



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0709374-8 A2**

(22) Data de Depósito: 23/03/2007  
(43) Data da Publicação: 12/07/2011  
(RPI 2114)



(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/53 2006.01

(54) Título: **TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL DE APOLIPOPROTEÍNA E MÉTODOS RELACIONADOS À MESMA**

(30) Prioridade Unionista: 23/03/2006 US 60/743,678

(73) Titular(es): Emelita de Guzman Breyer, Mary K. Robinson

(72) Inventor(es): Emelita de Guzman Breyer, Mary K. Robinson

(74) Procurador(es): Cruzeiro Newmarc Patentes e Marcas Ltda.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007007359 de 23/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/112055 de 04/10/2007

(57) Resumo: TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL DE APOLIPOPROTEÍNA E MÉTODOS RELACIONADOS À MESMA. Método para determinar a concentração e modificações de apolipoproteína em amostras biológicas incluindo plasma, soro, e frações de lipoproteína, pela obtenção de uma amostra de um paciente, adicionando um volume específico de um padrão interno à amostra, aplicação da amostra a um chip de superfície melhorada, revestido com Proteína O, ligado a anticorpo, e remoção de componentes da amostra não ligados, análise da amostra por espectrometria de massa, determinação da concentração da apolipoproteína usando valores de padrões internos, e avaliando a concentração da apolipoproteína, suas isoformas, substituições e modificações de aminoácido para uso como uma ferramenta para diagnosticar câncer, diabetes, acidente vascular cerebral, estresse, mal de Alzheimer, inflamação, doença neurológica e doenças cardiovasculares.

**"TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL DE  
APOLIPOPROTEÍNA E MÉTODOS RELACIONADOS À MESMA"**

**INFORMAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS**

Uma porção da revelação deste documento de  
5 patente pode conter material que está sujeito a proteção de  
direitos autorais. O proprietário dos direitos autorais não faz  
objeção à reprodução por fac-símile, por qualquer pessoa, do  
documento de patente ou revelação da patente conforme ela é  
apresentada no arquivo ou registros de patente da Agência de  
10 Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos da América, mas,  
por outro lado, reserva todos e quaisquer direitos autorais.

**REFERÊNCIA CRUZADA E REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE**

O presente pedido reivindica prioridade em  
relação ao Pedido do Tratado de Cooperação de Patente nº  
15 PCT/US2007/007359, publicação nº WO 2007/112005 A2, intitulado  
"Apolipoprotein Fingerprinting Technique," depositado em 23 de  
março de 2007, em nome das inventoras Emelita De Guzman Breyer e  
Mary K. Robinson, que reivindicam prioridade relacionada e em  
benefício do pedido de patente Provisório Norte-Americano  
20 intitulado "APOLIPOPROTEIN FINGERPRINTING TECHNIQUE" depositado em  
23 de março de 2006, em nome das inventoras Emelita De Guzman  
Breyer e Mary K. Robinson, tendo o número de série 60/743.678.

**HISTÓRICO**

**I. Campo da Invenção**

25 A presente invenção se refere ao campo de  
composições, análise e quantificação de apolipoproteínas em  
amostras biológicas e clínicas. Mais especificamente, esta  
invenção se refere a métodos, técnicas, e protocolos para a

obtenção de impressão digital, perfil, determinação, e/ou quantificação de apolipoproteínas presentes em amostras de matrizes biológicas humanas, tais como, por exemplo, e sem limitação, plasma, urina, soro e frações de lipoproteína.

## 5                   II. Descrição da Técnica Anterior

É bem aceito que apolipoproteínas, os componentes protéicos de lipoproteínas, são capazes de solubilizar lipídeos hidrofóbicos e facilitam o direcionamento e transporte de célula. Estes componentes, sintetizados no fígado e intestino, são  
10 essenciais para manter a integridade de partículas de lipoproteína, servindo como co-fatores para enzimas que agem em lipoproteínas, e facilitando interações mediadas por receptor que removem lipídeos da circulação.

Existem vários grupos de apolipoproteínas: A (Apo  
15 A), B (Apo B), C (Apo C) e E (Apo E). Cada um dos três grupos A, B e C consiste de duas ou mais proteínas distintas. Estas são Apo A1, Apo AII, Apo AIV, e AV para Apo A; Apo B100 e Apo B48 para Apo B; e Apo CI, Apo CII, Apo CIII, e Apo CIV para Apo C. Apo CI, CIII, CIV e Apo E, cada uma, consiste de duas ou mais isoformas.  
20 As apolipoproteínas têm várias funções na doença e na saúde.

A apolipoproteína CIII é uma proteína de 79 aminoácidos que existe nos seres humanos como três isoformas diferindo na glicosilação na Treonina-74. A isoforma CIII-0 é o produto final de reações de sialidase enzima, tem ausência de  
25 resíduos de ácido siálico, galactose e galactose amina, e responde por 14% das isoformas totais. As isoformas CIII-0 são inibidores de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) que se ligam ao receptor de lipólise estimulada, que é uma rota importante de

depuração de lipoproteínas ricas em triglicerídeo no plasma. A isoforma CIII-0 tem a menor afinidade com VLDL. A isoforma CIII-1 tem 1 mole de ácido siálico e responde por 51% das isoformas totais. A isoforma CIII-2 é a forma inicial de CIII sintetizada e secretada no fígado, tem 2 moles de ácido siálico, e responde por 35% das isoformas totais. A isoforma CIII-2 tem uma afinidade mais elevada com VLDL e é inibidor mais fraco de VLDL se ligando ao receptor de lipólise estimulado.

Métodos atuais para identificar e quantificar isoformas CIII envolvem o isolamento de frações de lipoproteínas do plasma, deslipidação desta fração, e purificação da CIII da fração solúvel em água de apolipoproteínas. Embora as diferentes isoformas purificadas possam, todas, serem detectadas por eletroforese de gel de foco isoelétrico, espectrometria de massa, e espectroscopia de fluorescência e absorbância, nenhuma individualização, diferenciação, ou quantificação relativa de uma mistura de isoformas é provida por estes resultados ou está dentro destes resultados. A separação das isoformas deve ser executada em primeiro lugar, tal como por cromatografia de troca iônica, se informação de detecção específica com relação a uma isoforma específica for desejada. Isto é, os métodos atuais são desvantajosos por que eles são tediosos no isolamento de CIII do plasma, tendo apenas uma recuperação de proteína de 60-80%, e pelos métodos atuais para diagnósticos clínicos para CIII no plasma, tais como ELISA e ensaios imunoturbidimétricos, apenas poderem detectar CIII total.

Entretanto, isoformas CIII são clinicamente significativas por várias razões. Os níveis das isoformas mudam

com o nível de controle de glicose em pacientes diabéticos.

(Sundsten, T., Ostenson, Claes-Goran, Bergsten, P., *Diabetes/Metabolism Research Reviews*, 24(2):148-54, Fev. De 2008,

*Serum Protein Patterns in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes*

5 *Mellitus—Influence of Diabetic Environment and Family History of*

*Diabetes.*) Por exemplo, HbA1C elevado está diretamente

correlacionado com níveis de CIII-0 elevados (Florez, H., Mendez,

A., Casanova-Romero, P., Larreal-Urdaneta, C., Castillo-Florez,

S., Lee, D., e Goldberg, Ronald., *Atherosclerosis*, 188(1):134-41,

10 Set., 2006, *Increased Apolipoprotein C-III Levels Associated with*

*Insulin Resistance Contribute to Dyslipidemia in Normoglycemic and*

*Diabetic subjects from a Triethnic Population*). Indivíduos

hipertrigliceridêmico possuem uma proporção aumentada de CIII como

a isoforma CIII-2 em VLDL. Os níveis de CIII-2 aumentam em

15 mulheres submetidas à restrição calórica severa apesar de níveis

de CIII total normais. A variação em CIII-2 positivamente está

correlacionada com alterações dos triglicerídeos VLDL enquanto a

variação de CIII-1 está inversamente correlacionada. Devido às

limitações nas técnicas existentes com relação à quantificação

20 precisa e detecção de isoformas CIII, o papel destas isoformas em

vários processos metabólicos, embora de grande importância na

compreensão do metabolismo de lipídeo, está ainda sujeito a

controvérsia.

A literatura ou técnica anterior relata várias

25 caracterizações e correlações entre várias apolipoproteínas e

doenças. Por exemplo, Apo D é um ligante múltiplo, transportador

multifuncional e é conhecido por acumular em um local específico

de regeneração dos nervos periféricos na mal de Alzheimer.

(Shuvaev, et al., Neurobiology of Aging, 22(3):397-402, Mai-Jun. de 2001. *Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease*; Christen, Y. American Journal of Clinical Nutrition, 71(2):621S-629S, Fev. de 2000. *Oxidative stress and Alzheimer disease*; Sasaki, et al., American Journal of Pathology, 153(4):1149-55, Out. de 1988. *Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases*.)

Adicionalmente, até o presente momento, é considerado que a Apo J está implicada em vários processos fisiológicos, tais como

10 maturação de esperma, transporte de lipídeo, inibição de complemento, remodelação de tecido, reciclagem de membrana, interações célula-célula e célula-substrato, estabilização de proteínas estressadas em um estado competente à dobra, e promoção ou inibição de apoptose. Também, Apo H é conhecida por ligar-se

15 fixamente a superfícies com carga negativa e inibir a ativação do caminho intrínseco de coagulação do sangue e a atividade de protrombinase de plaquetas ativadas pela cobertura de superfícies com carga negativa necessárias para ambas as atividades. Apo F está associada com LDL e inibe a atividade de proteína de

20 transferência de colesterol éster (CETP), e parece ser um regulador importante de transporte de colesterol. Apo F está associada em menor grau com VLDL, Apo AI e Apo AII. Foi proposto que Apo M está envolvida no transporte de lipídeo. (Feingold, et al., Atherosclerosis, 199(1):19-26, Jul. de 2008. *Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression*; Huang, et al.

25 Medical Hypotheses, 69(1):136-40, 2007. *Apolipoprotein M likely extends its anti-atherogenesis via anti-inflammation*; Dahlback, et al. Current Opinion in Lipidology, 17(3):291-5, Jun. de 2006.

*Apolipoprotein M—a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis.*) Apo CIV é uma apolipoproteína de 14,5 kD de tamanho no mesmo local que CI e CII, e ainda nenhuma função parece ser relatada na literatura.

Adicionalmente, baseado em correlações epidemiológicas entre doença cardiovascular e níveis de colesterol, os médicos vêm medindo e padronizando há muito tempo a medição dos níveis de colesterol para avaliar os riscos de doença cardíaca. Partículas de lipoproteína (LDL e HDL) e o colesterol associado com elas também têm sido usados na avaliação de riscos cardiovasculares. (Chen, et al., International Journal of Urology, 12(10):886-91, Out. de 2005. *Antiandrogenic therapy can cause coronary arterial disease*; Florez, et a., Atherosclerosis, 188(1):134-41, Set., 2006, *Increased Apolipoprotein C-III Levels Associated with Insulin Resistance Contribute to Dyslipidemia in Normoglycemic and Diabetic subjects from a Triethnic Population*; Scheffer, et al. Clinical Chemistry, 54(8):1325-30, Ago. de 2008. *Increased plasma apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn Study*; Gervaise, et al. Diabetologia, 43(6):703-8, Jun.. de 2000. *Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes*; Huang, et al. Medical Hypotheses, 69(1):136-40, 2007. *Apolipoprotein M likely extends its anti-atherogenesis via anti-inflammation*; Dahlback, et al. Current Opinion in Lipidology, 17(3):291-5, Jun. de 2006. *Apolipoprotein M—a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis*.) Muitos estudos de pesquisa foram realizados para relacionar os efeitos na saúde dos tamanhos e densidades da partícula de lipoproteína, mas as

conclusões destes estudos não foram consistentes.

Nos últimos anos, tem havido considerável evidência de que os níveis de apolipoproteína estão associados com uma variedade de condições, e recentemente o "National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)", em uma reunião recente com o "Centers for Disease Control and Prevention" [Centros de Controle e Prevenção de Doenças], recomendou que as medições de apolipoproteína B fossem incluídas para padronização em um futuro próximo. As apolipoproteínas estão associadas com doença cardiovascular, diabetes, acidente vascular cerebral, obesidade, Alzheimer, HIV, e outras doenças. (Allard, et al. Proteomics. 4(8):2242-51, Ago. de 2004. ApoC-1 and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke; Sierra-Johnson, et al., European Heart Journal, 28(21):2637-43, Nov. de 2007. ApoB/apoA-1: an independent predictor of insulin resistance in US non-diabetic subjects; Florez, et al., Atherosclerosis, 188(1):134-41, Set. de 2006. Increased apolipoprotein C-III levels associated with insulin resistance contribute to dyslipidemia in normoglycemic and diabetic subjects from a triethnic population; Malik, et al. Clinical Cancer Research, 11(3):1073-85, 1 de Fev. de 2005. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer; Chen, et al., International Journal of Urology, 12(10):886-91, Out. de 2005. Antiandrogenic therapy can cause coronary arterial disease; Sundsten, et al., Diabetes/Metabolism Research Reviews, 24(2):148-54, Fev. de 2008. Serum protein patterns in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus—influence of diabetic environment and family history of

diabetes; Alborn, et al. Clinica Chimica Acta, 378(1-2):154-8, Mar. de 2007. Relationship of apolipoprotein A5 and apolipoprotein C3 levels to serum triglycerides in patients with type 2 diabetes; Florez, et al., Atherosclerosis, 188(1):134-41, Set. de 2006,

5 Increased Apolipoprotein C-III Levels Associated with Insulin Resistance Contribute to Dyslipidemia in Normoglycemic and Diabetic subjects from a Triethnic Population; Dallinga-Thie, et al. Diabetologia, 49(7):1505-11, Jul. de 2006. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes; Davidsson,

10 et al., Journal of Lipid Research, 46(9):1999-2006, Set. de 2005. A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes; Rimland, et al., Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: JAIDS, 42(3):307-13, Jul. de 2006. Antiretroviral therapy in HIV-positive

15 women is associated with increased apolipoproteins and total cholesterol; Feingold, et al., Atherosclerosis, 199(1):19-26, Jul. de 2008. Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression; Shuvaev, et al., Neurobiology of Aging, 22(3):397-402, Mai-Jun. de 2001. Increased protein glycation in cerebrospinal

20 fluid of Alzheimer's disease; Christen, Y. American Journal of Clinical Nutrition, 71(2):621S-629S, Fev. de 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease; Sasaki, et al., American Journal of Pathology, 153(4):1149-55, 1988, Out. Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative

25 diseases; Rosenberg, et al., Molecular & Cellular Biology, 22(6):1893-902, Mar. de 2002. Apolipoprotein J/clustering prevents a progressive glomerulopathy of aging; Scheffer, et al. Clinical Chemistry, 54(8):1325-30, Ago. de 2008. Increased plasma

apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn Study; Gervaise, et al. Diabetologia, 43(6):703-8, Jun. de 2000. Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes; Ordonez, et al. Histology & Histopathology; 21(4):361-6, Abr. de 2006. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease; Tozuka, et al. Annals of Clinical & Laboratory Science, 27(5):351-7, Set-Out. de 1997. Characterization of hypertriglyceridemia induced by L-asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma; Favrot, et al. Biomedicine & Pharmacotherapy, 38(1):55-9, 1984. Study of blood lipids in 30 children with malignant hematological disease or carcinoma; Huang, et al. Medical Hypotheses, 69(1):136-40, 2007. Apolipoprotein M likely extends its anti-atherogenesis via anti-inflammation; Dahlback, et al. Current Opinion in Lipidology, 17(3):291-5, Jun. de 2006. Apolipoprotein M—a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis.) Dado o papel primário de apolipoproteínas no transporte e metabolismo de lipídeos, estas associações não são surpreendentes. A dificuldade de purificação, detecção, e quantificação de apolipoproteínas, entretanto, não tem tornado fácil conduzir investigações entre níveis destes compostos e efeitos na saúde.

Usando metodologia da técnica anterior, a quantificação e medição de apolipoproteína atualmente requerem a etapa de separação de partículas de lipoproteína do soro por ultracentrifugação analítica ou seqüencial, cromatografia de coluna, eletroforese, ou precipitação. Estas técnicas tradicionais atualmente têm um custo muito elevado e consomem muito tempo para

uso em análises clínicas de rotina. Uma outra técnica útil é cromatografia líquida de alto desempenho, que é mais rápida, mas muito mais complexa e de alto custo. Outras técnicas atualmente usadas para medição de teor de Apo A e B incluem ensaio imunológico de enzima (ELISA), radioimunoensaio, imunoensaio de fluorescência, imunodifusão radial, nefelometria, turbidimetria e eletroimunoensaio. Recentemente, espectrometria de massa de dessorção/ionização por laser de superfície melhorada (SELDI ou SELDITOF-MS, com TOF significando tempo de voo e MS significando espectrometria de massa) tem oferecido algumas opções novas para medição de apolipoproteína no plasma, soro, e frações de lipoproteína. Entretanto, toda técnica conhecida é desvantajosa pelo menos pelo fato de que uma apolipoproteína única deve ser escolhida para quantificação e medição, dessa maneira requerendo que diversas técnicas longas, complexas e de alto custo sejam executadas, se a informação referente a diversas apolipoproteínas for requerida. Adicionalmente, perfis de plasma ou soro total requerem agrupamento elaborado e técnicas de reconhecimento de padrão para detectar diferenças nas amostras de indivíduos normais e saudáveis.

Conseqüentemente existe uma necessidade de ensaios precisos, rápidos, reprodutíveis para a separação, identificação e quantificação de apolipoproteínas. Existe uma necessidade de técnicas melhoradas para a realização de impressão digital, perfil, determinação, e/ou quantificação de apolipoproteínas presentes nas matrizes biológicas, tais como amostras de plasma, soro e frações de lipoproteína, urina, ou similares, onde o fenótipo de um indivíduo humano específico pode

ser caracterizado em vez de ou em adição ao genótipo. É a estas e outras necessidades que a presente invenção está direcionada.

#### BREVE SUMÁRIO DESTA INVENÇÃO

Em resumo, a técnica da invenção combina técnicas  
5 imunológicas com dessorção/ionização a laser de superfície aumentada, SELDI, para facilitar a detecção e medição de apolipoproteínas múltiplas diretamente em matrizes biológicas, tais como, apenas para objetivos exemplificativos, urina, plasma ou soro não fracionado, ou em frações de lipoproteínas, ou em  
10 qualquer outra matriz biológica adequada. Além do mais, padrões internos facilitam a confiança aumentada nos resultados, onde detecção e medição de proteínas conhecidas tendo propriedades de ligação de anticorpo similares às proteínas de interesse, mas com uma massa molecular visivelmente diferente, podem ser co-  
15 analisadas de modo que a massa do(s) polipeptídeo(s) desconhecido(s) determinada por espectrometria de massa possa ser comparada à massa do polipeptídeo de referência do padrão interno de identidade e concentração conhecidas. Desta maneira, limitações sistêmicas previamente não reconhecidas podem ser essencialmente  
20 superadas.

De acordo com seus aspectos principais, e conforme brevemente apresentada, a técnica de impressão digital de apolipoproteína, conforme descrita aqui, permite a separação, concentração e detecção de uma ou mais apolipoproteínas em uma  
25 superfície, ao invés de requerer, por exemplo, extração e deslipidação da amostra, e então uma seleção tanto de um chip carregado ou de uma série de chips, de acordo com a apolipoproteína para a qual a informação está sendo buscada.

Conforme observado acima, de acordo com metodologias conhecidas, perfis de plasma ou soro total requerem agrupamento elaborado e técnicas de reconhecimento de padrão para detectar diferenças em amostras de indivíduos normais e saudáveis.

5 O uso de anticorpos específicos na tecnologia SELDI, entretanto, conduz a um método de análise muito mais simples. Uma outra característica de simplificação da tecnologia SELDI é cromatografia de retentado. Proteínas de interesse são retidas por sua ligação a uma superfície específica enquanto outros analitos  
10 são eliminados, onde absorção e dessorção podem ser modificadas por ajustes no pH, concentração de sal ou solventes orgânicos. Ácido sinapínico ou outra matriz apropriada é misturado em uma solução preparada na hora com ácido tetrafluoroacético e aplicado ao assim denominado "chip" e, mediante secagem, as moléculas do  
15 analito embebidas na matriz são dessorvidas por um laser, ionizadas da fase sólida, e aceleradas como íons moleculares intactos. Estas características SELDI são adicionalmente exploradas pela técnica melhorada da presente invenção.

Uma configuração da técnica preferida da presente  
20 invenção usa anticorpos específicos, ligados a chips de superfície aumentada por meio da Proteína G, ou proteína ou molécula de captura de anticorpo similarmente funcional, para seletivamente absorver apolipoproteínas diretamente de amostras de plasma. A Proteína G preferida se liga à porção Fc dos anticorpos  
25 selecionados, resultando em um posicionamento direcional intencional da mesma que serve para aumentar de forma reprodutível a ligação dos anticorpos a antígenos específicos de interesse em amostras biológicas. Uma ou mais dentre as apolipoproteínas

especificamente direcionadas em uma amostra biológica são, dessa maneira, retidas na superfície dos chips de superfície aumentada, enquanto outros componentes da amostra são eliminados. A matriz de solução EAM (molécula de absorção de energia) facilita ionização/dessorção de laser das apolipoproteínas. As apolipoproteínas ionizadas atingem o detector em tempos ligeiramente diferentes baseados em seus tempos de voo, cujas diferenças de tempo podem ser convertidas em massas. As intensidades dos picos são relacionadas à quantidade de cada proteína. Dessa maneira, apolipoproteínas totais, assim como isoformas, podem ser identificadas e quantificadas, resultando no desenvolvimento eficiente de um perfil de apolipoproteína para uma amostra alvo de uma técnica singular. Além do mais, a técnica provê um aumento benéfico no controle da qualidade, permitindo a inclusão de padrões internos, assim melhorando a garantia da qualidade, precisão e reprodutibilidade dos resultados.

As composições, níveis, e isoformas das apolipoproteínas em matrizes biológicas, plasma e em frações de lipoproteínas, são determinantes de vários distúrbios ou condições relacionadas à doença cardiovascular e outros distúrbios crônicos tais como acidente vascular cerebral, síndrome metabólica, inflamação, mal de Parkinson, diabetes, Alzheimer, HIV e pacientes de HIV sob inibidores de protease (hipertrigliceridêmicos), e vários tipos de lipoproteinemia (Id.). Por exemplo, um ensaio de diagnóstico clínico para isoformas CIII, de acordo com a técnica atualmente descrita, poderia indicar benéficamente distúrbios potenciais, incluindo, mas não limitado àqueles mencionados acima. Estudos clínicos usando medicamentos que diminuem lipídeos se

beneficiariam das técnicas de impressão digital de apolipoproteína da presente invenção, onde as técnicas da presente invenção permitiriam uma observação valiosa dos níveis e distribuição de apolipoproteínas e suas isoformas nas matrizes biológicas, tal como plasma, e em frações de lipoproteína diferentes para mostrar como estes parâmetros se alteram com distúrbios e tratamentos diferentes. As técnicas da presente invenção também são ideais para avaliar a situação da apolipoproteína em recém nascidos e para avaliar as modificações da apolipoproteína que ocorrem com o envelhecimento, nutrição, exposições ambientais, e alterações no estilo de vida.

Aplicações ilustrativas da técnica presentemente descrita incluem a definição de biomarcadores ou perfis de apolipoproteína específicos à doença e o desenvolvimento de ensaios quantitativos que sejam rápidos e úteis para diagnósticos ou categorização de uma ou mais doenças ou condições. Estas características, e outras características e vantagens da presente invenção, se tornarão mais aparentes para aqueles com especialização ordinária na técnica relevante, quando a descrição detalhada a seguir das configurações preferidas for lida em conjunto com os desenhos em anexo.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A presente invenção será mais bem compreendida através da leitura da Descrição Detalhada das Configurações Preferidas ou Alternativas com referência às figuras anexas, que ilustram a reprodutibilidade de padrões e perfis de isoforma representativos para a invenção, nos quais números de referência similares denotam estrutura similar e se referem a elementos

similares em toda a descrição, e nos quais:

A Figura 1A é uma tabela de Pesos Moleculares dos Padrões de Diferentes Isoformas CIII;

5 A Figura 1B é uma representação de Espectros de Massa e Pesos Moleculares Relatados dos Padrões de Diferentes Isoformas CIII;

A Figura 2 é uma representação de Chip CHIPHERGEN Q10 de Perfil de Apolipoproteína Agrupada CIII (Isoformas CIII-0, CIII-1, e CIII-2);

10 A Figura 3 é uma representação de Chip CHIPHERGEN CM10 de Perfil de Apolipoproteína Agrupada CIII (Isoformas CIII-0, CIII-1, e CIII-2);

15 A Figura 4A é uma primeira representação de Chip CHIPHERGEN Anti-CIII PS 20 de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII;

A Figura 4B é uma segunda representação de Chip CHIPHERGEN Anti-CIII PS 20 de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII;

20 A Figura 5 é uma representação de Chip CHIPHERGEN Anti-CIII PS 20 de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII;

A Figura 6 é uma representação de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII no Plasma;

25 A Figura 7 é uma representação de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII em Diferentes Diluições de Plasma;

A Figura 8 é uma representação de Reprodutibilidade de Perfil de Isoformas CIII em Diferentes Diluições de Plasma;

A Figura 9 é uma representação da Comparação do Chip CHIPHERGEN Anti-CIII PS 20 de Perfil de Isoforma CIII de Indivíduos Normais e Diabéticos;

A Figura 10 é uma representação da Comparação do Perfil de Apolipoproteína C de Indivíduos Normais e Diabéticos;

A Figura 11 é uma representação da Distribuição no Plasma Total entre Indivíduos Normais e Diabéticos; e

A Figura 12 é uma representação de Perfis de Isoforma de Apolipoproteína de Testes de Plasma Diretos.

10

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONFIGURAÇÕES PREFERIDAS

Na descrição das configurações preferidas e alternativas da presente invenção, e com referência às Figuras 1A-12, terminologia específica é empregada por uma questão de clareza. A invenção, entretanto, não objetiva ser limitada pela terminologia específica utilizada, e deve ser entendido que cada elemento específico inclui todos os equivalentes técnicos que operem de maneira similar para a realização funções similares.

Esta invenção provê métodos sensíveis e rápidos que podem ser úteis na identificação e na avaliação de doenças cardiovasculares (por exemplo, distúrbios de lipídeo, síndrome metabólica, e aterosclerose), mal de Alzheimer, câncer, câncer da próstata, estresse, acidente vascular cerebral, diabete, inflamação, mal de Parkinson e outros distúrbios neurológicos, e/ou de qualquer condição ou distúrbio que possa ser diagnosticado e/ou caracterizado usando um perfil compreendendo apolipoproteínas. Visto que um perfil de apolipoproteína, e a caracterização de isoforma relativa, estão correlacionados com uma situação de uma doença, assim, portanto, a situação de uma doença

em um paciente pode ser determinada de forma sensível e rápida, usando a técnica presentemente descrita. Dessa maneira, a capacidade da técnica e metodologia presentemente descritas é permitir a definição de biomarcadores ou perfis de apolipoproteína  
5 específicos da doença, e desenvolver ensaios quantitativos que sejam rápidos e úteis para diagnóstico e categorização de uma ou mais doenças ou condições.

Mais especificamente, em uma configuração ilustrativa, a presente invenção provê um método de qualificação da situação da doença em um indivíduo compreendendo as etapas de:  
10

(1) medição de pelo menos um biomarcador em uma amostra do indivíduo, onde o pelo menos um biomarcador é selecionado do grupo consistindo de Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo AI1, Apo AIV, Apo AV, Apo B100, Apo B48, Apo E,  
15 Apo D, Apo H, Apo G, Apo F, Apo J, Apo L, Apo M, isoformas das mesmas, e combinações das mesmas;

(2) analisar ou quantificar ou medir o pelo menos um biomarcador na amostra por espectrometria;

(3) preparar um perfil do pelo menos um biomarcador usando a análise, quantificação, ou medição, e  
20

(4) comparar o perfil do pelo menos um biomarcador aos perfis de padrão que indicam doença,

onde a presença, ausência, ou concentração relativa do pelo menos um biomarcador na amostra indicam doença.

25 Em uma configuração ilustrativa relacionada, a presente invenção provê um método de qualificação de situação da doença em um indivíduo compreendendo as etapas de:

(1) medir diversos biomarcadores em uma amostra

do indivíduo, onde os biomarcadores são selecionados do grupo consistindo de Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo All, Apo AIV, Apo AV, Apo B100, Apo B48, Apo E, Apo D, Apo H, Apo G, Apo F, Apo J, Apo L, Apo M, isoformas das mesmas, e combinações das mesmas;

(2) analisar ou quantificar ou medir os biomarcadores na amostra por espectrometria;

(3) preparar um perfil dos biomarcadores usando a análise, quantificação, ou medição; e

(4) comparar o perfil dos biomarcadores à perfis de padrões que indicam doença,

onde a presença, ausência, ou concentração relativa dos biomarcadores na amostra indicam uma doença ou doenças.

Em outras configurações ilustrativas, a etapa de medição compreende a quantificação da quantidade do pelo menos um biomarcador ou diversos biomarcadores na amostra. Nas configurações ilustrativas adicionais, a invenção envolve a resolução do pelo menos um biomarcador ou diversos biomarcadores, compreendendo o uso de espectrometria de massa SELDI.

Dessa maneira, a técnica de realização de perfil de proteína de alta produtividade presentemente descrita, em combinação com o uso efetivo de ferramentas de bioinformática provê uma abordagem útil para explorar biomarcadores, assim como outros benefícios úteis se comparada com técnicas atualmente disponíveis para determinação de apolipoproteína. O sistema usado na presente invenção preferivelmente utiliza equipamento de laboratório PROTEINCHIPO cromatográfico, isto é, um equipamento

para explorar amostras, detectar a presença de analitos nas amostras, identificar o tipo de amostra, juntamente com padrões de medição, assim como equipamento para fazer e explorar arranjos moleculares para analisar amostras usando SELDI. Proteínas ligadas aos arranjos são preferivelmente lidas em um leitor de arranjo PROTEINCHIP, que é um espectrômetro de massa de tempo de voo.

Adicionalmente, o método desta invenção efetivamente aumenta a capacidade do chip para detectar de forma reprodutível proteínas modificadas (proteínas glicosiladas, etc.) e proteínas degradadas, onde a utilização de Proteína G, Proteína A, derivados das mesmas, ou outra molécula de receptor de anticorpo adequada, facilita, de forma precisa, a colocação direcional preferida de anticorpos no chip, onde o termo anticorpo, conforme usado em todo o relatório, objetiva fazer referência ao anticorpo integral, fragmento de anticorpo, imitador de anticorpo, "aptimer", e/ou qualquer outro receptor de antígeno adequado. Similarmente, o termo receptor de anticorpo, conforme usado em todo o relatório, objetiva fazer referência a qualquer estrutura molecular, ou componente da mesma, que seja capaz de se ligar a um anticorpo, ou receptor de antígeno, conforme definido aqui. Adicionalmente, a eliminação do método de extração inicial e das técnicas de purificação direcionadas acopladas com a substituição de técnicas de detecção baseadas em fluorescência, permite a detecção de diversas apolipoproteínas com modificações pré- e/ou pós-translacionais. Formas modificadas por pré-translação incluem variantes alélicas, variantes de fatia e formas de edição de RNA. Formas modificadas pós-translação incluem formas que resultam de truncação, clivagem proteolítica (por exemplo,

fragmentos de uma proteína mãe), glicosilação, lipidação, cisteinilação, glutationilação, fosforilação, prenilação, acilação, acetilação, metilação, sulfação, sulfonação, hidroxilação, miristoilação, farnesilação, oxidação e ubiquitinação. Formas modificadas de qualquer biomarcador desta invenção também, elas mesmas, podem, dessa maneira, ser usadas como biomarcadores. Estas modificações serviram anteriormente para influenciar adversamente ou impedir resultados em técnicas anteriores.

Como pode ser visto, os perfis realizados da presente técnica podem compreender composições, níveis, e isoformas de apolipoproteínas de qualquer matriz biológica adequada, tal como extraída do plasma e das frações de lipoproteína, onde estas composições, níveis, e isoformas podem ser determinantes de várias doenças, distúrbios ou condições. Conforme usado aqui, o termo doenças inclui distúrbios e condições, e é usado especificamente em relação, mas não limitado a doença cardiovascular e outros distúrbios crônicos, tais como acidente vascular cerebral, síndrome metabólica, diabetes, Alzheimer, HIV, inflamação, Parkinson, doença neurológica, vários tipos de lipoproteinemia, câncer da próstata, e vários outros cânceres. Por exemplo, estudos clínicos conduzidos em conjunto com as doenças mencionadas acima ou outras doenças e o uso de medicamentos para diminuição de lipídeos, seriam beneficiados pela técnica de impressão digital de apolipoproteína da presente invenção, onde resultados rápidos, eficientes, confiáveis e precisos podem ser coletados e analisados. Como um exemplo adicional, o uso da técnica de impressão digital da presente

invenção permitiria observar os níveis e a distribuição de apolipoproteínas e suas isoformas no plasma e em frações de lipoproteína diferentes, para mostrar como estes parâmetros alteram com diferentes doenças e seus tratamentos. Para ainda um  
5 outro exemplo, a técnica da presente invenção pode ser ideal para avaliar a situação da apolipoproteína em recém-nascidos e para avaliar as modificações nas apolipoproteínas que ocorrem com o envelhecimento, nutrição, exposições ambientais, e alterações no estilo de vida, por exemplo.

10 Em ainda um outro exemplo, a presente invenção provê kits para qualificação da situação da doença, onde os kits podem ser usados para medir biomarcadores específicos de acordo com a técnica da presente invenção. Por exemplo, os kits podem ser usados para medir qualquer um ou mais de um dos biomarcadores  
15 descritos aqui, cujos biomarcadores estão presentes diferencialmente nas amostras de pacientes doentes e de indivíduos normais. Para um outro exemplo, os kits podem também ser usados para monitorar a resposta do paciente a um regime de tratamento, permitindo ao médico modificar o tratamento com base nos  
20 resultados do teste. Para ainda um outro exemplo, os kits podem ser usados para identificar compostos que modulam a expressão de um ou mais dos biomarcadores em modelos animais *in vitro* ou *in vivo* para doenças, avaliando o impacto de alterações metabólicas devido às diferenças nos níveis de hormônios, vitaminas,  
25 atividades enzimáticas e outras moléculas reguladoras biológicas vitais nos metabolismos de lipídeo, proteína e carboidratos, imunidade, saúde mental, e comportamento. E, adicionalmente, os kits podem ser usados para observar o impacto da genética,

nutrição, medicamentos e outras terapias, tais como tratamento e resposta a gene, químicos, rádio, ou similares, envelhecimento, comportamento, crescimento e desenvolvimento, estilo de vida, meio ambiente, e doenças em expressões de proteína e no metabolismo humano.

Uma configuração da técnica preferida da presente invenção usa anticorpos específicos, ligados a chips de superfície aumentada por meio de Proteína G, para absorver seletivamente apolipoproteínas diretamente de amostras de plasma. A proteína G se liga à porção fc dos anticorpos, efetivamente e beneficadamente orientando os anticorpos ligados. Técnicas anteriores eram desvantajosamente não reprodutíveis de forma confiável, onde a orientação física dos anticorpos ligados era deixada ao acaso, e assim variada na concentração de locais que estavam disponíveis para ligação subsequente à apolipoproteína alvo. Dessa maneira, a presente técnica melhora a ligação dos anticorpos a antígenos específicos de interesse em amostras biológicas. No contexto da presente revelação, e especificamente com relação aos anticorpos conforme discutido aqui acima, é observado que fragmentos de anticorpo, imitadores, e/ou qualquer outro componente compreendendo a região variável apropriada e/ou receptor de antígeno, podem ser utilizados alternativamente.

A superfície dos chips de superfície aumentada retém as apolipoproteínas específicas, enquanto outros componentes da amostra são eliminados. A matriz de solução EAM facilita a ionização/dessorção de laser das apolipoproteínas. As apolipoproteínas ionizadas atingem o detector em tempos ligeiramente diferentes baseados em seus tempos de voo, cujas

diferenças nos tempos podem ser convertidas em massas. As intensidades dos picos estão relacionadas à quantidade de cada proteína. Conforme usado aqui, os termos anticorpo e anticorpos incluem fragmentos de anticorpos, imunoglobulinas, proteínas de ligação ("affybodies"), etc. Deve ser observado que, de acordo com a técnica preferida, e diferente de outras técnicas atualmente disponíveis para caracterização de apolipoproteínas, o perfil é fenotípico, ao invés de genotípico. Esta característica benéfica permite a identificação de apolipoproteínas modificadas, e pode, portanto, facilitar a identificação de influências ambientais, por exemplo, ao comparar amostras do mesmo indivíduo de períodos de tempo diferentes. Como um exemplo adicional, o desenvolvimento de um perfil de apolipoproteína de acordo com a presente técnica permitirá que amostras gêmeas idênticas sejam distinguidas com base em modificações do estilo de vida, ou mutações, que são refletidas nas diferenças de perfil.

Métodos preferidos de medição de biomarcadores incluem o uso de um arranjo de biochip. Arranjos de biochip úteis na invenção incluem arranjos de proteína e ácido nucléico. Um ou mais biomarcadores, apolipoproteínas e modificações das mesmas, conforme aqui descrito, são capturados no arranjo de biochip e submetidas à ionização de laser para detectar o peso molecular dos biomarcadores. A análise dos biomarcadores é, por exemplo, por peso molecular de um ou mais biomarcadores contra uma intensidade de limite que é normalizada contra a corrente de íon total. Preferivelmente, transformação logarítmica é usada para reduzir faixas de intensidade de pico de modo a limitar o número de biomarcadores detectados. Também, preferivelmente, um ou mais

padrões internos são capturados no mesmo arranjo de biochip com o biomarcador desconhecido, onde o(s) padrão(ões) interno(s) é(são) preferivelmente um biomarcador de um peso molecular com um tamanho relevante ao biomarcador buscado para perfil. A capacidade da presente técnica para facilitar a adição de um padrão interno permite quantificação de componentes de perfil, incluindo isoformas de apolipoproteína identificadas. A capacidade da técnica descrita para definir e apresentar a contribuição de cada isoforma de apolipoproteína para a saúde geral, e relacionar esta informação à concentração de proteína total conhecida e presentemente medida, permite que o médico transfira novos conhecimentos às diretrizes clínicas de tratamento do paciente. Técnicas anteriores eram incapazes de prover estes dados.

Nos métodos preferidos da presente invenção, a etapa de preparar um perfil de biomarcadores e comparar os biomarcadores com uma condição da doença é executada por um algoritmo de classificação de software. Preferivelmente, dados são gerados em amostras de indivíduos imobilizadas em um arranjo de biochip por (1) submissão do arranjo de biochip à ionização de laser e detecção da intensidade de um sinal para a proporção massa/carga; (2) transformação dos dados para uma forma legível por computador; (3) execução de um algoritmo que classifique os dados de acordo com parâmetros inseridos pelo usuário para detectar sinais que representam biomarcadores que estão presentes em pacientes doentes e que estão ausentes em indivíduos de controle saudáveis; (4) comparação dos níveis dos biomarcadores à faixa de referência clínica existente para avaliar o grau de risco ou gravidade da doença; e (5) transformação de dados de

biomarcador individual na concentração de proteína total atualmente medida e conhecida para permitir a transferência de novos conhecimentos para as diretrizes clínicas existentes de tratamento do paciente. A etapa (1) preferivelmente usa SELDI-TOF-MS, que, de forma geral, compreende (a) prover uma sonda adaptada para uso com um espectrômetro de massa compreendendo um adsorvente anexado à mesma; (b) contatar a amostra do indivíduo com o adsorvente; (c) dessorver e ionizar o biomarcador ou biomarcadores da sonda; e (d) detectar os biomarcadores ionizados com o espectrômetro de massa.

Em um exemplo, o software CIPHERGEN BIOMARKER PATTERNSTM, que é um pacote de software para classificação supervisionada de conjuntos de dados espectrais de massa SELDI derivados de espectrômetros de massa da plataforma de arranjo CIPHERGEN PROTEINCHIP® e sintetizadores químicos usados para determinar identificação e estrutura de proteína, é usado para detectar um padrão nos espectros que são gerados. Os dados são classificados usando um processo de reconhecimento de padrão que usa um modelo de classificação. No geral, os espectros representarão amostras de pelo menos dois grupos diferentes para os quais um algoritmo de classificação é buscado. Por exemplo, os grupos podem ser: patológico contra não-patológico (por exemplo, câncer contra não-câncer), resposta de medicamento contra não-resposta de medicamento, resposta tóxica contra resposta não tóxica, progressão para um estado de doença contra não-progressão para um estado de doença, ou condição fenotípica presente contra condição fenotípica ausente.

Os espectros que são gerados na etapa (1) de

configurações da invenção podem ser classificados usando um processo de reconhecimento de padrão que usa um modelo de classificação. Em algumas configurações, dados derivados dos espectros (por exemplo, espectros de massa ou espectros de tempo de voo) que são gerados usando amostras tais como "amostras conhecidas" podem, então, ser usados para "treinar" um modelo de classificação. Uma "amostra conhecida" é uma amostra que é pré-classificada (por exemplo, câncer ou não câncer). Dados derivados dos espectros (por exemplo, espectros de massa ou espectros de tempo de voo) que são gerados usando amostras tais como "amostras conhecidas" podem, então, ser usados para "treinar" um modelo de classificação. Uma "amostra conhecida" é uma amostra pré-classificada. Os dados que são derivados dos espectros e são usados para formar o modelo de classificação podem ser referidos como "conjunto de dados de treinamento". Após o treinamento, o modelo de classificação pode reconhecer padrões nos dados derivados de espectros gerados usando amostras desconhecidas. O modelo de classificação pode, então, ser usado para classificar as amostras desconhecidas em várias classes. Isto pode ser útil, por exemplo, para prever se uma amostra biológica específica está ou não associada com certa condição biológica (por exemplo, doente em relação à saudável).

O conjunto de dados de treinamento que é usado para formar o modelo de classificação pode compreender dados brutos ou dados pré-processados. Em algumas configurações, dados brutos podem ser obtidos diretamente de espectros de tempo de voo ou espectros de massa, e, então, podem ser opcionalmente "pré-processados" de qualquer maneira adequada. Por exemplo, sinais

acima de uma proporção de sinal-para-ruído predeterminada podem ser selecionados, de modo que um subconjunto de picos em um espectro seja selecionado, ao invés de selecionar todos os picos em um espectro. Em um outro exemplo um número predeterminado de "agrupamentos" de pico em um valor comum (por exemplo, um valor de tempo de voo específico ou valor de proporção de massa para carga) pode ser usado para selecionar picos. Ilustrativamente, se um pico em uma proporção de massa para carga dada for menor que 50% dos espectros de massa em um grupo de espectros de massa, então o pico naquela proporção de massa para carga pode ser omitido do conjunto de dados de treinamento. Etapas de pré-processamento tais como estas podem ser usadas para reduzir a quantidade de dados que é usada para treinar o modelo de classificação.

Modelos de classificação podem ser formados usando qualquer método adequado de classificação estatística (ou "aprendizado") que tente segregar corpos de dados em classes baseado em parâmetros objetivos presentes nos dados. Métodos de classificação podem ser tanto supervisionados quanto não supervisionados. Exemplos de processos de classificação supervisionados e não supervisionados são descritos por Jain, "Statistical Pattern Recognition: A Review", IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol. 22, Nº 1, Janeiro de 2000, que é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Em classificação supervisionada, exemplos contendo dados de treinamento de categorias conhecidas são apresentados para um mecanismo de aprendizado, que ensina um ou mais conjuntos de relacionamentos que definem cada uma das classes conhecidas. Novos dados podem, então, ser aplicados ao mecanismo

de aprendizado, que então classifica os novos dados usando os relacionamentos aprendidos. Exemplos de processos de classificação supervisionados incluem processos de regressão linear (por exemplo, regressão linear múltipla (MLR), regressão de quadrados mínimos parcial (PLS) e regressão de componentes principais (PCR),  
5 árvores de decisão binária (por exemplo, processos de particionamento recursivo, tais como CART - árvores de classificação e regressão), redes neurais artificiais tais como redes de propagação retrógrada, análises de discriminação (por exemplo, classificador Bayesiano ou análise de Fischer),  
10 classificadores logísticos, e classificadores de vetor de suporte (máquinas de vetor de suporte).

Após ser capturado em um substrato, por exemplo, um biochip ou anticorpo, qualquer método adequado pode ser usado  
15 para medir um biomarcador ou biomarcadores em uma amostra. Por exemplo, biomarcadores podem ser detectados e/ou medidos por uma variedade de métodos de detecção, incluindo, por exemplo, métodos de espectrometria de íon de fase gasosa, métodos óticos, métodos eletroquímicos, microscopia de força atômica e métodos de  
20 frequência de rádio. Usando estes métodos, um ou mais biomarcadores podem ser detectados na amostra.

Nos métodos preferidos da presente invenção, biomarcadores múltiplos são medidos. O uso de biomarcadores múltiplos aumenta o valor de previsão do teste e provê maior  
25 utilidade em diagnósticos, toxicologia, estratificação de paciente e monitoramento de paciente. O processo denominado "reconhecimento de padrão" detecta os padrões formados por biomarcadores múltiplos e melhora grandemente a sensibilidade e especificidade de

proteômicos clínicos para medicina preventiva. Variações sutis nos dados de amostras clínicas, por exemplo, obtidas usando SELDI, indicam que certos padrões de expressão de proteína podem prever fenótipos tais como a presença ou ausência de certa doença, um estágio específico de progressão da doença, ou uma resposta positiva ou adversa a tratamentos por medicamentos. (Bard, et al., Antiviral Therapy, 11(3):361-70, 2006. Study Group. Association of apolipoproteins C3 and E with metabolic changes in HIV-infected adults treated with a protease-inhibitor-containing antiretroviral therapy.)

A geração de dados em espectrometria de massa começa com a detecção de íons por um detector de íon conforme descrito acima. Íons que colidem com o detector geram um potencial elétrico que é digitalizado por um dispositivo de gravação de arranjo de tempo de alta velocidade que captura digitalmente o sinal análogo. O sistema de arranjo CIPHERGEN PROTEINCHIP® emprega um conversor de análogo para digital (ADC) para efetuar isto. O ADC integra a saída do detector em intervalos de tempo regularmente espaçados em bins dependentes do tempo. Os intervalos de tempo tipicamente são de um a quatro nanossegundos de comprimento. Adicionalmente, o espectro de tempo de voo analisado por último, tipicamente não representa o sinal de um único pulso de energia de ionização em relação a uma amostra, mas ao invés disso, a soma de sinais de uma série de pulsos. Isto reduz o ruído e aumenta a faixa dinâmica. Estes dados de tempo de voo são, então, submetidos a processamento de dados. No software de arranjo CIPHERGEN PROTEINCHIP, o processamento de dados tipicamente inclui transformação TOF-para-M/Z, subtrações de linha de base, e

filtração de ruído de alta frequência. Nesta etapa, os sinais são convertidos do domínio de tempo para o domínio de massa.

A subtração de linha de base melhora a quantificação dos dados pela eliminação de deslocamentos de instrumentos reprodutíveis, artificiais, que perturbam o espectro. Isto envolve o cálculo de uma linha de base de espectro usando um algoritmo que incorpora parâmetros tais como largura de pico, e, então, subtrai a linha de base do espectro de massa. Dados de pico de um ou mais espectros podem ser submetidos à análise adicional, por exemplo, pela criação de uma planilha na qual cada fileira representa um espectro de massa específico, cada coluna representa um pico no espectro definido pela massa, e cada célula inclui a intensidade do pico naquele espectro específico. Várias abordagens de reconhecimento de padrões ou estatísticas podem ser aplicadas aos dados. Conforme revelado acima, o software CIPHERGEN BIOMARKER PATTERNSTM é preferivelmente usado para detectar um padrão nos espectros que são gerados. Os dados são classificados usando um processo de reconhecimento de padrão que usa um modelo de classificação. No geral, os espectros preferivelmente representam amostras de pelo menos dois grupos diferentes para os quais um algoritmo de classificação é buscado.

Amostras podem ser coletadas de pacientes ou de outros indivíduos que queiram estabelecer várias condições de doença. Os indivíduos podem ser seres humanos específicos que acreditam que eles estão ou podem estar dentro de um fator de risco mais elevado para certos tipos de doenças, por exemplo, a partir de seu histórico médico. Outros indivíduos podem ser pessoas que tenham tido certas doenças e desejam monitorar a

eficácia de seus tratamentos. Adicionalmente, é possível obter as amostras de indivíduos como parte de exames de rotina.

Qualquer biomarcador, individualmente, é útil no auxílio da determinação da situação da doença. Primeiramente, o biomarcador selecionado é medido em uma amostra de indivíduo usando os métodos descritos aqui, por exemplo, captura em um biochip SELDI seguido pela detecção por espectrometria de massa. Então, a medição é comparada com uma quantidade de diagnóstico ou controle que distingue aquele status da doença de um status de não-doença. A quantidade diagnóstica refletirá que um biomarcador específico está regulado para cima ou regulado para baixo em um status de doença comparado com um status de não-doença. Como é bem compreendido na técnica, a quantidade diagnóstica específica usada pode ser ajustada para aumentar a sensibilidade ou especificidade do ensaio de diagnóstico, dependendo da preferência do técnico de diagnósticos. A quantidade de teste conforme comparada com a quantidade diagnóstica indica, assim, o status da doença.

#### METODOLOGIAS EXEMPLIFICATIVAS

As metodologias exemplificativas reveladas abaixo são métodos representativos para uso das configurações preferidas da invenção. Nestas metodologias, uma amostra de soro pode ser coletada de um paciente e, então, fracionada usando uma resina de troca iônica. Os biomarcadores na amostra são capturados usando um arranjo PROTEINCHIP® de cobre IMAC (Captura de Afinidade de Metal Imobilizado). (Dubrovsky, et al. Clinical Chemistry, 45(9):1675. 1999. *Immobilization of monolayers of Fc-binding Receptors on Planar Solid Supports*.) Os biomarcadores, então, são detectados usando SELDI. Os resultados são, então, inseridos em um sistema de

computador, que contém um algoritmo que é designado usando os mesmos parâmetros que foram usados no algoritmo de aprendizado e algoritmo de classificação para determinar originalmente os biomarcadores. O algoritmo produz um diagnóstico baseado nos dados recebidos relacionados a cada biomarcador. Vide as Figuras 1A-12 para consulta de dados experimentais relativos a correlações entre isoformas CIII e doença cardiovascular e diabetes. Correlações exemplificativas entre várias apolipoproteínas e doenças, conforme previamente discutido, foram confirmadas na literatura. (Allard, et al. *Proteomics*, 4:2242-2251, 2004. *ApoC-1 and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke*; Scheffer, et al., *Clinical Chemistry*. 54(8):1325-30, Ago. De 2008. *Increased plasma apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn Study*; Gervaise, et al. *Diabetologia*. 43(6):703-8, Jun. de 2000. *Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes.*)

O diagnóstico pode ser determinado pelo exame dos dados produzidos dos testes SELDI com o algoritmo de classificação que é desenvolvido usando os biomarcadores. O algoritmo de classificação depende das especificidades do protocolo de teste usado para detectar os biomarcadores. Estas especificidades incluem, por exemplo, preparação de amostra, tipo de chip e parâmetros de espectrômetro de massa. Se os parâmetros de teste mudarem, o algoritmo deve mudar. Similarmente, se o algoritmo mudar, o protocolo de teste pode mudar.

Para a presente invenção preferida, apolipoproteínas purificadas, amostras de plasma de indivíduos

normais, e amostras de plasma de indivíduos diabéticos foram analisadas usando a superfície de chip de proteína PG-20. As apolipoproteínas específicas que foram analisadas de acordo com o método da invenção estão presentes em diversas matrizes biológicas, incluindo, mas não limitada a plasma, soro e fração de lipoproteína em vários níveis. A presença de cada apolipoproteína é determinada usando anticorpos específicos para cada apolipoproteína.

O protocolo revelado abaixo é limitado à faixa de peso molecular que pode ser analisada por tecnologia de MS de corrente. Inicialmente, B100 (500 kD) e B48 (aproximadamente 250 kD) são tanto primeiramente isoladas por ligação ao anticorpo-superfície, liberadas e, então, quimicamente ou enzimaticamente fragmentadas antes da análise de MS quanto por digestão direta enquanto são ligadas ao chip PG20 usando o protocolo abaixo.

#### 1. Preparação de Amostra

Antes do procedimento SELDI-TOF-MS, amostras de plasma foram diluídas com tampão 5 e o anticorpo foi acoplado ao PROTEINCHIP® como segue:

Preparação de amostra de plasma:

(1) Preparar tampão U9 (9M uréia, 50 mM HEPES, 0,5% CHAPS, pH 7); e

(2) Diluir amostra de plasma com Tampão U9 (1:2) e turbilhonamento a frio durante 30 minutos.

Acoplamento de Anticorpo a arranjo PROTEINCHIP®

(1) Diluir o anticorpo até 0,2 mg/ml e adicionar 2 µl a locais (spots) no arranjo;

(2) Transferir o arranjo a uma câmara de umidade

e incubar durante 1 hora na temperatura ambiente;

(3) Aspirar o anticorpo sem tocar na superfície do local;

(4) Lavar o chip em tubo cônico de 15 mL durante 10 minutos com 8 mL de tampão de lavagem;

(5) Esvaziar e lavar com 8 mL solução salina tamponada com fosfato durante 5 minutos, e repetir; e

(6) Secar excesso de PBS da superfície do chip.

## 2. Procedimento SELDI-TOF-MS

10 (1) Adicionar 2  $\mu$ l de amostra de plasma a cada local (spot);

(2) Transferir o arranjo para uma câmara de umidade e incubar durante 1 hora na temperatura ambiente;

15 (3) Lavar o chip em tubo cônico de 15 mL com 8 mL de tampão de lavagem durante 10 minutos;

(4) Esvaziar e lavar com 8 mL de solução salina tamponada com fosfato durante 5 minutos, e repetir;

20 (5) Esvaziar e lavar com 8 mL de 1 mM HEPES (N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-Ácido Etanossulfônico) por 1 minuto, e repetir;

(6) Remover o chip do tubo, remover rapidamente o líquido, e secar com ar durante 10 minutos;

(7) Preparar solução EAM pela adição de 100  $\mu$ l de acetonitrila a 99,8% e 100  $\mu$ l de ácido trifluoroacético a 1,0% a um 25 frasco (10 mg) de pó de ácido sinapínico, e turbilhonar durante 5 minutos para dissolver o pó; e

(8) Adicionar 5  $\mu$ l de solução EAM a cada local (spot) e secar com ar durante 5 minutos, repetir, e secar com ar

por 10 minutos.

O procedimento pode ser modificado para uso com um bioprocessador que permita volumes maiores e adição automatizada de amostras e reagentes. Ambos os controles positivo e negativo são usualmente incluídos nos experimentos. Anticorpo e antígeno de TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose de Tumor Alfa) são incluídos no kit para este objetivo.

### 3. Geração de Impressões Digitais

O procedimento preferido para gerar impressões digitais de apolipoproteína para amostras de plasma e apolipoproteínas purificadas é descrito abaixo:

(1) O leitor e o software do arranjo PROTEINCHIP® (Ciphergen Biosystems, Inc.) são usados para gerar os perfis.

(2) Protocolos de local são gerados e usados para fazer os chips.

(3) Parâmetros de coleta de dados devem ser ajustados para cada antígeno e são baseados na massa molecular. As instruções estão incluídas no Kit de Captura de Anticorpo do arranjo PROTEINCHIP® suprido pela Ciphergen Biosystems, Inc.

(4) Os dados foram analisados e as impressões digitais de apolipoproteínas foram geradas, por exemplo, comparando os dados intrinsecamente com eles mesmos e comparando os dados extrinsecamente com normas, tais como, por exemplo, indivíduos de controle.

Alternativamente, esta invenção pode ser executada pelo acoplamento de anticorpos, fragmentos dos mesmos, ou moléculas imitadoras a contas, capturando as apolipoproteínas nas contas, eluindo proteínas purificadas das contas, e então

detectando por qualquer versão de espectrometria de massa, incluindo ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) e métodos de eletropulverização. Métodos para acoplamento de anticorpos a contas são bem conhecidos na técnica e estes métodos  
5 são adequados para a presente invenção. MALDI é um método de ionização suave baseado em laser no qual a amostra é embebida em uma matriz química que facilita grandemente a produção de íons de fase gasosa intactos de compostos grandes, não voláteis, e termicamente instáveis tais como proteínas, oligonucleotídeos,  
10 polímeros sintéticos, e grandes compostos inorgânicos. A matriz tem um papel chave nesta técnica pela absorção da energia de luz de laser e por fazer que uma pequena parte do substrato alvo vaporize.

A descrição detalhada a seguir das configurações  
15 preferidas e as figuras em anexo foram apresentadas apenas para objetivos ilustrativos e descritivos e não devem ser consideradas como exaustivas ou limitantes do escopo e espírito da invenção. As configurações foram selecionadas e descritas para melhor explicar os princípios da invenção e suas aplicações práticas. Alguém com  
20 especialização ordinária na técnica reconhecerá que muitas variações podem ser feitas à invenção revelada nesta especificação sem se afastar do escopo e espírito da invenção.

Novamente, embora a descrição provida acima inclua exemplos específicos de configurações atualmente previstas  
25 da presente invenção, estas possibilidades não devem ser entendidas como limitantes do escopo da presente invenção, mas ao invés disso, como ilustrações providas de algumas das configurações que são agora preferidas. Vários exemplos de

configurações alternativas são também descritos e várias outras alternativas, adaptações, e modificações podem ser feitas dentro do escopo da presente invenção. Meramente listar ou numerar as etapas ou blocos de um método, procedimento, ou experimento em

5 certa ordem não constitui qualquer limitação à ordem das etapas daquele método. Muitas modificações e outras configurações da invenção se tornarão evidentes para alguém com especialização na técnica a qual esta invenção pertence, em vista do benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições anteriores e nos desenhos

10 associados. Embora termos específicos possam ser empregados aqui, eles são usados apenas em um sentido genérico e descritivo, e não com o objetivo de limitação. Conseqüentemente, as reivindicações que são apresentadas a seguir e seus equivalentes legais, ao invés dos exemplos providos na especificação, devem determinar o escopo

15 da presente invenção.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para obter e relatar um perfil de pelo menos um biomarcador de apolipoproteína selecionado em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5                   a) prover a amostra biológica;
- b) tratar uma superfície com uma molécula de receptor de anticorpo;
- c) aplicar pelo menos um receptor de antígeno à superfície tratada para ligar-se com a molécula de receptor de anticorpo;
- 10                  d) aplicar a amostra biológica à superfície tratada para ligar-se com o pelo menos um biomarcador de apolipoproteína selecionado;
- e) remover componentes não ligados da amostra biológica;
- 15                  f) medir o pelo menos um biomarcador de apolipoproteína selecionado por meio da análise da amostra por espectrometria; e
- g) preparar o perfil usando a análise simultânea.

20                  2. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma doença pode ser diagnosticada.

                  3. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um biomarcador de apolipoproteína selecionado é selecionado do grupo consistindo de

25                  Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo AI1, Apo AIV, Apo AV, Apo B48, Apo B100, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, Apo H, Apo J, Apo L, Apo M, isoformas, modificações, mutações, e combinações das

mesmas.

4. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a análise de espectrometria é espectrometria de massa de tempo de voo de ionização/dessorção a laser.

5. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é selecionada do grupo consistindo de matrizes biológicas humanas, urina, plasma, soro, e frações de lipoproteínas humanas.

10 6. Método, de acordo com a Reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma doença é selecionada do grupo consistindo de diabetes, acidente vascular cerebral, estresse, Alzheimer, doenças cardiovasculares, distúrbios de lipídeo, síndrome metabólica, obesidade, inflamação, mal de Parkinson, distúrbios neurológicos, e aterosclerose.

15 7. Método, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda as etapas de adicionar pelo menos um outro receptor de antígeno à superfície tratada para ligar-se com a molécula de receptor de anticorpo; 20 adicionando pelo menos uma proteína de padrão interno para ligar-se com o pelo menos outro receptor de antígeno; medindo a proteína de padrão interno coincidentemente com a medição do pelo menos um biomarcador de apolipoproteína selecionado pela análise da amostra por espectrometria; e quantificando o pelo menos um biomarcador de 25 apolipoproteína selecionado pela comparação com o padrão interno.

8. Método para determinar a concentração de apolipoproteínas específicas em uma amostra biológica, a amostra sendo obtida de um paciente e a amostra incluindo plasma, soro, e

frações de lipoproteína, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) adicionar um volume específico de um padrão interno à amostra;

5 b) aplicar a amostra a um chip de superfície aumentada, revestido com Proteína G, ligado a anticorpo e remover componentes da amostra não ligados;

c) analisar a amostra por espectrometria de massa; e

10 d) determinar a concentração das apolipoproteínas usando valores de padrões internos.

9. Método, de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda as etapas de identificação de isoformas e das concentrações relativas das  
15 mesmas para gerar uma ferramenta de diagnóstico de perfil de isoforma, onde a ferramenta de diagnóstico de perfil de isoforma pode detectar câncer, câncer de próstata, diabetes, acidente vascular cerebral, estresse, Alzheimer, doenças cardiovasculares, distúrbios de lipídeo, síndrome metabólica, obesidade, mal de  
20 Parkinson, distúrbios neurológicos, inflamação e aterosclerose.

10. Método, de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que cada apolipoproteína analisada é ligada a um anticorpo específico no chip.

11. Método, de acordo com a Reivindicação 8,  
25 caracterizado pelo fato de que os anticorpos específicos são imobilizados na superfície revestida de proteína de captura de anticorpo do chip, e onde os anticorpos específicos são selecionados do grupo consistindo de fragmento de anticorpo,

imitador de anticorpo, anticorpo, e "aptimer".

12. Método, conforme reivindicado na Reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a amostra é aplicada e deixada se ligar com a superfície revestida de proteína de captura de anticorpo, e os componentes da amostra não ligados são eliminados.

13. Método, de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a espectrometria de massa é espectrometria de massa de tempo de voo de ionização/dessorção a laser.

14. Método, de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as apolipoproteínas são selecionadas do grupo consistindo de Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo AII, Apo AIV, Apo AV, Apo B48, Apo B100, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, Apo H, Apo J, Apo L e Apo M e os anticorpos ligados ao chip são selecionados do grupo consistindo de anticorpos para Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo AII, Apo AIV, Apo AV, Apo B48, Apo B100, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, Apo H, Apo J, Apo L e Apo M.

15. Método, de acordo com a Reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a amostra é selecionada do grupo consistindo de urina, fluído corporal, plasma, soro humanos, e frações de lipoproteína humana.

16. Método, de acordo com a Reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma proteína de padrão interno é desenvolvida pela modificação de pelo menos uma proteína purificada selecionada, onde um valor de referência é definido para pelo menos cada uma das proteínas de padrão interno, usando

espectrometria de massa de alta resolução, e onde o valor de concentração para pelo menos cada um dos biomarcadores de apolipoproteína selecionados identificado na amostra biológica é baseado em padrões internos desenvolvidos pela modificação das proteínas purificadas selecionadas e definindo valores de referência, portanto usando espectrometria de massa de alta resolução.

17. Método, de acordo com a Reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as modificações são selecionadas do grupo consistindo de glicação, sialilação, fragmentação, substituição de aminoácido, variantes alélicas, variantes de fatia, formas de edição de RNA, modificações pré-translação, modificações pós-translação, truncação, clivagem proteolítica, glicosilação, lipidação, cisteinilação, glutationilação, fosforilação, prenilação, acilação, acetilação, metilação, sulfatação, sulfonação, hidroxilação, miristoilação, farnesilação, oxidação e ubiquitinação.

18. Método para uso na avaliação de fatores de risco, situação da doença, tratamento com medicamento e resposta no campo de farmacogenética, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) coleta de um primeiro espécime biológico de um indivíduo humano;

b) geração de uma primeira impressão digital de apolipoproteína para o espécime biológico, a referida impressão digital de apolipoproteína compreendendo dados sobre a presença e ausência de diversas apolipoproteínas direcionadas, sobre as características e diferenças estruturais entre isoformas das

referidas diversas apolipoproteínas direcionadas, e sobre a concentração das referidas diversas apolipoproteínas direcionadas;

5 c) comparação dos referidos primeiros dados de impressão digital de apolipoproteína com dados de fator de risco relatados para avaliação de fatores de risco, ou com dados do estado da doença relatado para avaliar o estado ou situação da doença;

d) coletar um segundo espécime biológico do mesmo indivíduo humano;

10 e) gerar uma segunda impressão digital de apolipoproteína; e

f) comparar os referidos dados de impressão digital de apolipoproteína com os referidos primeiros dados de impressão digital de apolipoproteína para avaliar o tratamento e  
15 resposta a medicamento, onde o referido segundo espécime biológico é coletado após tratamento com medicamento.

19. Método, de acordo com a Reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o tratamento com medicamento avaliado é um medicamento para diminuição de lipídeo, e onde  
20 parâmetros compreendendo níveis e distribuição de apolipoproteínas e suas isoformas podem ser monitorados com relação à alteração.

20. Método para obter um perfil de diversos biomarcadores de apolipoproteína selecionados em uma amostra biológica de um indivíduo, caracterizado pelo fato de que  
25 compreende as etapas de:

a) prover a amostra biológica de um indivíduo;

b) aplicar a amostra biológica à superfície de um reagente de captura que especificamente capture os diversos

biomarcadores de apolipoproteína selecionados, permitindo que os diversos biomarcadores de apolipoproteína selecionados se ligue ao reagente de captura, e removendo componentes de amostra não ligados;

5 c) analisar os diversos biomarcadores de apolipoproteína capturados selecionados por espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser; e

d) preparar o perfil usando os resultados de análise, onde os diversos biomarcadores de apolipoproteína são  
 10 selecionados de um grupo consistindo de Apo CI, Apo CII, Apo CIII, Apo CIV, Apo AI, Apo AI1, Apo AI4, Apo AV, Apo B48, Apo B100, Apo D, Apo E, Apo F, Apo G, Apo H, Apo J, Apo L, Apo M, isoformas das mesmas, e combinações das mesmas.

21. Método, de acordo com a Reivindicação 20,  
 15 caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de usar o perfil para diagnosticar uma doença no indivíduo, onde a doença é selecionada do grupo consistindo de câncer, diabetes, acidente vascular cerebral, estresse, mal de Alzheimer, doença cardiovascular, inflamação, mal de Parkinson, distúrbios  
 20 neurológicos, distúrbios de lipídio, síndrome metabólica, e aterosclerose.

22. Ensaio para individualização, diferenciação e quantificação relativa de uma mistura compreendendo isoformas de apolipoproteína, caracterizado pelo fato de que compreende as  
 25 etapas de:

a) preparar uma superfície com uma molécula reativa a anticorpo;

b) aplicar diversos anticorpos de apolipoproteína

à referida superfície para ligação com a referida molécula reativa a anticorpo;

c) aplicar uma mistura de isoformas de apolipoproteína para ligação com os referidos diversos anticorpos de apolipoproteína, onde a referida mistura de isoformas de apolipoproteína pode ser não purificada e os diversos anticorpos de apolipoproteína pode ser qualquer fragmento molecular adaptado para ligação como um anticorpo de apolipoproteína.

d) gerar um perfil de isoforma fenotípico da referida mistura de isoformas de apolipoproteína; e

e) utilizar o referido perfil de isoforma fenotípico para identificação da situação de um paciente em relação a uma doença ou condição, para identificação de um processo fisiológico comprometido, ou para definição de um ou mais biomarcadores ou perfis de apolipoproteína específicos à doença.

23. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os referidos diversos anticorpos de apolipoproteína é anticorpos da isoforma CIII, onde a identificação de altos níveis de CIII-0 no referido perfil está correlacionada com HbA1C elevado, e onde a identificação de uma proporção aumentada de CIII como as isoformas CIII-2 é o referido perfil em VLDL relacionado com hipertrigliceridemia, com uma correlação inversa de CIII-1.

24. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a referida apolipoproteína cujo perfil foi efetuado e situação da doença ou condição relevante identificada compreende Apo D para mal de Alzheimer, Apo B para doença cardiovascular.

25. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a situação da doença identificada pelo referido perfil de isoforma fenotípico compreende doença cardiovascular, acidente vascular cerebral, síndrome metabólica, diabe-  
5 te, Alzheimer, HIV e pacientes de HIV sob inibidores de protease (hipertrigliceridêmico), e vários tipos de lipoproteinemia.

26. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a situação da apolipoproteína é  
10 avaliada em recém-nascidos.

27. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que os referidos perfis de isoforma fenotípicos provêm dados para avaliar modificações na apolipoproteína que ocorrem com envelhecimento, nutrição,  
15 exposição ambiental e alterações no estilo de vida.

28. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que as referidas apolipoproteínas cujos perfis foram executados e o processo fisiológico relevante comprometido identificado compreende Apo J para maturação de  
20 esperma, Apo J para transporte de lipídeo, Apo J para inibição de complemento, Apo J para remodelação de tecido, Apo J para reciclagem de membrana, Apo J para interações célula-célula e célula-substrato, Apo J para estabilização de proteínas estressadas em um estado competente a dobra, Apo J para promoção  
25 ou inibição de apoptose, Apo H para coagulação do sangue, Apo H para atividade de protrombinase de plaquetas ativadas, Apo F para atividade de proteína de transferência de colesterol éster (CETP), Apo F para regulação de transporte de colesterol, e Apo M para

transporte de lipídeo.

29. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que um padrão interno é ligado, detectado, e medido com a referida mistura de isoformas de apolipoproteína, onde o referido padrão interno é uma proteína conhecida com propriedades de ligação de anticorpo muito similares àquelas das apolipoproteínas de interesse, mas com uma massa molecular visivelmente diferente.

30. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a separação, concentração e detecção das referidas isoformas de apolipoproteína é obtida em um biochip.

31. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o referido biochip é submetido a ionização de laser, a intensidade de um sinal é detectada para proporção de massa/carga, os dados resultantes são transformados em uma forma legível por computador, e um algoritmo é executado que classifica os referidos dados de acordo com diversos grupos de parâmetro de entrada de usuário para detectar sinais que representam biomarcadores presentes em pacientes doentes e que estão ausentes em controles de indivíduos saudáveis.

32. Ensaio, de acordo com a Reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que os referidos grupos de parâmetro são selecionados de grupos consistindo de patológico contra não-patológico, resposta a medicamento contra não-resposta a medicamento, resposta tóxica contra resposta não-tóxica, progressão do estado da doença contra não progressão do estado da doença, ou condição fenotípica presente contra condição fenotípica ausente.

TABELA 1. Peso molecular calculado e medido de ApoC-III

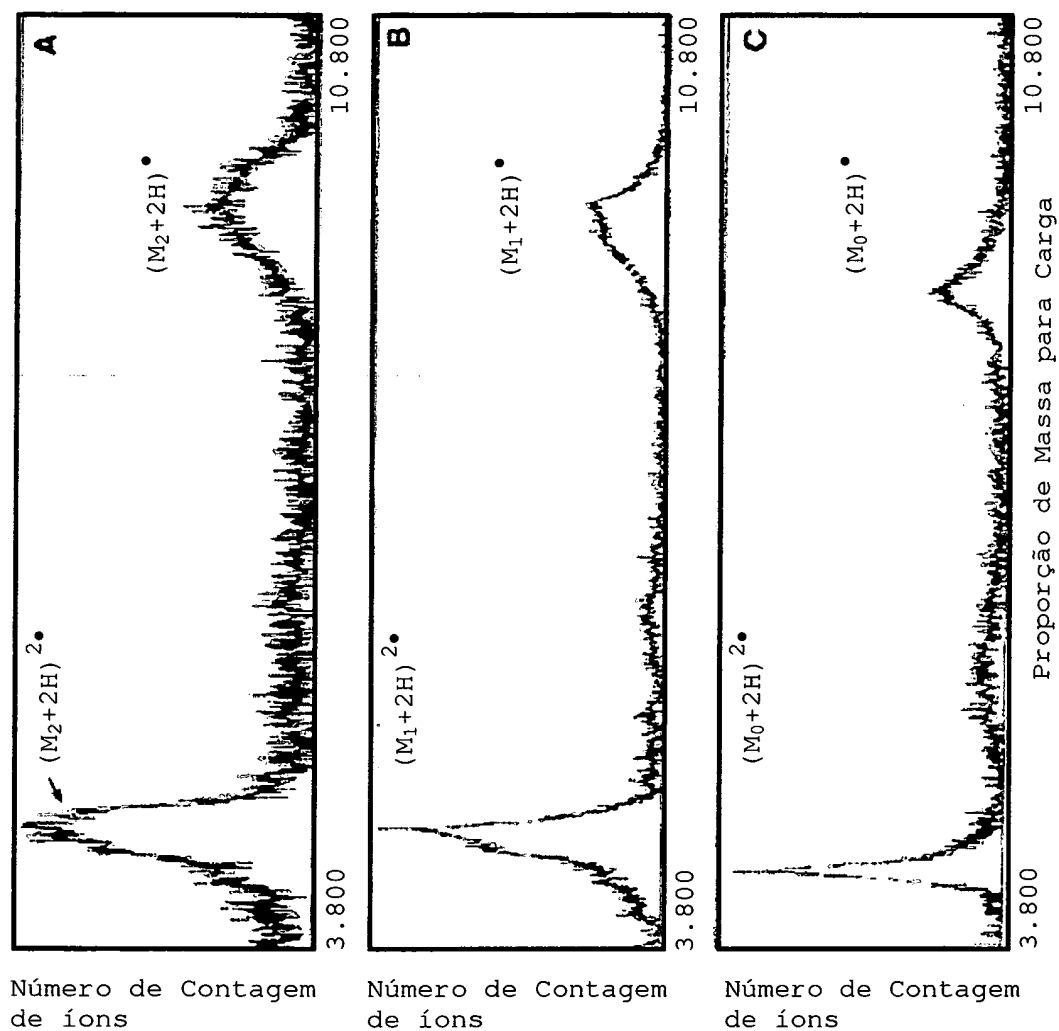
| M <sub>r</sub> <sup>a</sup> Calculado | M <sub>r</sub> <sup>b</sup> Medido |              |              |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
|                                       | Indivíduo 1                        | Indivíduo 2  | Indivíduo 3  |
| ApoC-III <sub>0</sub> 8764.2          | 8763.9(-0.3)                       | 8764.9(+0.7) | 8765.5(+1.3) |
| ApoC-III <sub>1</sub> 9420.8          | 9420.6(-0.2)                       | 9420.0(-0.8) | 9422.2(+1.4) |
| ApoC-III <sub>3</sub> 9712.1          | ≥9700.2(-11.9)                     |              |              |

Figura 1A

Ito Y. Breslow JL, Chait BT, Apolipoprotein C-III0 lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure. J. Lipid Res. 1989 Nov; 30(11): 1781-7.

Figura 1B

Espectros de Massa Relacionados das Isoformas CIII diferentes



Ito Y. Breslow JL, Chait BT, Apolipoprotein C-III0 lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure. J. Lipid Res. 1989 Nov; 30(11): 1781-7.

Figura 2

Chips Ciphergen Q10 de Perfil de Apolipoproteína CIII (Isoformas CIII-0, CIII-1, CIII-2) agrupado

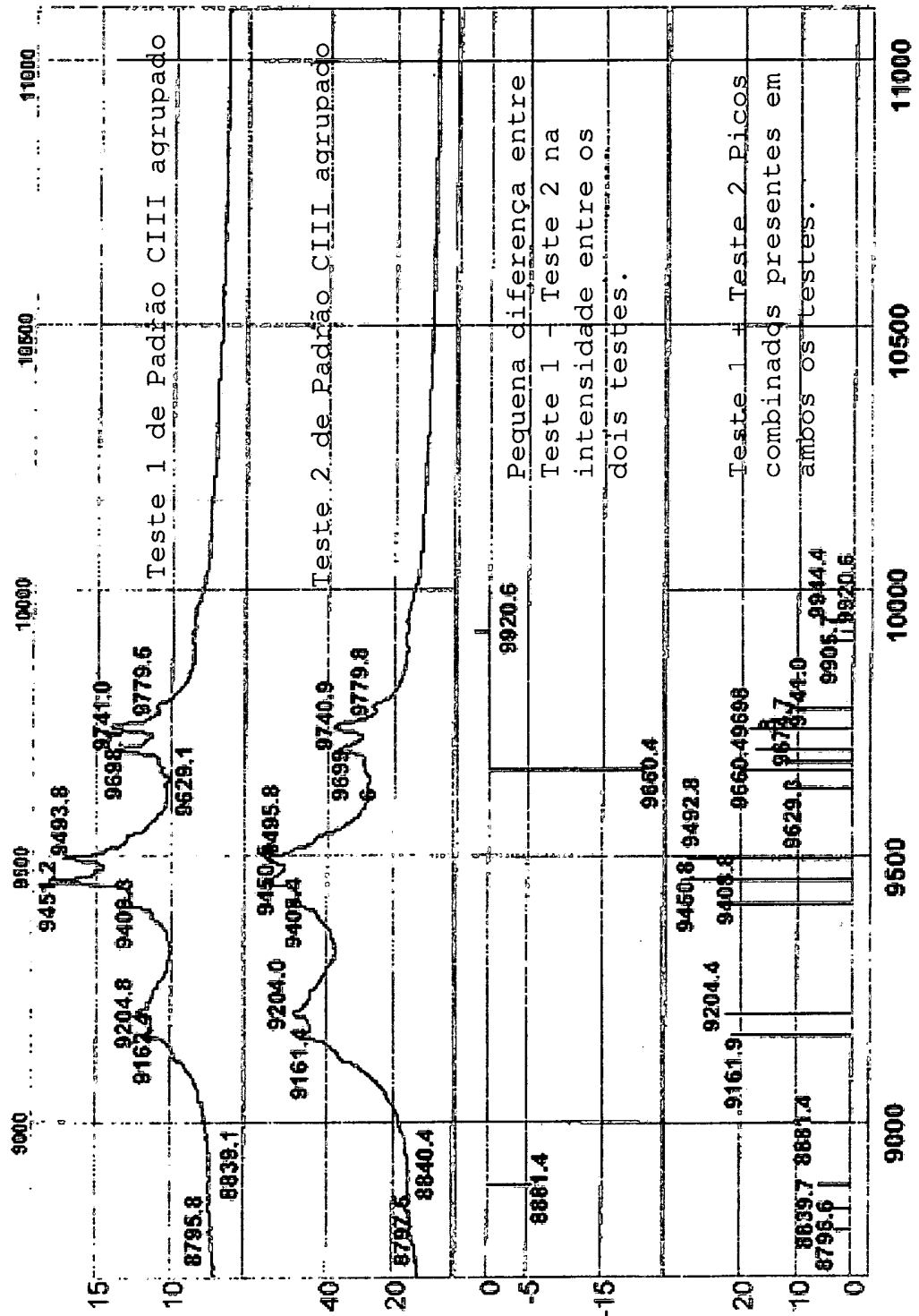


Figura 3

Chips Ciphergen CM10 de Perfil de Apolipoproteína CIII (Isoformas CIII-0, CIII-1, CIII-2) agrupado

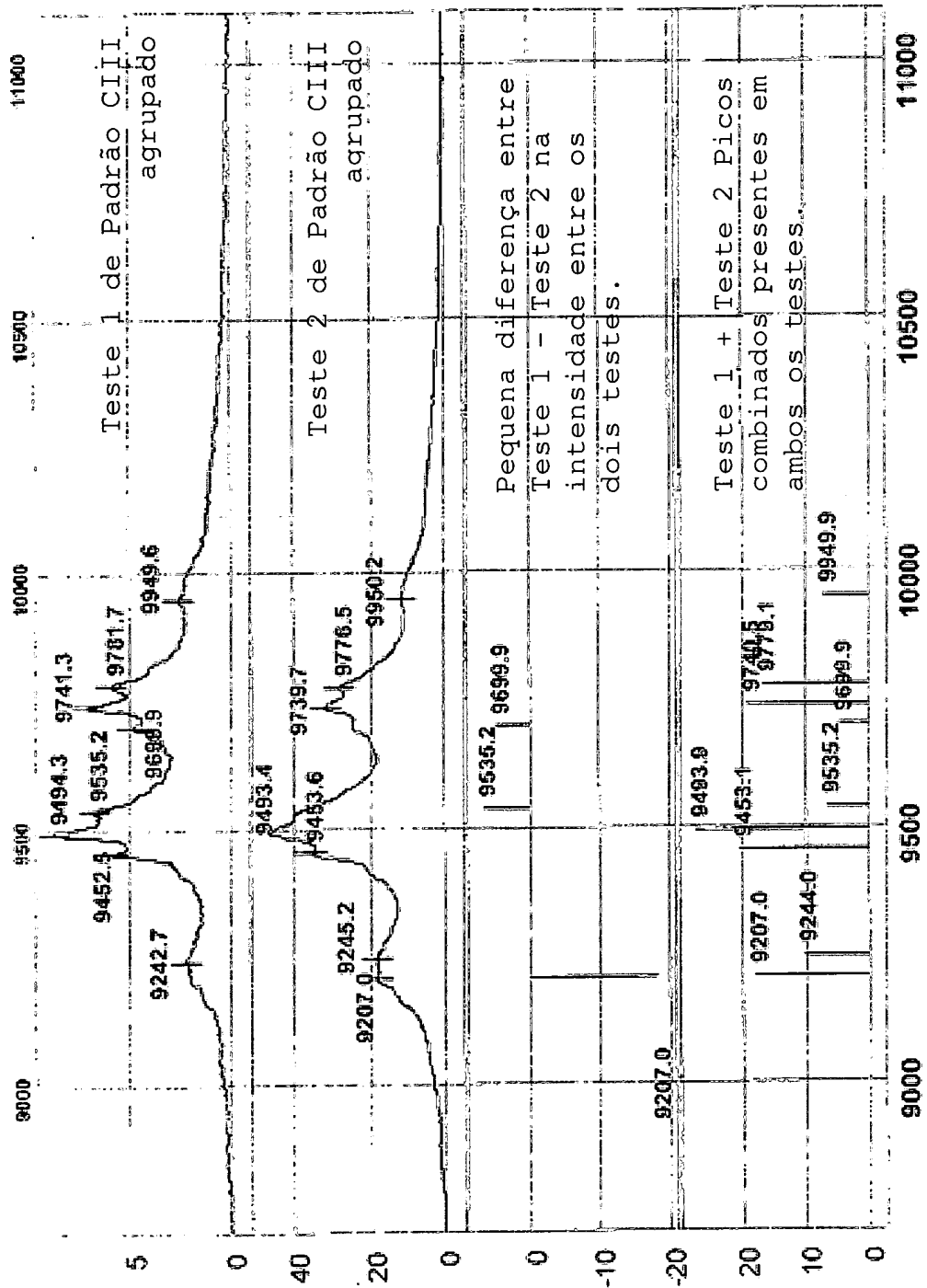


Figura 4A

Chip 1 PG 20 Anti-CIII Ciphergen de Reprodutibilidade de Isoformas  
CIII de Apolipoproteína

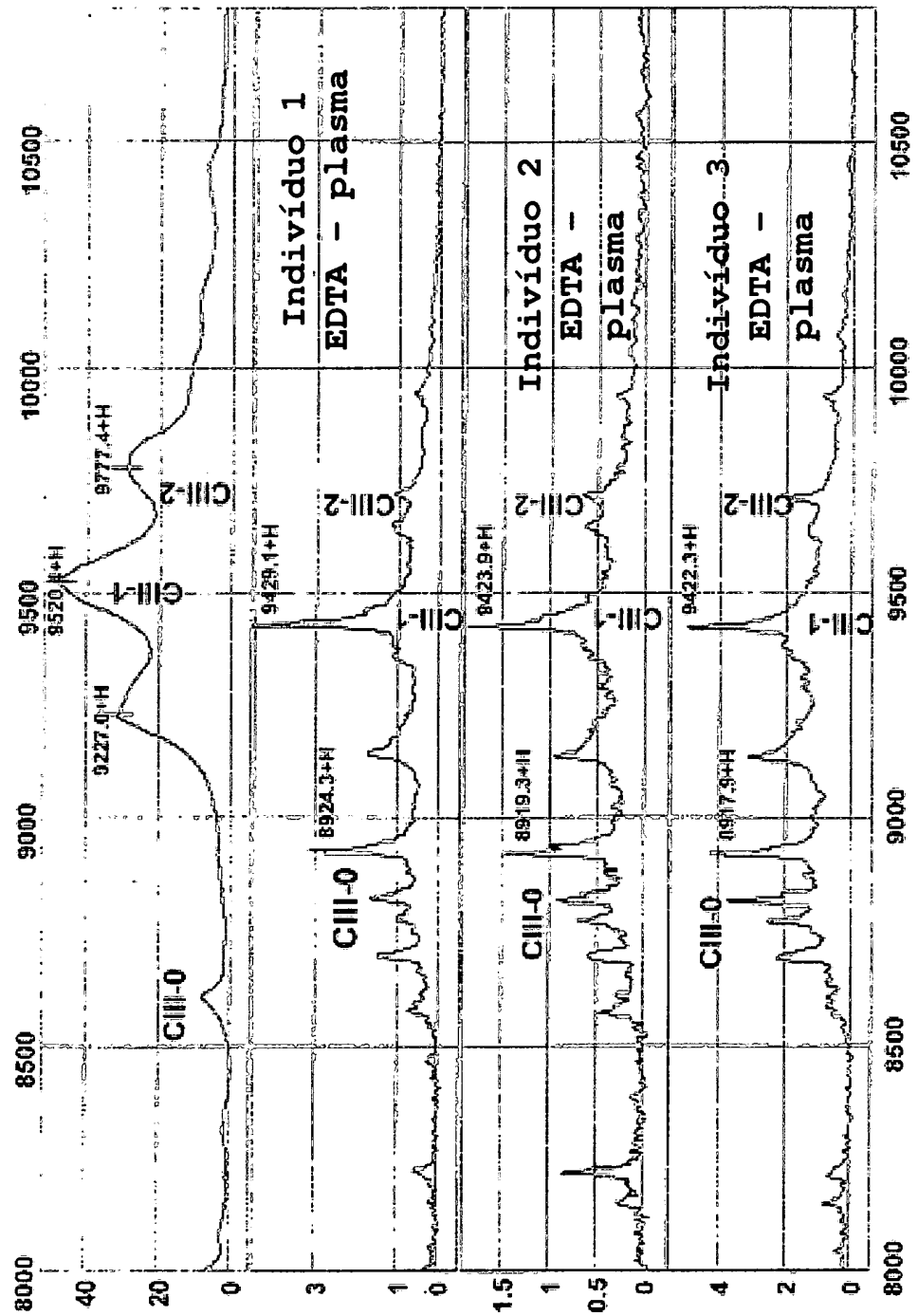
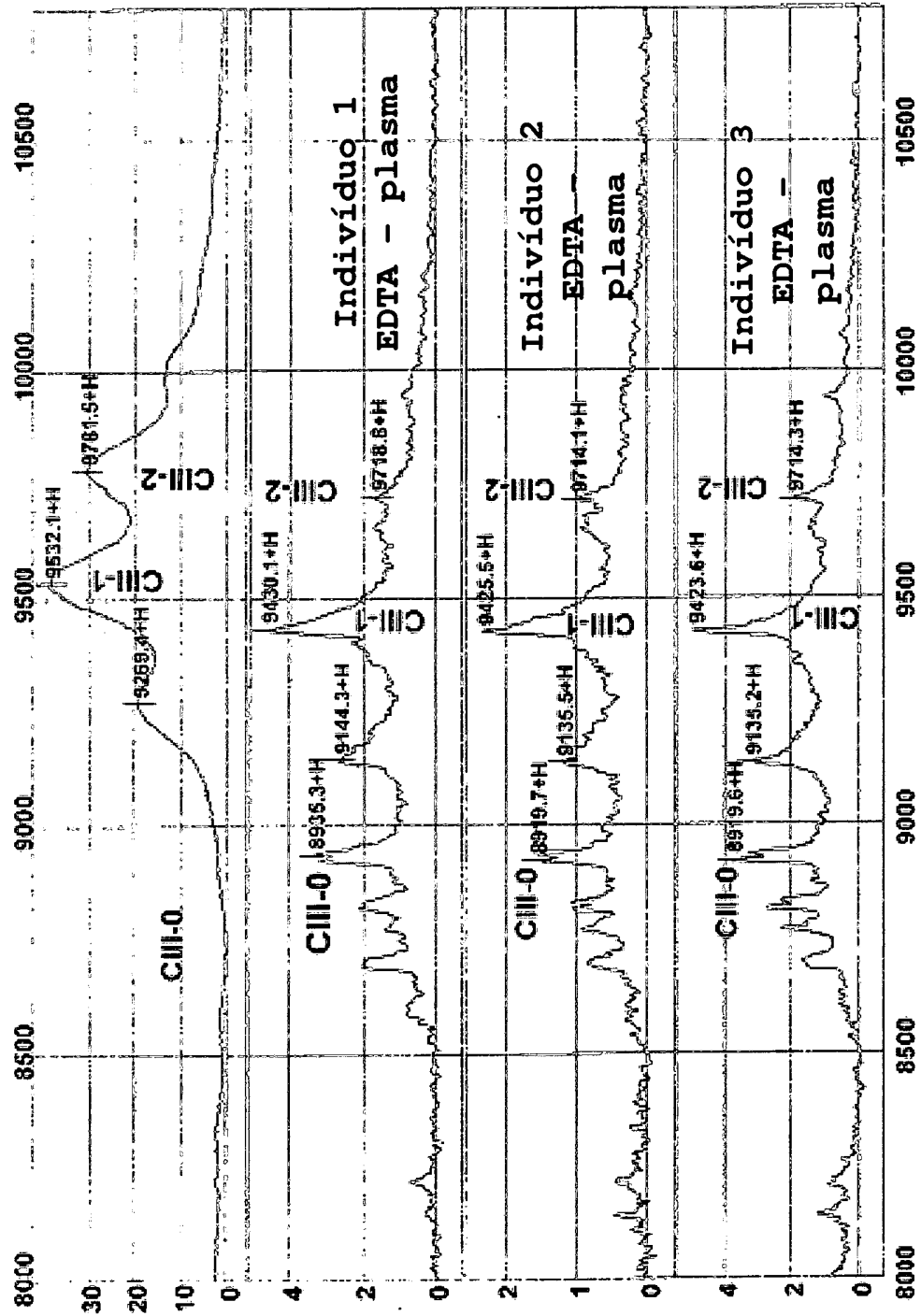


Figura 4B

Chip 2 PG 20 Anti-CIII Ciphergen de Reprodutibilidade de Isoformas  
CIII de Apolipoproteína



Chip PS 20 Anti-CIII Ciphergen de Reprodutibilidade de Isoformas  
CIII de Apolipoproteína

Chip 1

Chip 2

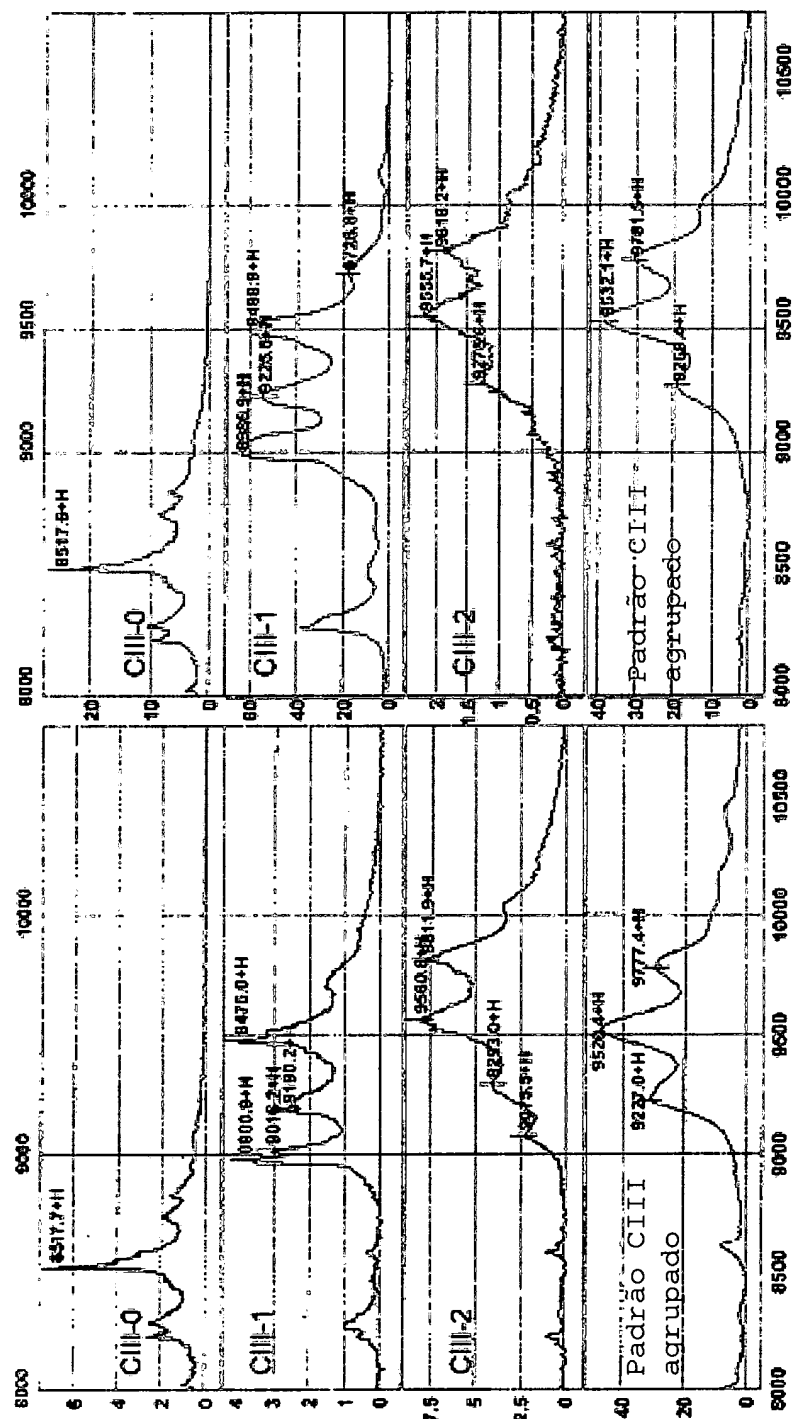
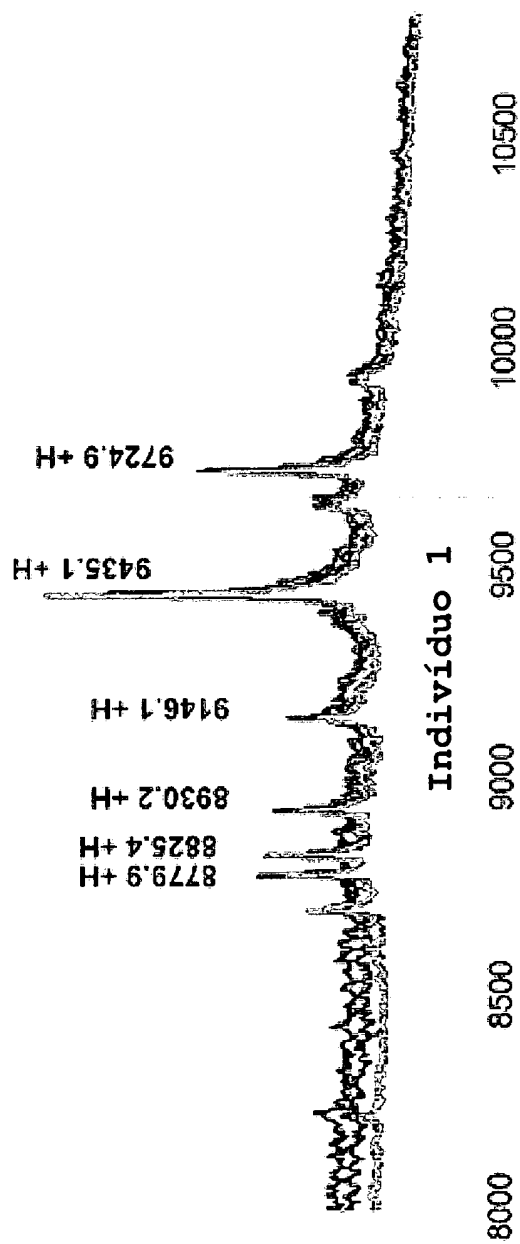


Figura 5

Figura 6

## Reprodutibilidade de Perfil de Isoforma CIII no Plasma

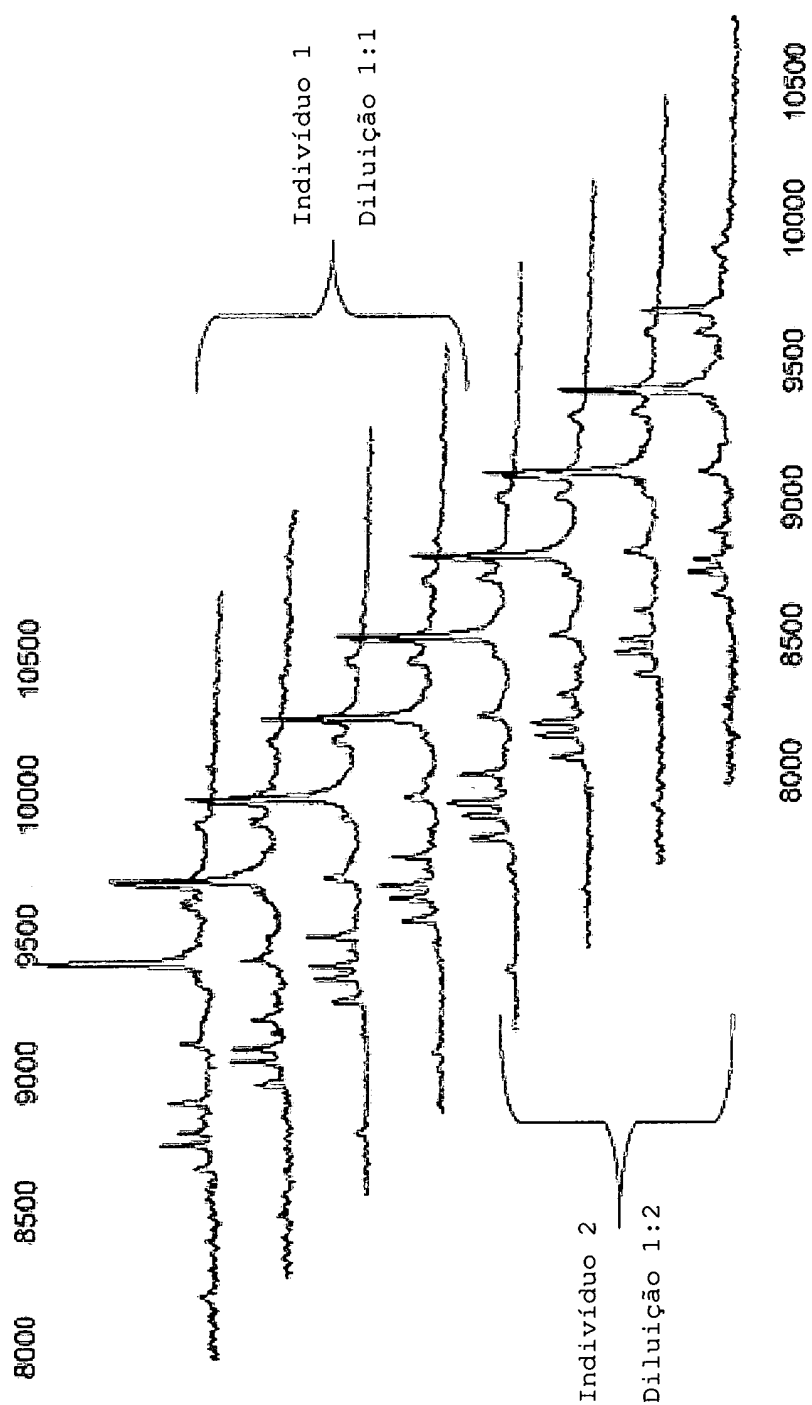


Perfis sobrepostos de plasma quadruplicado (dilução de 1:2) do indivíduo 1 (N = 4) usando chip PS-20 e anticorpo CIII. Rótulos de pico são valores médios de todas as quatro execuções. Nenhuma calibração de peso molecular foi executada no chip.

| Isoformas CIII | Peso molecular estimado |
|----------------|-------------------------|
| CII -0         | 8764.2                  |
| CII -1         | 9420.8                  |
| CII -2         | 9712.1                  |

Figura 7

Perfil de Isoforma CIII no Plasma em Diferentes Diluições de Plasma



Perfil de Isoforma CIII no Plasma em Diferentes Diluições de Plasma

| Teste            | CIII-0 pk1    | CIII-0 pk2    | CIII-0 pk3    | CIII-0 pk4    | CIII-1        | CIII-2        |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Chip1            | 8780.7        | 8826.3        | 8931.1        | 9146.3        | 9436.4        | 9726.1        |
| Chip2            | 8780.6        | 8826.3        | 8931.3        | 9147.7        | 9435.9        | 9725.8        |
| Chip3            | 8779.7        | 8825.1        | 8929.7        | 9145.3        | 9434.8        | 9724.9        |
| Chip4            | 8778.8        | 8823.9        | 8928.7        | 9145.2        | 9433.4        | 9723.0        |
| <b>Média</b>     | <b>8780.0</b> | <b>8825.4</b> | <b>8930.2</b> | <b>9146.1</b> | <b>9435.1</b> | <b>9725.0</b> |
| Desvio<br>Padrão | 0.889         | 1.149         | 1.227         | 1.162         | 1.330         | 1.396         |
| <b>Esperado</b>  | <b>8764.4</b> |               |               |               | <b>9420</b>   | <b>97112</b>  |

Figura 8

Figura 9

Comparação de Perfil de Isoformas CIII de Apolipoproteína de Indivíduos Normais e Diabéticos com Chips CIPHERGEN Anti-CIII PS 20

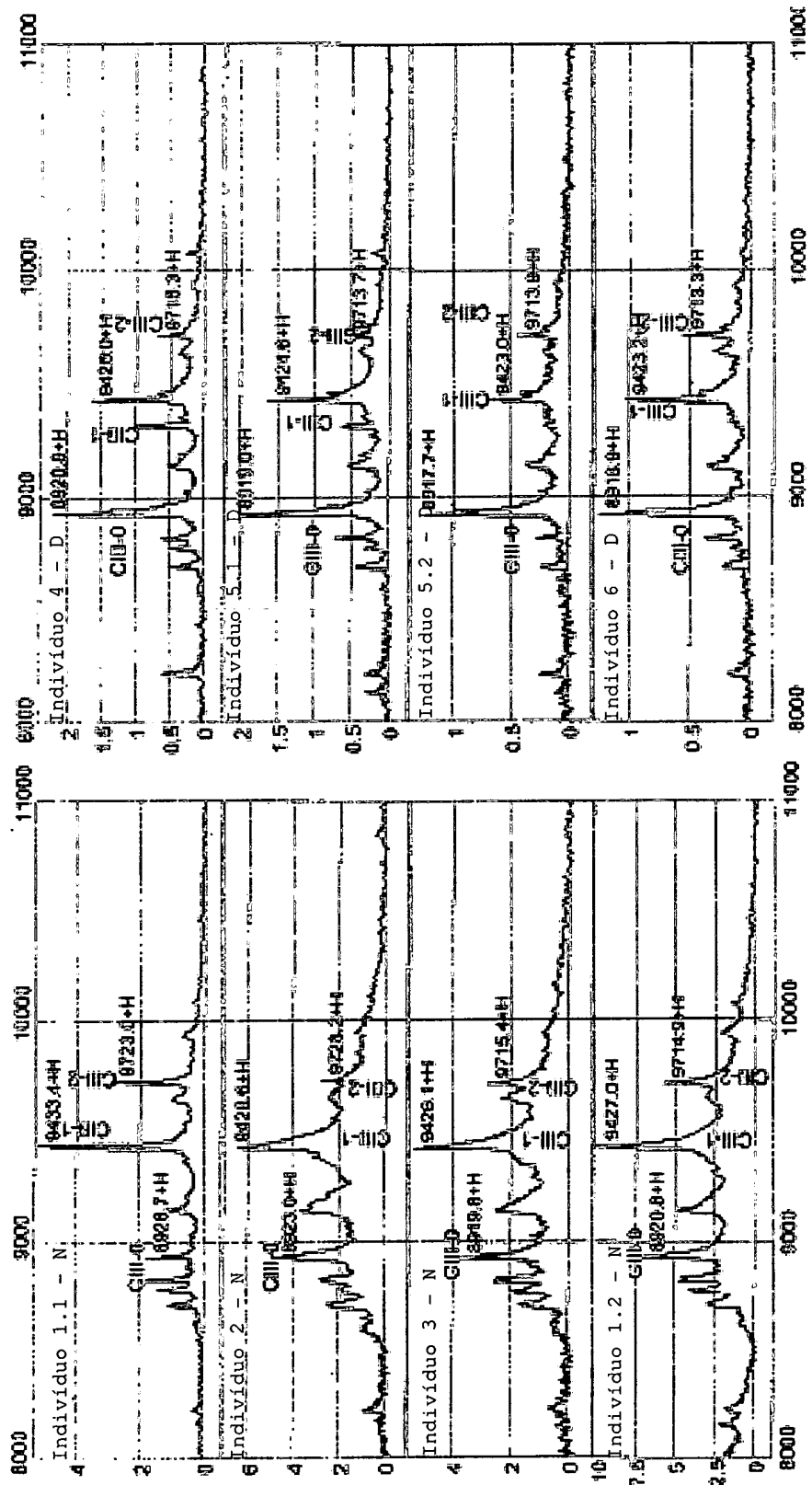
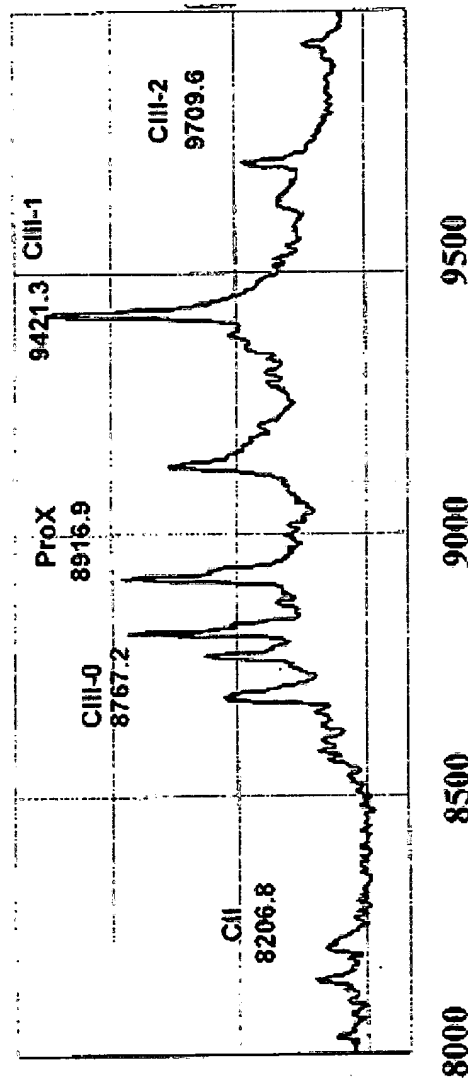


Figura 10

Comparação de Perfil de Apolipoproteína C

NORMAL



DIABÉTICO

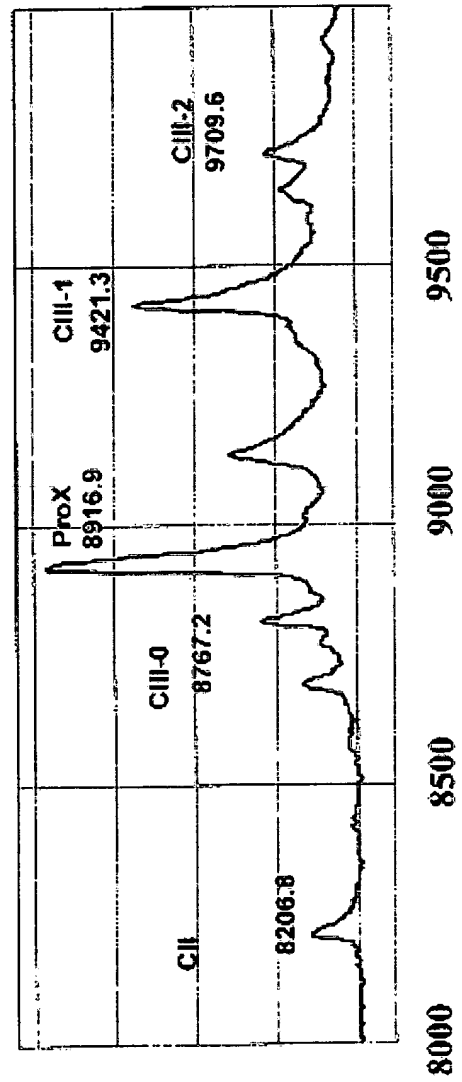
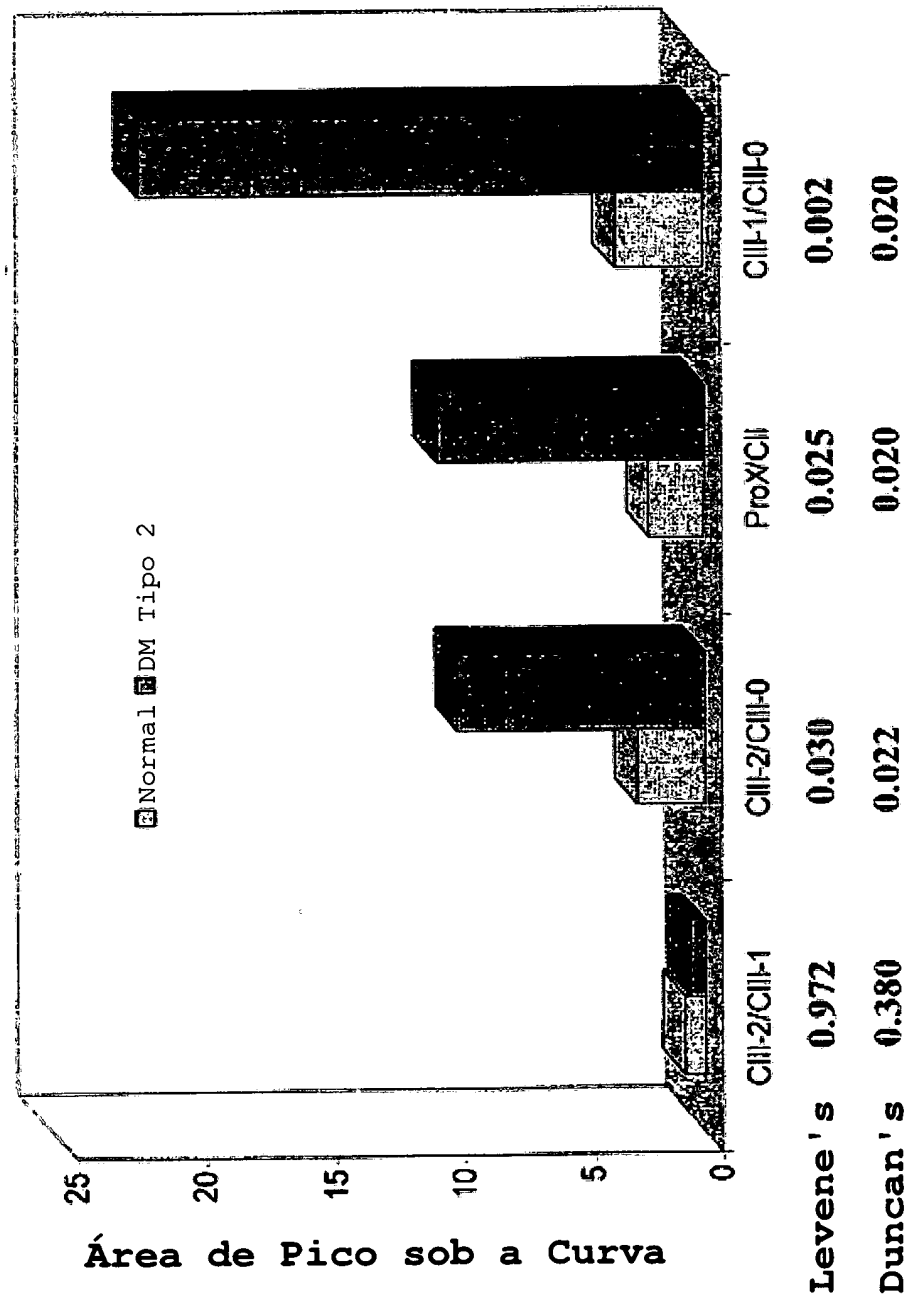
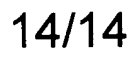


Figura 11

**Distribuição de Apolipoproteína C em  
plasma integral entre Indivíduos Normais e  
Diabéticos**



### Perfis de Isoforma de Apolipoproteína (A, B... M)

Figura 12

## RESUMO

### "TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE IMPRESSÃO DIGITAL DE APOLIPOPROTEÍNA E MÉTODOS RELACIONADOS À MESMA"

Método para determinar a concentração e

5 modificações de apolipoproteína em amostras biológicas incluindo plasma, soro, e frações de lipoproteína, pela obtenção de uma amostra de um paciente, adicionando um volume específico de um padrão interno à amostra, aplicação da amostra a um chip de superfície melhorada, revestido com Proteína G, ligado a

10 anticorpo, e remoção de componentes da amostra não ligados, análise da amostra por espectrometria de massa, determinação da concentração da apolipoproteína usando valores de padrões internos, e avaliando a concentração da apolipoproteína, suas isoformas, substituições e modificações de aminoácido para uso

15 como uma ferramenta para diagnosticar câncer, diabete, acidente vascular cerebral, estresse, mal de Alzheimer, inflamação, doença neurológica e doenças cardiovasculares.