O-16 y O-18), bromo (Br-79 y BR-81).

Los beneficios de este aspecto de la invención incluyen: a) es poco probable que cualquier molécula contaminante inutilice el estándar, y b) el patrón isotópico predeterminado que está incorporado en el estándar es fácilmente identificable por una persona o software. Más adelante se analiza cada uno de estos beneficios.

En el uso actual de estándares, el material empleado es generalmente similar al analito que se está midiendo y sin embargo es diferenciable de alguna manera. Esto suele significar que puede reemplazarse una simple sustitución de un isótopo del analito. Por ejemplo, podría reemplazarse cualquier hidrógeno en una molécula de analito y utilizar la molécula como estándar para el analito. Sin embargo, en realidad un estándar de este tipo sería erróneo ya que la masa del estándar quedará en gran medida dentro en la distribución isotópica normal del analito, y por lo tanto en situaciones más realistas se sustituirá más de un átomo con el fin de salir de debajo de la sombra isotópica "normal" de un analito. Incluso cuando es posible desplazar el estándar fuera de la distribución normal de un analito, no hay garantía de que no haya otra molécula en cuya sombra isotópica caiga el estándar.

Un compuesto considerado en el presente documento generalmente no se transforma biológicamente si va a utilizarse como estándar. Sino más bien, los patrones isotópicos son inherentes en el momento de su uso.

En estos usos no biológicos, los patrones isotópicos facilitan la ayuda y el fortalecimiento de la capacidad y la facilidad de un usuario para su identificación. Una vez que se identifican en una mezcla los patrones isotópicos proporcionan múltiples picos, cualquiera de los cuales puede utilizarse para la cuantificación. Por lo tanto, si se da el caso de que ningún pico isotópico se vea afectado por un compuesto contaminante, puede utilizarse cualquier pico para la cuantificación de manera fiable. Sin embargo, si los picos isotópicos no demuestran las relaciones

apropiadas, se entiende que el valor atípico es el que tiene un tamaño anormalmente grande y la verdadera cuantificación puede calcularse a partir de los demás. Por lo tanto, esta técnica permite eliminar la contaminación problemática y conseguir una estimación más precisa de la verdadera cantidad del compuesto en cuestión.

5 Otro aspecto de la invención contempla el uso de dos o más estándares. En este caso, cada una de las moléculas del primer compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Esos dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas del primer compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos, como se ha analizado anteriormente.

10 El segundo compuesto estándar también contiene uno u otro de un segundo par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica. Estos dos isótopos se encuentran presentes en las moléculas del segundo compuesto estándar en una relación predeterminada que también es distinta de la relación natural de esos isótopos. Los pesos moleculares de los primeros compuestos estándares son diferentes de los pesos moleculares de dicho segundo compuesto estándar. Por ejemplo, el primer compuesto estándar podría ser 2-cloro-2-desoxiglucosa, mientras que el segundo estándar es de 2-cloro-2-desoxirribosa.

20 Por lo tanto, en un aspecto, los pares isotópicos primero y segundo son iguales. En otro aspecto, los pares isotópicos primero y segundo son diferentes. En este caso, por ejemplo, podría utilizarse 2-cloro-2-desoxirribosa y 2-bromo-2-glucosa. Como alternativa, podría utilizarse 2-cloro-2-desoxiglucosa y 2-bromo-2-desoxiglucosa. Los pares isotópicos estables son de nuevo preferentemente Cl-35 y Cl-37, u O-16 y O-18, o Br-79 y Br-81, o una mezcla de dos o tres de esos pares isotópicos.

25 Los componentes de una muestra típica a analizar mediante espectrometría de masas se separan por lo general por sí mismos antes de la introducción en el espectrómetro de masas. Esa separación puede llevarse a cabo mediante cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis y similares. También pueden combinarse diversas técnicas de separación.

30 El equipo ilustrativo que puede utilizarse para llevar a cabo un método contemplado incluye los siguientes. Espectrómetros de masas:

35 Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent 5975 Serie MSD, Thermo-Fisher LTQ, Thermo-Fisher ORBITRAP®, Waters MICROMASS® GCT Premier™ y Waters LCT Premier™.

Los sistemas de separación pueden ser parte de la EM (como en el GC) o independientes, e incluyen de manera ilustrativa: los sistemas Waters ACQUITY UPLC®, Agilent Rapid Resolution y Thermo Surveyor Plus.

40 Como es bien conocido en la técnica, el análisis de los espectros de masas se logra por lo general con la ayuda del software llamado selector de picos ("peak-picker") que está diseñado para identificar y presentar los picos de iones del espectro de masas. Este software está disponible en el mercado, en acceso libre, y de trabajadores privados. Uno de tales programas se describe en Katajamaa *et al.*, BMC Bioinformatics 2005, 6:179; doi: 10.1186/1471-2105-6-179, mientras que otro se describe en Rögnvaldsson *et al.*, 2004 J. Chrom. B, 807(2):209-215; doi:10.1016/j.jchromb.2004.04.010. Los productos comerciales se ilustran mediante los disponibles con el nombre RAZOR TOOLS/6™ de Spectrum Square Associates, 755 Snyder Hill, Ithaca NY 14850 EE.UU.

45 Un método contemplado es general en su aplicabilidad y se ilustra mediante los siguientes ejemplos específicos.

50 Ejemplo 1: Estándar Interno

El presente método utiliza la distribución isotópica anormal (en vez de la enriquecida) de un compuesto para identificar ese compuesto como estándar específico cuando se introduce en una mezcla de otros compuestos que no presentarán la misma forma de anomalía. El presente método sólo requiere sintetizar las moléculas con isótopos purificados de cloro, oxígeno o bromo (u otros elementos con distribuciones isotópicas distintivas) y a continuación mezclarlas para conseguir la relación isotópica deseada y utilizarlas como estándares en los que sus patrones de distribución isotópica no natural distintivos se convierten en el identificador para el estándar. Como alternativa, la composición isotópica elemental puede conseguirse antes de la etapa de síntesis final con lo que los productos de síntesis resultantes poseen la firma isotópica deseada.

60 El patrón anormal ideal puede ser tan simple como una relación uno a uno del ion precursor y su M+2 asociado (véase la Fig. 2), o más complejo a medida que surja la necesidad. El elemento clave es que la firma isotópica sea única y fácilmente identificable incluso en presencia de una molécula co-eluyente con la que pueda compartir una masa atómica.

65 Por lo tanto, a medida que se prepara una muestra de cualquier tipo para el análisis, se le puede añadir una

gran diversidad de productos químicos, cada uno de los cuales tiene una firma isotópica única. Debido a que la firma isotópica no puede conseguirse en cualquier sustancia natural, cada uno de estos estándares puede identificarse de manera exclusiva después del análisis. Cuando se identifica, su presencia o cantidad pueden ser la característica buscada.

5 Si el compuesto se utilizase como medida de un proceso, su cantidad es probablemente la característica significativa. Por lo tanto, si se utilizase un compuesto como estándar de recuperación, estándar de derivatización, estándar de inyección o estándar de proceso, se controla cuidadosamente la cantidad que se introduce antes de la cuantificación y la cantidad observada después de la cuantificación es indicio del éxito de todos los procesos en los que interviene.

10 En algunos casos, el estándar puede introducirse en la última etapa, en estas situaciones la presencia del estándar puede ser más importante que su cantidad, ya que el valor crítico medido es la respuesta durante el análisis.

15 En cada uno de estos casos, si el compuesto utilizado como estándar no tiene una característica única, su valor puede verse comprometido por otro compuesto que tenga una característica que se solapa. Cuando los compuestos utilizados como estándares contienen distribuciones isotópicas únicas que no pueden lograrse en el mundo natural, existe menos probabilidad de un error de identificación de este tipo.

20 En el caso más simple, si la molécula se ha construido con una mezcla 50:50 de isótopos de cloro, oxígeno o bromo, el compuesto presentará dos picos de espectro de masas que están separados por dos unidades de masa. Será poco probable que un compuesto de este tipo pueda ser objeto de error o interferencia porque si cualquier compuesto natural interfiere con uno de los dos picos, el otro lo indicará y permitirá ignorar los datos falsos.

25 El uso del artículo "un" o "una" pretende incluir uno o más.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición concebida para el análisis de espectro de masas compuesta por una cantidad determinable por espectrometría de cada uno de (i) al menos un analito a ensayar y (ii) un compuesto estándar, en el que cada (una de las) molécula(s) del compuesto estándar contiene uno u otro de un par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica uma, estando presentes dichos dos isótopos en las moléculas de dicho compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el par de isótopos estables es Cl-35 y Cl-37, ó O-16 y O-18, o Br-79 y Br-81, o una mezcla de dos o tres de esos pares isotópicos.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 15.000 uma o menos.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 uma o menos.
- 25 5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicho al menos un analito a ensayar tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 uma o menos.
- 30 6. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene una pluralidad de analitos a ensayar.
- 35 7. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición contiene un segundo compuesto estándar, en la que dicho segundo compuesto estándar contiene uno u otro de un segundo par de dos isótopos estables del mismo elemento que difieren en términos de peso molecular en al menos dos unidades de masa atómica, estando presentes dichos dos isótopos en las moléculas de dicho segundo compuesto estándar en una relación predeterminada que es distinta de la relación natural de esos isótopos, siendo diferentes los pesos moleculares de los primeros compuestos estándares de los pesos moleculares de dicho segundo compuesto estándar.
- 40 8. Composición según la reivindicación 7, en la que dichos pares isotópicos primero y segundo son isótopos del mismo elemento.
- 45 9. Composición según la reivindicación 7, en la que dichos pares isotópicos primero y segundo son isótopos de un elemento diferente.
- 50 10. Método para determinar la exactitud de un ensayo espectrográfico de masas de una muestra que comprende las etapas de:
- 55 a) proporcionar una muestra para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- b) llevar a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen dichos dos isótopos;
- 60 c) determinar la relación de dichos dos isótopos entre sí;
- d) comparar la relación isotópica determinada de la etapa c) con la relación predeterminada de dichos isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas, en el que una relación isotópica determinada en la etapa c) que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas de la etapa b) eran correctos, y una relación isotópica determinada en la etapa c) que sea superior al error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados del análisis de espectro de masas de la etapa b) eran incorrectos.
- 65 11 Método para determinar la exactitud de una separación cromatográfica de una muestra que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra separada por cromatografía para el análisis que comprende una composición concebida para el análisis de espectro de masas según cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
- b) llevar a cabo el análisis de espectro de masas de la muestra para proporcionar un conjunto de picos de ion analito, incluidos los picos para los iones producidos por las moléculas de compuesto estándar que contienen dichos dos isótopos;
- c) determinar la relación de dichos dos isótopos entre sí en los picos del compuesto estándar;
- d) comparar la relación isotópica determinada de la etapa c) con la relación predeterminada de dichos isótopos presentes en las moléculas del compuesto estándar antes del análisis de espectro de masas, en el que una relación isotópica determinada en la etapa c) que se encuentre dentro del error experimental de la relación predeterminada indica que los resultados de la separación cromatográfica eran correctos, y una relación isotópica determinada en la etapa c) que sea superior al error experimental de la relación predeterminada indica

que los resultados de la separación cromatográfica eran incorrectos.

12. Método según la reivindicación 11, en el que dicho compuesto estándar se mezcla con la muestra separada por cromatografía una vez terminada la separación cromatográfica.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1A

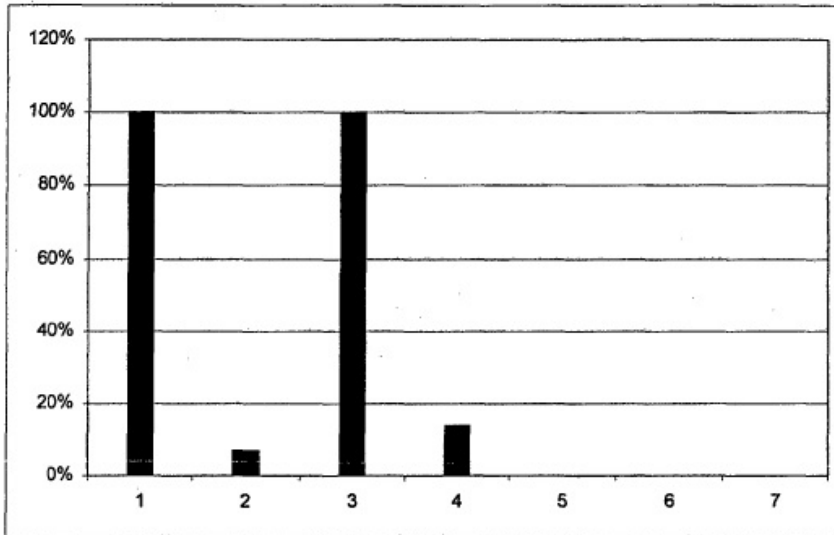


Fig. 1B

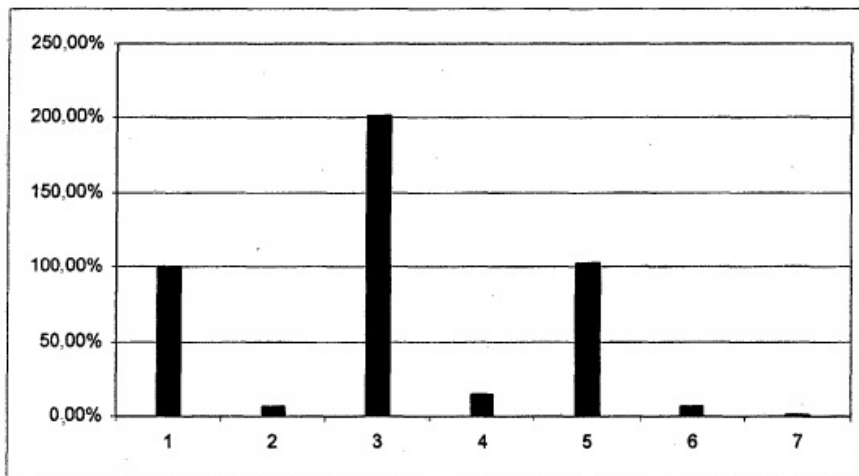


Fig. 1C

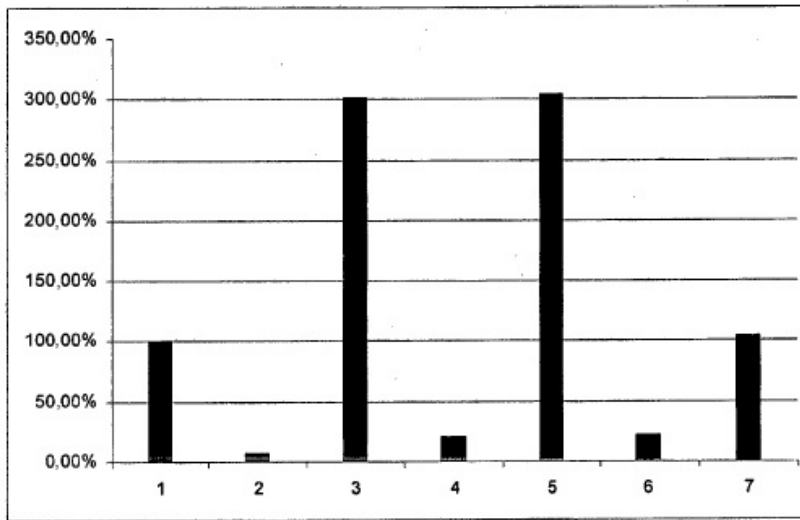


Fig. 1D

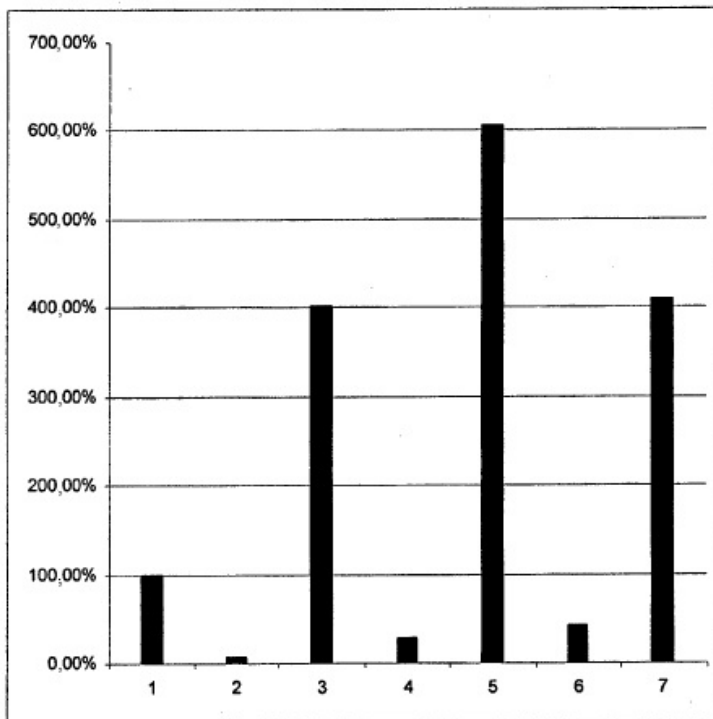


Fig. 2A

RELACIÓN 1/1

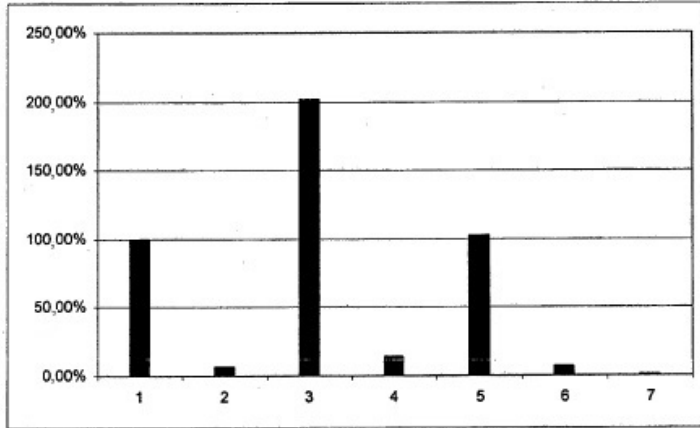


Fig. 2B

RELACIÓN 2/1

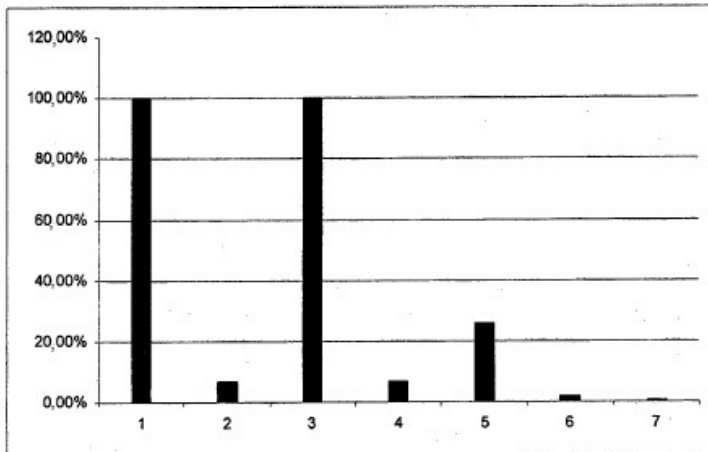


Fig. 2.C

RELACIÓN 3/1

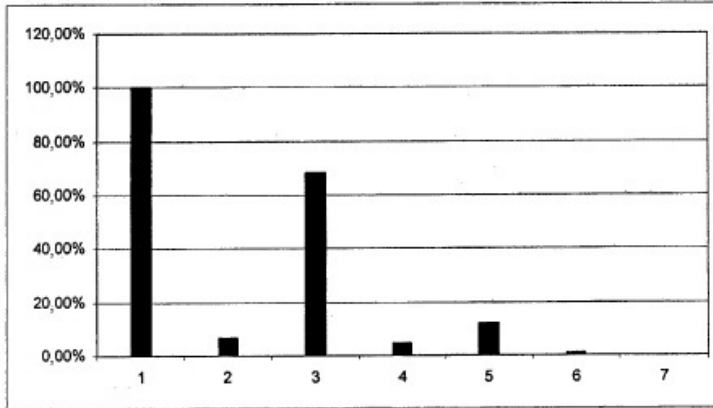


Fig. 2D

RELACIÓN 1/2

