

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 678**

51 Int. Cl.:

G01N 33/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012** **PCT/US2012/068068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013** **WO13086070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012** **E 12855131 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2788772**

54 Título: **Procedimiento de determinación de la masa muscular esquelética corporal total**

30 Prioridad:

07.12.2011 US 201161567952 P
30.09.2012 US 201261708013 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2018

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE LLC (50.0%)
251 Little Falls Drive
Wilmington, DE 19808, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)

72 Inventor/es:

HELLERSTEIN, MARC K. y
EVANS, WILLIAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 668 678 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

Procedimiento de determinación de la masa muscular esquelética corporal total

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para determinar el tamaño de reserva corporal total de creatina y masa muscular esquelética corporal total en un sujeto mediante el uso de una dosis de seguimiento administrada por vía oral de D3-creatina y abarca procedimientos mejorados para la determinación de la concentración de creatina en una muestra de orina.

Antecedentes de la invención

10 El músculo esquelético juega un papel central en las adaptaciones metabólicas para aumentar y disminuir la actividad física, en enfermedades (por ejemplo, caquexia), en obesidad y en envejecimiento (por ejemplo, sarcopenia). La sarcopenia se describe como la pérdida asociada a la edad del músculo esquelético (Evans (1995) J. Gerontol. 50A:5-8) y se ha asociado con problemas de movilidad (Janssen y Ross, (2005) J. Nutr. Health Aging 9:408-19) y costes sanitarios considerablemente aumentados para las personas mayores (Janssen y col. (2004) J. Am. Geriatr. Soc. 52: 80-5). La pérdida de músculo esquelético con edad avanzada está asociada con necesidades energéticas disminuidas y aumento simultáneo en grasa, debilidad y discapacidad corporal, resistencia a la insulina y riesgo de diabetes. La pérdida de músculo esquelético asociado con una enfermedad subyacente (caquexia) está asociada con una mortalidad considerablemente aumentada (Evans (2008) Clin. Nutr. 27: 793-9).

20 Debido al papel fundamental que el músculo esquelético corporal tiene en la edad y enfermedades, existe un esfuerzo en el ámbito farmacéutico en identificar agentes terapéuticos que estimularán la síntesis de proteína del músculo y aumentará la masa muscular. Sin embargo, las metodologías actuales para la cuantificación de las síntesis muscular y masa muscular a menudo implican procedimientos invasivos (por ejemplo, biopsias musculares) o dependen de un equipamiento costoso (es decir, DEXA, MRI o CT) que proporciona solo datos indirectos sobre la masa muscular corporal completa. Debido a estas limitaciones, no se usa ningún procedimiento rutinario en la clínica para la estimación de la masa muscular esquelética y no se han producido ningunos criterios de diagnósticos para los cálculos de masa muscular. Como resultado, no existe un modo sencillo de determinar los efectos de agentes terapéuticos potenciales sobre la masa de la síntesis de proteína muscular.

Picou y col. (Pediatr Res., 1976, 10(3): 184-8) se refiere a la medición de la masa muscular en niños que usan [15N]creatina.

30 Por consiguiente, aún permanece la necesidad en la técnica de mediciones fiables, realizadas de forma sencilla, no invasivas de la masa muscular esquelética corporal.

Breve resumen de la invención

35 La presente invención se basa en el hallazgo de que el enriquecimiento de estado estacionario de D3-creatinina en una muestra de orina después de una administración oral de una única dosis de seguimiento definida de D3-creatina puede usarse para calcular el tamaño de reserva de creatina corporal total y masa muscular esquelética en un sujeto.

40 La invención se basa adicionalmente en el hallazgo de que la concentración de creatinina en una muestra de orina puede determinarse mediante la medición de la concentración de isótopo de creatinina M+2 y dividiendo esta concentración mediante un factor de dilución, en el que el factor de dilución es la relación de la concentración de creatinina M+2 con respecto a la concentración de creatinina M+0 en la muestra de orina. Determinar la concentración de creatinina en una muestra de orina según estos procedimientos mejorados permite la medición simultánea de la concentración de creatinina y D3-creatinina en una única muestra usando instrumental ampliamente disponible. Por consiguiente, este procedimiento de detección mejorado facilitará la adaptación generalización de los presentes procedimientos para su uso en la determinación de la masa muscular esquelética en pacientes.

45 Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para determinar la masa muscular esquelética corporal total en un sujeto tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12. Generalmente, la invención proporciona un procedimiento para determinar la masa muscular esquelética corporal total en un sujeto al cual se le ha administrado D3-creatina por vía oral, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- (a) dejar que transcurran al menos 12 horas después de la administración de la D3-creatina;
- (b) determinar la concentración de creatinina y D3-creatinina en una muestra de orina obtenida a partir del sujeto;
- 50 (c) usar las concentraciones de creatinina y D3-creatinina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal del sujeto.

En determinadas realizaciones, la concentración de creatinina y D3-creatinina en la muestra de orina se determina mediante HPLC/MS/MS.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Enriquecimiento de D3-creatinina urinario y tamaño de reserva de creatina corporal total en ratas en crecimiento. (A) Enriquecimiento de D3-creatinina urinario (determinado mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas) en ratas de 9 semanas de edad (peso corporal medio 304 ± 11 g, $n = 10$) y de 17 semanas de edad (peso corporal medio 553 ± 39 g, $n = 10$) en el tiempo indicado después de una única dosis oral de 0,475mg de D3-creatina, que muestra el logro del estado estacionario isotópico por 48h y una separación clara de grupos de edad de rata en crecimiento ($P < 0,001$ entre grupos todos los tiempos; dentro de los grupos, la diferencia entre 48 y 72h no resulta significativa; ensayo ANOVA de 2 factores y de Student). (B) Tamaño de reserva de creatina calculada a partir de enriquecimiento de D3-creatinina urinaria de 72h para los grupos de ratas en la Figura 1, que muestran una clara separación entre los grupos de edad ($p < 0,0001$).

Figura 2. Correlación entre Masa Corporal Magra mediante Resonancia magnética cuantitativa y tamaño de reserva de creatina corporal total, ajustada para el efecto de la edad, para los grupos de ratas en la Figura 1 ($r_{\text{todas las ratas}} = 0,69$; $P < 0,001$).

Figura 3. Incluso entre los grupos de ratas de distinta edad de la Figura 1, existe una correlación significativa del tamaño de reserva de creatina y la masa corporal magra bien mediante resonancia magnética cuantitativa (izquierda) o bien mediante DEXA (derecha).

Figura 4. La correlación significativa entre la masa corporal magra se determinó mediante resonancia magnética cuantitativa y el tamaño de reserva de creatina se determinó mediante dilución de D3-creatina en ratas de 22 semanas de edad ($n=10$ por grupo) tratadas las dos semanas anteriores con bien vehículo o dexametasona ($P < 0,001$ y $P = 0,01$, respectivamente).

Figura 5. Correlación entre la masa corporal magra determinada mediante resonancia magnética cuantitativa y el tamaño de reserva de creatina corporal total determina mediante dilución de D3-creatina para todas las 40 ratas usadas en los dos estudios transversales ($y = 0,20x + 91,6$; $r = 0,9517$; $P < 0,0001$).

Figura 6. Esta figura muestra un diagrama de flujo para una realización del procedimiento de determinación de la masa esquelética corporal total.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que el enriquecimiento de D3-creatinina en una muestra de orina después de una administración oral de una única dosis definida de D3-creatina puede usarse para calcular el tamaño de reserva de creatina corporal total y masa muscular esquelética en un sujeto. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento no invasivo y preciso para determinar el músculo esquelético corporal total. Los procedimientos de la invención encuentran uso, *entre otros*, en el diagnóstico y seguimiento de afecciones médicas asociadas con cambios en la masa muscular esquelética corporal total y en la investigación de potenciales agentes terapéuticos para determinar sus efectos sobre la masa muscular.

De acuerdo con el procedimiento, se ha administrado D3-creatina por vía oral a un sujeto. Aunque el presente no queda limitado por mecanismo, se cree que la D3-creatina se absorbe rápidamente, distribuye y transporta de forma activa al músculo esquelético, donde se diluye en la reserva muscular esquelética de creatina. El músculo esquelético contiene la amplia mayoría ($>$ del 98 %) de la creatina corporal total. En el tejido muscular, la creatina se convierte en creatinina mediante una reacción irreversible, no enzimática a una tasa estable de aproximadamente 1,7 % por día. Esta creatinina es un metabolito estable de difusión rápida desde el músculo, no es un sustrato para el transportador de creatina y no puede transportarse de nuevo al músculo y se excreta en la orina. Como resultado, una vez se alcanza un estado estacionario isotópico, el enriquecimiento de una D3-creatinina en una muestra de orina única después de una dosis de seguimiento oral definida de una D3 creatina refleja el enriquecimiento de creatina muscular y puede usarse para determinar directamente el tamaño de reserva de creatina. A continuación, la masa muscular esquelética puede calcularse basándose en el contenido de creatina muscular conocido.

Por consiguiente, en un aspecto la invención proporciona un procedimiento de determinación de la masa muscular esquelética corporal total en un sujeto al cual se le ha administrado 10 -200 mg de D3-creatina o una sal o hidrato de la misma por vía oral, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- (a) dejar que transcurran al menos 12 horas después de la administración de la D3-creatina;
- (b) determinar la concentración de creatinina y D3-creatinina en una muestra de orina obtenida a partir del sujeto;
- (c) usar las concentraciones de creatinina y D3-creatinina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal del sujeto.

En determinadas realizaciones, un hidrato de D3-creatina se ha administrado al sujeto. En realizaciones particulares, se ha administrado un monohidrato de D3-creatina.

La dosis de D3-creatina a administrar al sujeto se selecciona preferentemente de modo que la creatina marcada es rápidamente absorbida en el torrente sanguíneo y la descarga de marcador en exceso en la orina se ve minimizada.

Por consiguiente, para un sujeto humano la dosis de D3-creatina es típicamente 5-250 mg, tal como 20-125 mg. En realizaciones particulares, se han administrado 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 mg de D3-creatina. En algunas realizaciones, la dosis se ajusta basándose en el género del sujeto. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el sujeto es de sexo femenino y se han administrado 10-50, tal como 20-40 o más particularmente, 30 mg de D3-creatina al sujeto. En otras realizaciones, el sujeto es de sexo masculino y se han administrado 40-80 mg, tal como 50-70 o más particularmente, 60 mg o 70 mg de D3-creatina al sujeto.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones, cada una con líquidos acuosos o no acuosos; espumas o cremas comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite. Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente farmacológico activo se puede combinar con un vehículo oral inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como etanol, glicerol, agua y similares. Generalmente, los polvos se preparan moliendo el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclando con un vehículo farmacéutico apropiado, tal como un carbohidrato comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. Aromatizantes, conservantes, agentes dispersantes y agentes colorantes también pueden estar presentes.

Las cápsulas se pueden fabricar preparando una mezcla de polvo, líquido o suspensión y encapsulando con gelatina o algún otro material de cubierta adecuado. Los deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio o polietilén glicol pueden añadirse a la mezcla antes de la encapsulación. Un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio o carbonato de sodio puede también añadirse para incrementar la disponibilidad del medicamento cuando la cápsula es ingerida. Además, cuando se desee o sea necesario, se pueden añadir a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes. Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes útiles en estas formas de dosificación incluyen, por ejemplo, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro de sodio, y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares.

Los comprimidos pueden formularse, por ejemplo, preparando una mezcla en polvo, granulando o comprimiendo, añadiendo un lubricante y disgregante y prensando hasta dar comprimidos. Una mezcla en polvo puede prepararse mezclando el compuesto, molido adecuadamente, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente. Ingredientes opcionales incluyen aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatinas o polivinilpirrolidonas, soluciones retardantes tales como parafina, aceleradores de la resorción tales como una sal cuaternaria y/o agentes de absorción tales como bentonita, caolín o fosfato dicálcico. La mezcla en polvo se puede granular en húmedo con un aglutinante tal como jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzando a través de un tamiz. Como alternativa a la granulación, la mezcla en polvo se puede pasar a través de una máquina formadora de comprimidos y el resultado son lingotes formados de manera imperfecta rotos en gránulos. Los gránulos se pueden lubricar para prevenir que se peguen a los moldes formadores de comprimidos por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación, la mezcla lubricada se comprime hasta dar comprimidos. Los compuestos de la presente descripción también pueden combinarse con un vehículo inerte fluido y darles forma de comprimidos directamente sin pasar por las etapas de granulado o formación de pellas. Puede proporcionar un revestimiento protector claro u opaco de un revestimiento de sellado de goma laca, un revestimiento de azúcar o material polimérico y un revestimiento de brillo de cera. Se pueden añadir colorantes a estos revestimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Los fluidos orales tales como una solución, jarabes y elixires se pueden preparar en forma de dosificación unitaria de modo que una cantidad dada contenga una cantidad predeterminada del compuesto. Los jarabes se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo el compuesto en una solución acuosa adecuadamente aromatizada, mientras que los elixires se prepararan mediante el uso de un vehículo alcohólico no tóxico. Las suspensiones se pueden formular generalmente dispersando el compuesto en un vehículo no tóxico. Pueden añadirse solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes de isoestearilo etoxilado y éteres de sorbitol de polioxietileno. Los solubilizantes que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen Cremophor EL, vitamina E, PEG y Solutol. Se pueden añadir también conservantes y/o aditivos de sabor tales como aceite de menta o edulcorantes naturales, sacarina u otros edulcorantes artificiales; y similares.

De acuerdo con el procedimiento, la muestra de orina se ha recogido preferentemente después de que los niveles de D3-creatinina en la orina hayan alcanzado un estado estacionario. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, se han dejado transcurrir al menos 24 horas. En realizaciones particulares, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas o al menos 72 horas se dejan transcurrir después de la administración de D3-creatina y antes de la recogida de la muestra de orina.

La invención también abarca determinados procedimientos analíticos mejorados para la detección de creatinina y D3-creatinina en muestras de orina. Específicamente, la invención proporciona la detección de creatinina y D3-creatinina en muestras de orina mediante HPLC/MS, particularmente, HPLC/MS/MS. Sin embargo, también pueden usarse procedimientos alternativos conocidos en la técnica para detectar creatinina y/o D3-creatinina en muestras de

orina. Tales procedimientos incluyen mediciones colorimétricas directas o indirectas, el procedimiento de Jaffe, el análisis de degradación enzimática o la derivatización de la creatinina seguida por análisis de GC/MS de HPLC con detección de fluorescencia.

De este modo, se desvela un procedimiento para la determinación de la concentración de creatinina en una muestra biológica a partir de un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) obtener una muestra biológica del sujeto;
- (b) analizar la muestra biológica para determinar el área pico de la creatinina del pico de isótopo de creatinina M+2 para la muestra biológica;
- (c) comparar al área pico determinada en la etapa (b) con respecto a una curva de calibrado generada usando D3-creatinina para determinar la concentración del isótopo de creatinina M+2 en la muestra biológica;
- (d) dividir la concentración obtenida en la etapa (c) mediante un factor de dilución, en el que el factor de dilución es la relación de la concentración de creatinina M+2 con respecto a la concentración de creatinina M+0 en la muestra de biológica.

La muestra biológica es una muestra de orina.

- Preferentemente, el área pico del isótopo de creatinina M+2 se determina usando cromatografía líquida/espectroscopia de masas (LC/MS/MS).

El factor de dilución puede ser $0,0002142 \pm 0,0000214$. Más particularmente, el factor de dilución puede ser $0,002142 \pm 0,00001$, tal como $0,0002142 \pm 0,000005$.

- Los procedimientos de la invención son útiles para el diagnósticos y seguimiento de afecciones médicas asociadas con cambios en la masa muscular esquelética corporal total. Ejemplos de afecciones médicas en las cuales la pérdida de masa muscular juega un papel importante en la función, estado de rendimiento o supervivencia incluyen, aunque sin quedar limitadas a fragilidad y sarcopenia en las personas mayores; caquexia (por ejemplo, asociada con el cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia cardíaca, infección por VIH, tuberculosis, enfermedad renal terminal (ERT); desgaste muscular asociado con terapia de VIH, trastornos que implican problemas de movilidad (por ejemplo, artritis, enfermedad pulmonar crónica); enfermedades neuromusculares (por ejemplo, ictus, esclerosis lateral amiotrófica); rehabilitación después de un trauma, cirugía (incluyendo cirugía de reemplazo de cadera), enfermedades médicas u otras afecciones que requieren reposo en cama; recuperación de enfermedades catabólicas tales como afecciones infecciosas o neoplásicas; trastornos metabólicos u hormonales (por ejemplo, diabetes mellitus, estados hipogonadales, enfermedad de tiroides); respuesta a medicaciones (por ejemplo, glucocorticoides, hormona de tiroides); desnutrición o pérdida de peso voluntaria. Los procedimientos reivindicados también son útiles en evaluaciones relacionadas con el deporte sobre la masa muscular esquelética corporal total.

- Los procedimientos de la invención también son útiles para analizar compuestos de ensayo para identificar compuestos terapéuticos que aumenten la masa muscular esquelética corporal total. La masa esquelética corporal total de un sujeto puede medirse según el procedimiento antes y después de que un compuesto de ensayo se haya administrado al sujeto. La evaluación de la masa muscular esquelética corporal total puede repetirse a intervalos adecuados para controlar el efecto del compuesto de ensayo sobre la masa muscular esquelética corporal total.

Sección experimental

- Uso del procedimiento de dilución del indicador de D3-creatina para determinar la masa muscular esquelética corporal total en un modelo pre-clínico***

Se determinó una dosis de 0,475 mg de D3-creatina por rata para absorberse de forma rápida y completa y alcanzar la circulación sistémica con derrame urinario mínimo, de modo que >99 % del indicador de D3-creatina debe estar disponible para equilibrarse con la reserva de creatina corporal.

- El procedimiento de dilución de creatina se usó a continuación para determinar el enriquecimiento de D3-creatina urinario y el tiempo de estado estacionario isotópico en ratas en crecimiento. En un estudio transversal, se proporcionó una única dosis oral de 0,475 mg de D3-creatina por rata a dos grupos de ratas, 9 y 17 semanas de edad y la orina se recogió en los puntos de tiempo de 24, 48 y 72 horas después de la dosificación. Como era de esperar, las ratas más grandes y con más edad tuvieron un enriquecimiento de D3-creatina urinaria inferior (expresado como porcentaje en exceso molar, PEM) en todos los puntos de tiempo que las ratas más jóvenes y pequeñas, reflejando una mayor dilución de indicador de D3-creatina en la reserva de creatina corporal total. Para ambos grupos de edad, el enriquecimiento urinario fue mayor a las 24h y estable entre las 48 y 72h, indicando que el estado estacionario isotópico se alcanzó entre las 24 y 48h después de la dosis de D3-creatina de seguimiento. (Figura 1A).

- A continuación se calculó el tamaño de reserva de creatina corporal total usando una fórmula para la determinación de tamaño de reserva sobre el enriquecimiento de un indicador, asumiendo una única reserva de creatina (Wolfe and Chinkes (2005) Calculation of substrate kinetics: Single-pool model. 2ª ed. Isotope tracers in metabolic research.

Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 21-9): la dosis de D3-creatina (0,475 mg) se dividió por el enriquecimiento de D3-creatinina (PEM/100). La Figura 1B muestra los tamaños de reserva de creatina corporal total calculados a partir del enriquecimiento urinario de 72h después de la dosis de indicador para los grupos de ratas de 9 y 17 semanas de edad e indica que el tamaño de reserva de creatina para las ratas más grandes y viejas es significativamente más grande para las ratas más pequeñas y jóvenes.

El día antes de proporcionar la dosis de seguimiento de D3-creatina, se evaluó la masa corporal magra (MCM) bien mediante resonancia magnética cuantitativa (RMC) o DEXA. La Figura 2 muestra que después de tener en cuenta el efecto de edad, la MCM mediante RMC y el tamaño de reserva de creatina están significativamente correlacionados. La MCM mediante RMC y el tamaño de reserva de creatina también están significativamente correlacionados en cada grupo de edad, y la MCM mediante DEXA y el tamaño de reserva de creatina está significativamente correlacionadas dentro del grupo de edad de 17 semanas (Figura 3).

En un segundo estudio transversal, un grupo de edad de ratas más viejas (aún dentro de la fase de crecimiento de rata de 22 semanas de edad) se trató una vez al día por vía subcutánea con bien un vehículo salino o bien dexametasona para inducir la atrofia muscular esquelética durante 2 semanas antes de la administración de D3-creatina. Como en el primer estudio transversal con ratas de 9 y 17 semanas de edad, el estado estacionario isotópico se alcanzó entre las 48 y 72h.

En comparación con los controles tratados con vehículo, la dexametasona indujo una reducción significativa en MCM (353 ± 32 frente a 459 ± 45 g, $P < 0,001$) y una reducción significativa en el tamaño de reserva corporal total (1216 ± 227 frente a 1853 ± 228 mg, $P < 0,001$). Como en el primer estudio, la MCM y el tamaño de reserva de creatina estuvieron significativamente correlacionados en los dos grupos de tratamientos individuales (Figura 4).

La Figura 5 muestra la correlación entre la MCM y el tamaño de reserva de creatina para todas las 40 ratas usadas en los dos estudios transversales ($r = 0.95$; $P < 0,001$).

Uso del procedimiento de dilución del indicador de D3-creatina para determinar la masa muscular esquelética corporal total en sujetos humanos

Se les administra vía oral a sujetos humanos una única dosis de 30, 60, o 100 mg de monohidrato de D3-creatina. A continuación se recogen muestras de orina 1, 2, 3, 4, 5 o 6 días después de la administración de la dosis de monohidrato de D3-creatina.

Los análisis farmacocinéticos de orina para cada intervalo de recogida pueden incluir la cuantificación de PEM mediante IRMS, la relación de creatina marcada con deuterio + creatinina marcada con deuterio con respecto a la creatina total + creatinina total mediante LCMS, creatinina total, tamaño de reserva de creatina y % de dosis de creatina marcada con deuterio excretada en la orina.

El enriquecimiento de estado estacionario (PEM) puede evaluarse tanto visualmente como a partir de la estimación de la pendiente de la regresión lineal de enriquecimiento (PEM) frente al tiempo (punto medio de cada intervalo de recogida de orina). Puede encajarse un modelo ANOVA de efecto mezclado con el tiempo (variable continua) como un efecto fijado y el sujeto como un efecto aleatorio. El coeficiente para la pendiente del efecto del tiempo puede usarse para evaluar el estado estacionario. Puede calcularse el 90 % de intervalos de coincidencia para la pendiente.

El tamaño de reserva de creatina puede someterse a estimación una vez se haya alcanzado el enriquecimiento de estado estacionario para cada intervalo de recogida durante el estado estacionario según la fórmula:

$$[\text{Cantidad de Cr D3 dosificada (g)} - \text{Cantidad total de Cr D3 urinaria (0-t) (g)}] / \text{relación de enriquecimiento(t)}$$

en la que t es el intervalo de recogida de orina durante el estado estacionario.

La masa muscular puede estimarse a partir del tamaño de reserva de creatina asumiendo que la concentración de creatina es de 4,3g/kg de la masa muscular húmeda completa (MHC) (Kreisberg (1970) J Appl Physiol 28:264-7).

$$\text{Masa muscular} = \text{tamaño de reserva de creatina} / \text{concentración de Cr en músculo}$$

El tamaño de reserva de creatina también puede estimarse mediante la creatinina urinaria total (moles/día) dividida por K (1/día).

La constante de tasa de excreción (K) puede estimarse usando un procedimiento de tasa de excreción estimando la pendiente decreciente de la línea para el logaritmo de la cantidad de D3-creatina en el intervalo de recogida de orina frente al tiempo (punto medio del intervalo de recogida de orina) para cada intervalo de recogida a lo largo del tiempo. Esta estimación de K puede usarse en el cálculo del tamaño de reserva de creatina a partir de una excreción de creatinina urinaria de 24h en lugar de usar una estimación de la forma de volumen de las referencias.

Procedimientos analíticos para cuantificar D3-creatina y D3-creatinina en muestras de orina de sujetos clínicos

Los estándares de referencia de monohidrato de D3-creatina y D3-creatinina se adquirieron a partir de C/D/N Isotopes, Montreal Canadá.

Análisis HPLC-MS/MS

5 La separación de D3-creatina se llevó a cabo usando un UPLC Acquity (Waters Corp., Milford, Ma.) equipado con una columna analítica de sílice Zorbax Hilic Plus (50 x 2,1 mm, Rápida Resolución HD 1,8µ, Agilent Corp., Santa Clara CA.). El volumen de inyección es típicamente de 8 µl.

10 La fase móvil A (FM A) consistía en 10 mM de formiato de amonio en agua y la fase móvil B es acetonitrilo. La cromatografía de gradiente se empleó con una composición de fase móvil inicial del 2 % de 10 mM de formiato de amonio con un caudal de 0,7 ml/min. Esto se mantuvo durante 0,5 minutos y a continuación un gradiente lineal con respecto a un 50 % de FMA se consiguió a los 2,3 minutos. Esto se vio aumentado inmediatamente al 80 % y se mantuvo durante 0,4 minutos y a continuación volvió a las condiciones de inicio a los 2,9 minutos. El tiempo total de ejecución fue de 3,5 minutos. Este gradiente permitió la separación del momento basal de la D3-creatina de los compuestos de interferencia.

15 La detección de D3-creatina se llevó a cabo usando un Sciex API5000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). El sistema HPLC se conectó al API5000 a través de una fuente de pulverización de iones turbo que funcionaba en un modo de ionización positivo usando los siguientes parámetros: temperatura de ionización de 650 °C, voltaje de pulverización de iones de 2500 V, configuración de cortina de gas de 45 (N₂), configuración de nebulizador de gas fue de 65 (N₂), configuración de gas de secado fue de 70 (N₂), configuración de colisión de gas de 3 (N₂). Todos los otros parámetros de espectrómetro de masas se optimizaron para las transiciones individuales. Se adquirieron las siguientes transiciones de iones (MRM): D3-creatina es m/z = 135 con respecto a m/z = 47 con un tiempo de retención típico de 1,99 min. El estándar de creatina se controla con una transición de iones de m/z = 139 con respecto a m/z = 50 con un tiempo de retención típico de 1,99 min.

25 La separación de los analitos de creatinina y D3-creatinina se llevaron a cabo usando un UPLC Acquity (Waters Corp., Milford, Ma.) equipado con una columna analítica de sílice Zorbax Hilic Plus, con dimensiones de 50 x 2,1 mm (Rápida Resolución HD 1,8µ, Agilent Corp., Santa Clara CA.). El volumen de inyección fue típicamente de 5 µl.

30 La fase móvil A consistía en 5 mM de formiato de amonio en agua y la fase móvil B fue acetonitrilo. La cromatografía de gradiente se empleó con una composición de fase móvil inicial del 2 % de 5 mM de formiato de amonio con un caudal de 0,7 ml/min. Esto se mantuvo durante 0,4 minutos y a continuación un gradiente lineal con respecto a un 40% de FMA se consiguió a los 2,1 minutos. Esto se vio aumentado inmediatamente al 50% a los 2,2 minutos y se mantuvo durante 0,4 minutos y a continuación volvió a las condiciones de inicio a los 2,7 minutos. El tiempo total de ejecución fue de 3,5 minutos. Este gradiente permitió la separación del momento basal de la d3-creatina y creatinina de los compuestos de interferencia.

35 La detección de los analitos de creatinina y D3-creatina se llevó a cabo usando un Sciex API5000 (Applied Biosystems, Foster City, Ca.). El sistema HPLC se conectó al API5000 a través de una fuente de pulverización de iones turbo que funcionaba en un modo de ionización positivo usando los siguientes parámetros: temperatura de ionización de 350°C, voltaje de pulverización de iones de 5500 V, configuración de cortina de gas de 45 (N₂), configuración de nebulizador de gas fue de 60 (N₂), configuración de gas de secado fue de 65 (N₂), configuración de colisión de gas de 3 (N₂). Todos los otros parámetros de espectrómetro de masas se optimizaron para las transiciones individuales. Se adquirieron las siguientes transiciones de iones (MRM): D3-creatinina es m/z = 117 con respecto a m/z = 47 y para creatinina (isótopo M+2) fue m/z = 116 con respecto a m/z = 44 con un tiempo de retención típico de 1,5 min. El estándar de creatina se controla con una transición de iones de m/z = 121 con respecto a m/z = 51 con un tiempo de retención típico de 1,5 min. Para la creatinina, la versión de isótopo M+2 se adquirió para evitar la dilución de la muestra con tampón.

45 Los valores de concentración de creatinina endógena se determinan en muestras clínicas de orina humana usando una curva estándar de calibración de D3-creatinina. El isótopo de D3-creatinina se comporta de forma similar a la creatinina por toda la extracción y los procedimientos de HPLC-MS/MS permitiendo, de este modo, limpiar la matriz de orina para preparar los estándares y las muestras de CC.

50 La cantidad de creatinina endógena (m/z=114) en las muestras clínicas humanas es mucho superior (~1000 veces) que los niveles de D3-creatinina. Por lo tanto, en lugar de diluir la muestra, el isótopo M+2 de creatinina (m/z=116) se supervisará, permitiendo, de este modo, la medición simultánea de creatinina y D3-creatinina a partir de un análisis de muestra. Se supervisa el MRM de creatinina endógena (M+2) (116/44). Un factor de corrección que representa la relación de MRM de 116/44 a 114/44, se usa para corregir las concentraciones calculadas que se han determinado a partir de la curva de calibración de d3-creatinina. La relación de isótopos MRM (M+2) / MRM (M+0) o factor de corrección es de 0,00286. Por lo tanto, la cantidad de D3-creatinina, que aparecería a partir de la dosis de D3 creatina y la creatinina endógena, puede cuantificarse a partir de la curva de calibración de D3-creatinina única.

Ejemplo

Química y reactivos: Acetonitrilo y agua (todo el grado HPLC o mejor) adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo.).

Formiato de amonio adquirido de Sigma Aldrich (St. Louis, Mo.). Estándares de referencia de d3-Creatina (monohidrato) y d3-creatinina se adquirieron de CDN Isotopes, Montreal Canadá.

Las soluciones madre de d3-creatina y d3-creatinina se prepararon a 1,0 mg/ml en agua y se lleva a cabo la confirmación de su equivalencia. Las soluciones de dilución que varían de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml y de 0,2 µg/ml a 200 µg/ml se preparan en agua y se usan para preparar estándares de calibración y muestras de control de calidad (CC) en orina humana para la d3-creatina y d3-creatinina, respectivamente. Los estándares internos marcados isotópicamente para la creatina (SIL) ($^{13}\text{C}_3^2\text{H}_3^{15}\text{N}_1$ -creatina) y creatinina (SIL) ($^{13}\text{C}_3^2\text{H}_4^{15}\text{N}_1$ -creatinina) se preparan a 1,0 mg/ml en agua. Las soluciones de dilución de estas se preparan a 500 ng/ml en acetonitrilo y se usan como un disolvente de extracción para los estándares de orina, controles de calidad y muestras de estudio.

Preparación de muestra: (d3-creatina, creatinina y d3-creatinina en orina) Se añade un alícuota de 200 µl de la solución funcional estándar interna (500 ng/ml) en acetonitrilo a cada pocillo, excepto muestras en blanco dobles, se añade acetonitrilo. Un alícuota de 40 µl de muestra, estándar o CC se transfiere a los pocillos adecuados en la placa que contiene el SIL. La placa se sella y el agitador vorticial se mezcla durante aproximadamente 3 minutos. La placa se centrifuga a aproximadamente 3000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se transfiere a una placa de 96 pocillos limpia y a continuación se inyecta sobre el sistema de HPLC-MS/MS para su análisis. La D3-creatina y d3-creatinina se analizan a partir de muestras de orina humana separadas.

Análisis HPLC-MS/MS

La separación de d3-creatina, d3-creatinina y creatinina se lleva a cabo usando un UPLC Acquity (Waters Corp., Milford, Ma.) equipado con una columna analítica de sílice Agilent Zorbax Hilic Plus, con dimensiones de 50 x 2,1 mm (Rápida Resolución HD 1,8µ, Agilent Corp., Santa Clara CA.). El volumen de inyección es típicamente de 2 µl.

D3-creatina: la fase móvil A consiste en 10mM de formiato de amonio y la fase móvil B es acetonitrilo. La cromatografía de gradiente se emplea con una composición de fase móvil inicial al 2 % de 10 mM de formiato de amonio con un caudal de 7 ml/min. Esto se mantiene durante 0,5 minutos y a continuación un gradiente lineal con respecto a un 50 % de FMA se consigue a los 2,3 minutos. Esto se ve aumentado al 80% a los 0,2 minutos y se mantuvo durante 0,4 minutos y a continuación volvió a las condiciones de inicio a los 3,0 minutos. El tiempo total de ejecución es de 3,5 minutos.

La detección de d3-creatina se lleva a cabo usando un Sciex API5000 (Applied Biosystems, Foster City, Ca.). El sistema HPLC se conecta al API5000 a través de una fuente de pulverización de iones turbo que funcionaba en un modo de ionización positivo usando los siguientes parámetros: temperatura de ionización de 650 °C, voltaje de pulverización de iones de 2500 V, configuración de cortina de gas de 45 (N₂), configuración de nebulizador de gas es de 65 (N₂), configuración de gas de secado es de 70 (N₂), configuración de colisión de gas de 3 (N₂). Todos los otros parámetros de espectrómetro de masas se optimizan para las transiciones individuales. Se adquieren las siguientes transiciones de iones (MRM): d3-creatina es m/z = 135 con respecto a m/z = 47 con un tiempo de retención típico de 2 min. El SIL se controla con una transición de iones de m/z = 139 con respecto a m/z = 50 con un tiempo de retención típico de 2 min.

D3-creatinina: la fase móvil A consistía en 5 mM de formiato de amonio en agua y la fase móvil B es acetonitrilo. La cromatografía de gradiente se emplea con una composición de fase móvil inicial al 2 % de 5 mM de formiato de amonio con un caudal de 0,7 ml/min. Esto se mantiene durante 0,4 minutos y a continuación un gradiente lineal con respecto a un 60% de acetonitrilo se consigue a los 2,1 minutos. Esto se ve aumentado inmediatamente al 50% de acetonitrilo y se mantiene durante 0,4 minutos y a continuación volvió a las condiciones de inicio a los 2,7 minutos. El tiempo total de ejecución es de 3,5 minutos.

La detección de los analitos de creatinina y d3-creatina se lleva a cabo usando un Sciex API5000 (Applied Biosystems, Foster City, Ca.). El sistema HPLC se conectó al API5000 a través de una fuente de pulverización de iones turbo que funcionaba en un modo de ionización positivo usando los siguientes parámetros: temperatura de ionización de 350°C, voltaje de pulverización de iones de 5500 V, configuración de cortina de gas de 45 (N₂), configuración de nebulizador de gas fue de 60 (N₂), configuración de gas de secado fue de 65 (N₂), configuración de colisión de gas de 3 (N₂). Todos los otros parámetros de espectrómetro de masas se optimizan para las transiciones individuales. Se adquieren las siguientes transiciones de iones (MRM): d3-creatinina es m/z = 117 con respecto a m/z = 47 y para creatinina (isótopo M+2) es m/z = 116 con respecto a m/z = 44 con un tiempo de retención típico de 1,5 min. El SIL se controla con una transición de iones de m/z = 121 con respecto a m/z = 51 con un tiempo de retención típico de 1,5 min. Para la creatinina, el MRM de isótopo M+2 se adquiere para evitar diluir la muestra con una matriz sustituta (una orina de control libre de creatinina no está disponible). Estos isótopos se comportarán de forma similar por toda la extracción y los procedimientos de HPLC-MS/MS, permitiendo, de este modo, limpiar la matriz de orina para preparar los estándares y las muestras de CC así como permitir la cuantificación de creatinina endógena usando una curva de calibración que se generó a partir de la forma deuterada de la creatinina. Por lo tanto, la cantidad de d3-creatinina y la creatinina endógena, puede cuantificarse a partir de la curva de calibración de d3-creatinina única.

Los datos de HPLC-MS/MS se adquirieron y procesaron (integraron) usando un software Analyst™ (Versión 1.4.2,

MDS Sciex, Canadá). Se construyó una representación de la calibración de la relación del área frente a la concentración de d3-creatinina y se aplicó una regresión lineal $1/x^2$ ponderada a los datos.

Resultados

5 Para realizar la cuantificación bioanalítica de biomarcadores usando LC/MS/MS, debe usarse una matriz sustituta o un analito sustituto. En este ensayo, puede usarse orina humana puesto que la d3-creatinina no se encuentra de forma endógena y la cuantificación de creatinina puede determinarse a partir de la curva de calibración de d3-creatinina. Se muestra la equivalencia de d3-creatinina y creatinina.

Determinación de equivalencia de D3-creatinina y creatinina

10 Se realizó una cantidad de experimentos para verificar que la d3 creatinina puede usarse como un analito sustituto para cuantificar creatina y que la transición de MRM de 116/44 (M+2) puede usarse con el factor de corrección de relación de isótopo.

15 Para confirmar que puede usarse d3 creatinina como analito sustituto para la creatinina; se prepararon dos niveles de concentración de soluciones estándar puras de creatinina y d3 creatinina para mostrar la respuesta de LC-MS/MS equivalente. Las áreas pico de 200 ng/ml y 40 ng/ml de tanto soluciones de creatinina como d3 creatinina se compararon usando las transiciones de MRM de 114/44 y 117/47, respectivamente. Los resultados mostraron que las dos soluciones proporcionaron respuestas equivalentes con una diferencia de porcentaje media y un porcentaje de CV inferior al 7,5. Véase la Tabla 1.

Tabla 1 Equivalencia de D3 creatinina y creatinina usando LC/MS/MS				
Estad. (ng/ml)	d3-Creatinina (MRM de 117/44)	Creatinina (MRM de 114/44)	CRN frente a d3 CRN % de diferencia	Porcentaje de respuesta de D3
40	791648	717010	10,4	90,6
40	804513	780182	3,1	97,0
40	774228	717528	7,9	92,7
40	776144	823064	-5,7	106,0
40	766927	828642	-7,4	108,0
40	741290	758937	-2,3	102,4
		Media	1,0	99,4
		% de CV		7,2
200	3296195	3336107	-1,2	101,2
200	3469440	3325274	4,3	95,8
200	3416181	3428709	-0,4	100,4
200	3363696	3185389	5,6	94,7
200	3335259	3390463	-1,6	101,7
200	3255799	3321365	-2,0	102,0
		Media	0,8	99,3
		% de CV		3,2

20 Estos resultados muestran que la d3 creatinina y la creatinina proporcionan respuestas LC/MS/MS equivalentes y la d3-creatinina puede usarse como un analito sustituto para la creatinina. Esto no resulta sorprendente ya que los compuestos deuterados se usan habitualmente como estándares internos de marcador estables, en entornos regulados para validar ensayos. Estos estándares deuterados han demostrado corregir la respuesta LC/MS/MS de analito de los efectos de la matriz así como otros efectos relacionados con la extracción y cromatográficos. Puesto que la única diferencia es un protón extra en los tres átomos de hidrógeno sobre el grupo metilo, esperaríamos que los dos compuestos se comportaran casi idénticamente a lo largo de la extracción, separación cromatográfica y detección espectral de masas.

Determinación de Relación de isótopos

30 Este procedimiento se usa para determinar la cantidad de d3 creatinina en orina humana que convertido a partir de una dosis de d3 creatina. Adicionalmente, la cantidad de creatinina endógena se determinará usando la curva estándar de d3 creatinina. La cantidad de creatinina endógenas es mucho superior (~1000 veces) que los niveles de d3-creatinina en las muestras de orina clínicas humanas, de este modo, en lugar de diluir la muestra, el isótopo M+2 de creatinina se supervisará. Esto permitirá la medición simultánea de creatinina y d3-creatinina a partir de una muestra usando una curva de calibración de matriz de orina. El área pico del MRM de creatinina endógena (M+2) (116/44) se supervisa junto con el MRM de la d3 creatinina de 117/47. Un factor de corrección que representa la relación de MRM de 116/44 a 114/44, se usa para corregir las concentraciones calculadas que se han determinado a partir de la curva de calibración de d3-creatinina.

40 La relación de isótopos (relación de respuesta) o diferencia en la respuesta de área pico a partir de la forma abundante naturalmente de creatinina (M+0) o m/z = 114 a la mucho menos abundante forma de creatinina (M+2) p m/z = 116 se calcula de forma experimental. La relación de isótopos se determina usando dos procedimientos experimentales distintos. El diseño experimental original usa una concentración estándar, una solución de creatinina

de 200 ng/ml (Tabla 2a). El área pico de la creatinina se supervisa en tanto las transiciones de MRM de M+0 como de M+2 (114/44 y 116/44), respectivamente. Se usó una solución para reducir la variación que puede producirse a partir de inyecciones separadas y la preparación de soluciones separadas. Se escoge esta concentración porque permite que el área pico de ambos MRM se encuentre en el intervalo del detector y con una señal adecuada con respecto al ruido para el pico más pequeño. Sin embargo, se observa alguna variabilidad en las mediciones del día a día ($\pm 10\%$) como se muestra en la Tabla 3. Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento adicional para generar esta relación de respuesta.

En el segundo enfoque, la relación de respuesta se determina experimentalmente usando dos soluciones separadas. Se prepara una solución separada para cada transición de MRM que proporciona áreas pico que están más cerca en magnitud entre sí. Se usa una solución de creatina de 10 ng/ml para adquirir la transición de MRM de 114/44 y se usa una solución de 500 ng/ml para adquirir la transición de MRM de 116/44. Estas soluciones se inyectan sobre el sistema LC/MS/MS en réplicas de 10 y se determina la relación de área pico (RAP). La relación de respuesta se calcula a continuación mediante la división de la RAP media de 116/44 por la RAP corregida de 114/44. Para comparar las RAP de los dos MRM, la RAP de las soluciones de 10 ng/ml se multiplica por 50 (puesto que 500 ng/ml es 50 veces más grande que los 10 ng/ml), se muestra un ejemplo en la Tabla 2b. Esto permite que el área pico de ambas soluciones está más cerca en valor y elimine potencialmente los errores asociados con la integración de picos con señal muy diferente con respecto a los valores de ruido.

Tabla 2 Relación de respuesta de creatinina (M+2/M+0) Determinación usando LC/MS/MS
2a. Determinado usando una única solución estándar de creatinina

ESTD. (ng/ml)	Relación de área pico		Relación de respuesta
	Creatinina (M+2) MRM de	Creatinina (M+0) MRM de 116/44	
		114/44	
200		0,0209 9,19	0,00227
200	0,0216	9,42	0,00229
200	0,0195	9,53	0,00205
200	0,0208	9,42	0,00221
200	0,0202	9,37	0,00216
200	0,0199	9,46	0,00210
200	0,0188	9,22	0,00204
200	0,0201	9,64	0,00209
200	0,0202	9,33	0,00217
200	0,0188	9,49	0,00198
200	0,0200	9,45	0,00212
200	0,0198	9,32	0,00212
Media	0,0201	9,4	0,00213
% de CV	4,05	1,35	3,10

2b. Determinado usando concentraciones de creatinina separadas

Relación de área pico				Relación de respuesta
Creatinina (M+2) MRM de	Creatinina (M+0) MRM de	Creatinina (M+0)* MRM de		
116/44	114/44	114/44		
0,0460	0,4240	21,2		0,00217
0,0467	0,4240	21,2		0,00220
0,0466	0,3990	20,0		0,00234
0,0471	0,4110	20,6		0,00229
0,0477	0,4000	20,0		0,00239
0,0459	0,3850	19,3		0,00238
	0,0453	0,3990	20,0	0,00227
	0,0452	0,4000	20,0	0,00226
	0,0443	0,3920	19,6	0,00226
	0,0442	0,3780	18,9	0,00234
Media	0,0459	0,4	20,1	0,00229
% de CV	2,53	3,75	3,75	3,15

*=corregido por la diferencia de concentración

La relación de área pico corregida sería equivalencia a un estándar de creatina de 500 ng/ml que supervisa el área pico de la transición MRM de 114/44.

La relación de isótopos (relación de respuesta) se determinó en múltiples ocasiones sobre un intervalo de tiempo de un mes y sobre dos instrumentos cuádruplos triples distintos. Se determinó el promedio de estos nueve valores y el inverso de esta relación de respuesta es el factor de dilución usado para corregir los valores de creatinina en el sistema LIMS. Véase la Tabla 3.

Tabla 3 Resumen de relación de respuesta (M+2/M+0) Determinado usando LC/MS/MS

	Fecha	Relación de respuesta	Nombre del instrumento
	22-nov-11	0,00206	RTP12
	29-nov-11	0,00213	RTP12
AM	7-dic-11	0,00193	RTP12
PM	7-dic-11	0,00193	RTP12
*	14-enero-12	0,00221	RTP12
*	16/01/2012	0,00229	RTP12
*	17-enero-12	0,00195	RTP12
*	7-feb-12	0,00229	RTP12
*	10/02/2012	0,00249	RTP52
	Media	0,002142	
	% de CV	9,09	

*= realizado usando dos concentraciones de creatinina

Esta relación de respuesta determinada experimentalmente se usa para corregir las áreas pico de creatinina M+2 (MRM de 116/44) y estas áreas pico corregidas de creatinina se compararon con las áreas pico establecidas para el mismo estándar de concentración de d3 creatinina (MRM de 117/47). La comparación del área de creatinina corregida con respecto al área pico obtenido a partir de los estándares de d3 creatinina proporcionaron respuestas equivalentes con diferencia de porcentaje y porcentaje de CV inferior al 10 %. Véase la Tabla 4.

Tabla 4 Creatinina (M+2) Respuesta corregida usando relación de respuesta

ESTD. (ng/ml)	CRN (MRM 116/44) M+2	CRN M+2* Corregido como M + 0	d3 CRN (MRM 117/47) Área pico	Diferencia de porcentaje
200	7856,2	3667693,7	3599411,5	98,1
200	7422,7	3465312,8	3682013,9	106,3
200	6101,3	2848412,7	3516609,5	123,5
200	7490,2	3496825,4	3330922,4	95,3
200	7288,0	3402427,6	3359823,2	98,7
200	6625,6	3093183,9	3264518,6	105,5
Media	7130,7	3328976,0	3458883,2	104,6
% de CV	9,0	9,0	4,8	9,8

*= área pico corregida (dividida por la relación de respuesta media de 0,002142)

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la masa muscular esquelética corporal total en un sujeto al cual se le ha administrado D3-creatina por vía oral, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- 5 (a) dejar que transcurran al menos 12 horas después de la administración de la D3-creatina;
 (b) determinar la concentración de creatinina y D3-creatina en una muestra de orina obtenida del sujeto;
 (c) usar las concentraciones de creatinina y D3-creatina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal del sujeto.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que 10-200 mg de D3-creatina o una sal de hidrato de la misma se ha administrado por vía oral al sujeto.

- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la D3-creatina es monohidrato de D3-creatina.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se dejan transcurrir al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas o al menos 72 horas después de la administración de D3-creatina.

- 15 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se ha obtenido la muestra de orina después de que los niveles de D3-creatina en la orina hayan alcanzado un estado estacionario.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la concentración de creatinina y D3-creatina se determina mediante HPLC/MS, HPLC/MS/MS, mediciones colorimétricas directas o indirectas, el procedimiento de Jaffe, análisis de degradación enzimática o la derivatización seguida por análisis de GC/MS de HPLC con detección de fluorescencia.

- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la determinación de la concentración de creatinina y D3-creatina en dicha muestra de orina comprenden la determinación del enriquecimiento del estado estacionario de D3-creatina en dicha muestra de orina.

- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el uso de las concentraciones de la creatinina y D3-creatina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal total del sujeto comprende adicionalmente la determinación del tamaño de reserva de creatina corporal total según la fórmula:

$$\frac{[\text{Cantidad de D3 - creatina dosificada (g)} - \text{Cantidad total de D3 - creatina urinaria (o - t)(g)}]}{\text{relación de enriquecimiento (r)}}$$

en la que t es el intervalo de recogida de orina durante el estado estacionario.

- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el uso de las concentraciones de la creatinina y D3-creatina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal total del sujeto comprende adicionalmente la determinación del tamaño de reserva de creatina corporal total según la fórmula:

$$\frac{\text{creatinina urinaria total (moles/día)}}{K \text{ (l/día)}}$$

10. El procedimiento de la reivindicación 8 o reivindicación 9, en el que el uso de las concentraciones de la creatinina y D3-creatina determinadas en la etapa (b) para calcular la masa muscular esquelética corporal total del sujeto comprende adicionalmente la determinación de la masa muscular esquelética corporal total según la fórmula:

35
$$\left(\frac{\text{tamaño de reserva de creatina corporal total}}{\text{concentración de creatina en músculo esquelético}} \right)$$

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la concentración de creatina en músculo esquelético es de 4,3g/kg.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el sujeto es un ser humano.

FIGURA 1

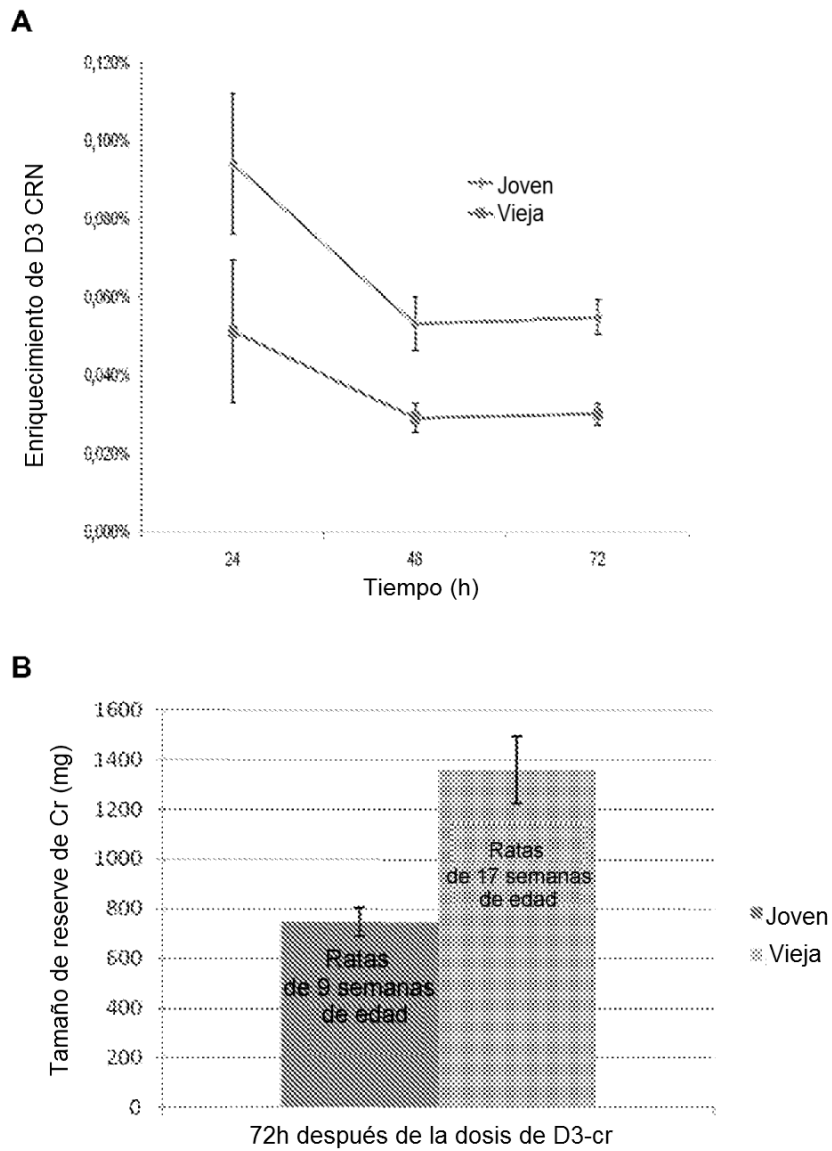


FIGURA 2

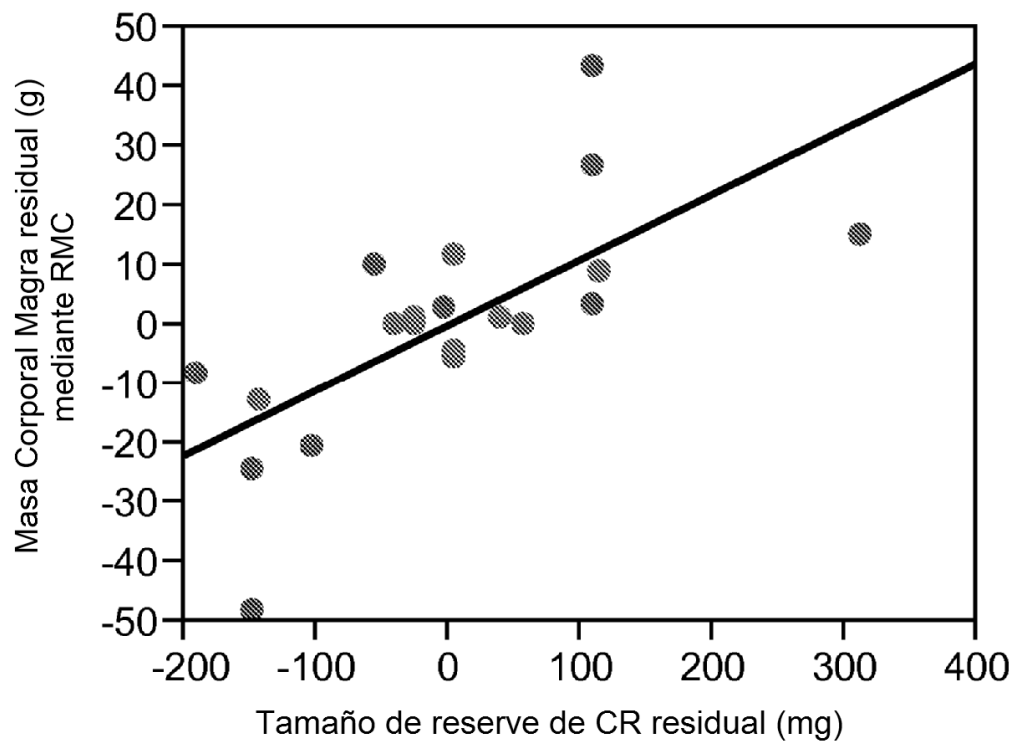


FIGURA 3

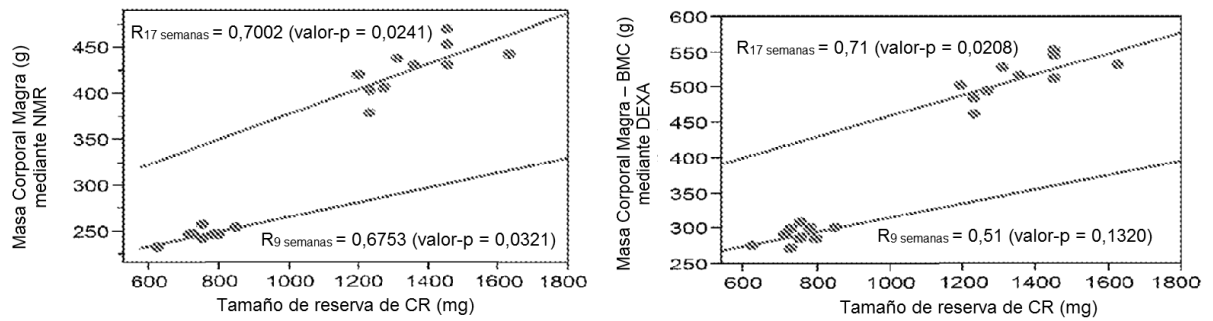


FIGURA 4

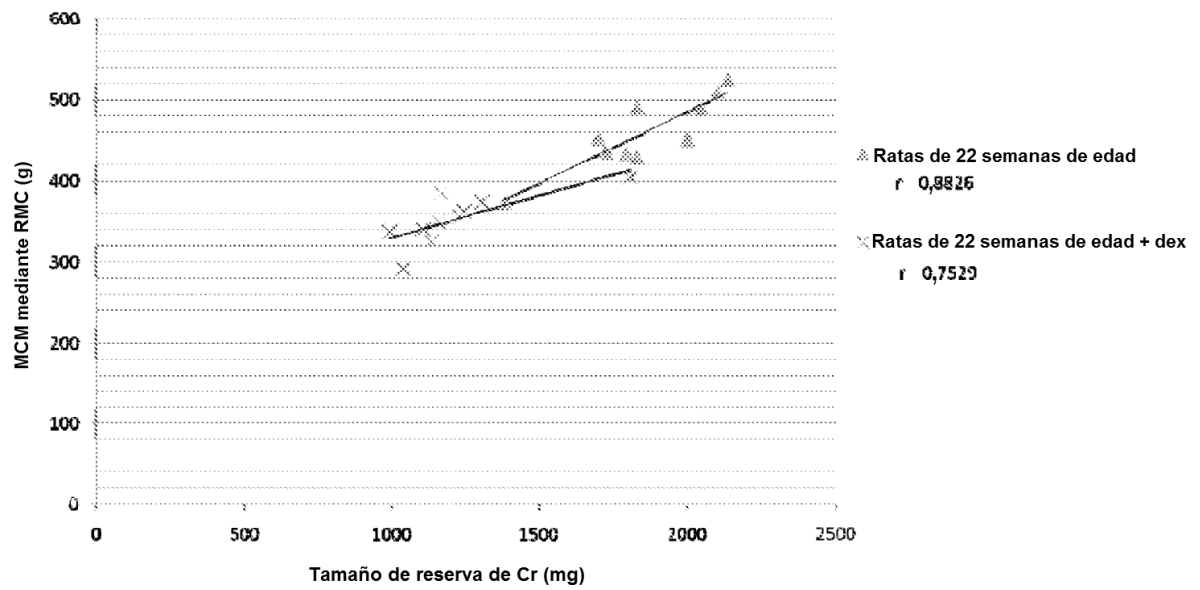


FIGURA 5

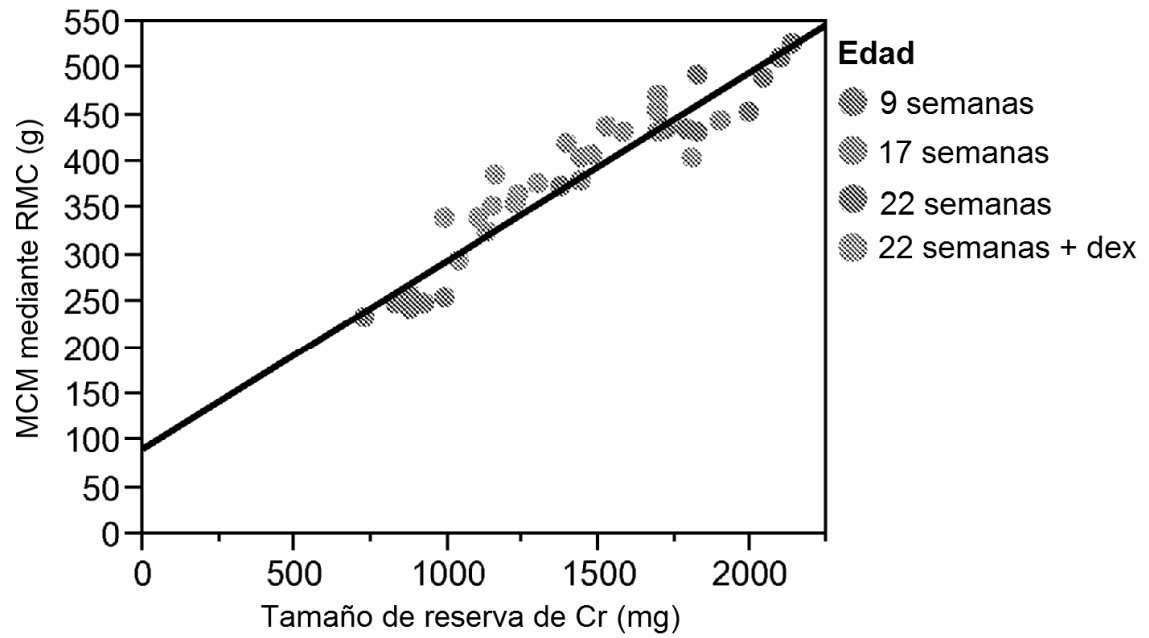


FIGURA 6

