



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0820876-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 02/12/2008**

**(45) Data de Concessão: 06/10/2020**

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESTRONA EM UMA AMOSTRA DE FLUIDO CORPORAL

**(51) Int.Cl.:** C12Q 1/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 13/12/2007 US 12/002,314.

**(73) Titular(es):** QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS INCORPORATED.

**(72) Inventor(es):** MILDRED M. GOLDMAN; NIGEL J. CLARKE; RICHARD E. REITZ.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2008085282 de 02/12/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/076106 de 18/06/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/06/2010

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESTRONA EM UMA AMOSTRA DE FLUIDO CORPORAL. A presente invenção refere-se a métodos para determinação da quantidade de estrona em uma amostra usando espectrometria de massa. Os métodos geralmente envolvem ionização de estrona em uma amostra e detecção e quantificação da quantidade do íon para determinar a quantidade de estrona na amostra.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESTRONA EM UMA AMOSTRA DE FLUIDO CORPORAL**".

**CAMPO DA INVENÇÃO**

5 A presente invenção refere-se à detecção de estrona. Em um aspecto particular, a invenção refere-se a métodos para detecção de estrona através de espectrometria de massa.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

10 O relatório que segue dos antecedentes da invenção é provido simplesmente como um auxílio na compreensão da invenção e não pretende descrever ou constituir técnica anterior à invenção.

Estrona [1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-ona ou 3-Hidróxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona] ou E1 é um hormônio esteroide C18 com um peso molecular de 270,37 dáltons. A estrona é produzida principalmente a partir de androestenodiona se originando das gônadas ou do córtex adrenal. A estrona (E1) é um dos três estrógenos de ocorrência natural, os outros sendo estradiol e estriol, que são naturais do corpo humano. Sua fórmula molecular é  $C_{18}H_{22}O_2$ . Os estrogênios são principalmente responsáveis pelo desenvolvimento de características femininas na puberdade e regulação do ciclo menstrual. A estrona pode ser medida em mulheres que entraram na menopausa para determinar seus níveis de estrogênio. Ela pode ser também medida em homens ou mulheres que teriam câncer de ovário, testículos ou glândulas adrenais. Em mulheres na pré-menopausa, os níveis de estrona geralmente estão em paralelo com aqueles de estradiol. Depois os níveis de estrona na menopausa aumentam, possivelmente devido à conversão alta de androestenodiona em estrona.

Métodos para detecção de íons de estrona específicos usando espectrometria de massa foram descritos. Por exemplo, Nelson, R, e outros, Clinical Chem. 2004, 50(2):373-84, e Xu, X, e outros, Nature Protocols 2007, 2(6):1350-1355 descrevem métodos para detecção de vários íons de estrona usando cromatografia líquida e espectrometria de massa. Esses métodos derivatizam estrona antes da detecção através de espectrometria de massa.

Métodos para detectar estrona não-derivatizada através de cromatografia líquida/espectrometria de massa são discutidos em Diaz-Cruz, S, e outros, J. Mass Spectrom. 2003, 38:917-923 e Nelson, R, e outros, Clinical Chem. 2004, 50(2):373-84. Métodos para detectar estrona através de cromatografia  
5 de gás/espectrometria de massa são descritos em Nachtigall, L, e outros, Menopause: J. of N. Amer. Menopause Society 2000, 7(4):243-250 e Dorgan, J, e outros, Steroids 2002, 67:151-158.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção provê métodos para detecção da  
10 quantidade de estrona em uma amostra através de espectrometria de massa, incluindo espectrometria de massa em tandem.

Em um aspecto, são providos métodos para determinação da quantidade de estrona em uma amostra de fluido corporal. Os métodos podem incluir: (a) purificação de estrona na amostra de fluido corporal  
15 através de cromatografia líquida; (b) ionização da estrona na amostra de fluido corporal; e (c) detecção da quantidade de íon(s) de estrona através de espectrometria de massa e relação da quantidade dos íon(s) de estrona detectada com a quantidade de estrona na amostra de fluido corporal. Em certas modalidades preferidas deste aspecto, o limite de quantificação dos  
20 métodos é menos do que ou igual a 500 pg/ml. Em outras modalidades preferidas, a estrona não é derivatizada antes da espectrometria de massa. Em certas modalidades preferidas, os íons de estrona são selecionados de um grupo de íons com uma razão de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$ ,  $145,03 \pm 0,5$  e  $143,02 \pm 0,5$ . Em algumas modalidades preferidas, os métodos  
25 incluem geração de um ou mais íons precursores de estrona onde pelo menos um dos íons precursores tem uma razão de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$ . Em modalidades preferidas relacionadas, os métodos podem incluir geração de um ou mais íons fragmentos de um íon precursor de estrona onde pelo menos um dos íons fragmentos tem uma razão de massa/carga  
30 de  $145,03 \pm 0,5$  ou  $143,02 \pm 0,5$ . Em algumas modalidades preferidas, o método pode incluir adição de um agente à amostra de fluido corporal em uma quantidade suficiente para liberar a estrona de uma proteína que

poderia estar presente na amostra de fluido corporal. Em modalidades preferidas relacionadas, os métodos podem incluir acidificação da amostra de fluido corporal; preferivelmente acidificação antes de ionização; mais preferivelmente acidificação antes da purificação; preferivelmente acidificação com ácido fórmico. Em modalidades particularmente preferidas, a amostra de fluido corporal é soro, plasma ou urina.

Conforme aqui usado, a menos que de outro modo declarado, as formas singulares “um”, “uma” e “o”, “a” incluem referência no plural. Então, por exemplo, uma referência a “uma proteína” inclui uma pluralidade de moléculas de proteína.

Conforme aqui usado, o termo “purificação” ou “purificando” não refere-se à remoção de todos os materiais da amostra outros que não o(s) analito(s) de interesse. Ao contrário, purificação refere-se a um procedimento que enriquece a quantidade de um ou mais analitos de interesse com relação a outros componentes na amostra que possam interferir com detecção do analito de interesse. As amostras são purificadas aqui através de vários meios para permitir remoção de uma ou mais substâncias de interferência, por exemplo, uma ou mais substâncias que interfeririam com a detecção de íons pais e filhos de estrona através de espectrometria de massa.

Conforme aqui usado, o termo “amostra de teste” refere-se a qualquer amostra que possa conter estrona. Conforme aqui usado, o termo “fluido corporal” significa qualquer fluido que possa ser isolado do corpo de um indivíduo. Por exemplo, “fluido corporal” pode incluir sangue, plasma, soro, bile, saliva, urina, lágrimas, perspiração e similar.

Conforme aqui usado, o termo “derivatização” significa reação de duas moléculas para formar uma nova molécula. Agentes de derivatização podem incluir grupos isotiocianato, grupos dinitro-fluorfenila, grupos nitrofenoxicarbonila e/ou grupos ftalaldeído, e similar.

Conforme aqui usado, o termo “cromatografia” refere-se a um processo onde uma mistura química realizada através de um líquido ou gás é separada em componentes como resultado de distribuição diferencial das

entidades químicas conforme elas fluem em torno ou acima de uma fase líquida ou sólida estacionária.

Conforme aqui usado, o termo “cromatografia líquida” ou “LC” significa um processo de retardo seletivo de um ou mais componentes de uma solução fluida conforme o fluido infiltra através de uma coluna de uma substância finamente dividida ou através de passagens capilares. O retardo resulta da distribuição dos componentes da mistura entre uma ou mais fases estacionárias e o fluido bruto (isto é, fase móvel), conforme o fluido se move com relação à(s) fase(s) estacionária(s). “Cromatografia líquida” inclui, por exemplo, cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) (Reverse Phase Liquid Chromatography), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (High Performance Liquid Chromatography) e cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC) (High Turbulence Liquid Chromatography).

Conforme aqui usado, o termo “cromatografia líquida de alto desempenho” ou “HPLC” refere-se à cromatografia líquida onde o grau de separação é aumentando forçando a fase móvel sob pressão através de uma fase estacionária, tipicamente uma coluna densamente comprimida.

Conforme aqui usado, o termo “cromatografia líquida de alta turbulência” ou “HTLC” refere-se a uma forma de cromatografia que utiliza fluxo turbulento do material sendo ensaiado através do revestimento da coluna como a base para realização da separação. HTLC foi aplicada na preparação de amostras contendo dois fármacos sem nome antes da análise através de espectrometria de massa. Vide, por exemplo, Zimmer e outros, J. Chromatogr. A 854:23-35 (1999); vide também Patentes U.S. Nos. 5.968.367, 5.919.368, 5.795.469 e 5.772.874, que explicam ainda HTLC. Pessoas de habilidade comum na técnica compreendem “fluxo turbulento”. Quando o fluido flui lentamente e suavemente, o fluxo é chamado “fluxo laminar”. Por exemplo, o fluido que se move através de uma coluna de HPLC em taxas de fluxo baixas é laminar. Em fluxo laminar o movimento das partículas de fluido é ordenadamente com partículas se movendo geralmente em linhas retas. Em velocidades mais rápidas, a inércia da água supera as forças friccionais do fluido e fluxo turbulento resulta. Fluido não

em contato com o limite irregular “ultrapassa” aquele que é deixado mais lento através de fricção ou defletido por uma superfície desigual. Quando um fluido está fluindo turbulentamente, ele flui em turbilhão e redemoinhos (ou vórtices), com mais “arraste” do que quando o fluxo é laminar. Muitas referências estão disponíveis para auxílio na determinação de quanto o fluxo de fluido é laminar ou turbulento (por exemplo, *Turbulent Flow Analysis: Measurement and Prediction*, P.S. Bernard & J.M. Wallace, John Wiley & Sons, Inc., (2000); *An Introduction to Turbulent Flow*, Jean Mathieu & Julian Scott, Cambridge University Press (2001)).

10 Conforme aqui usado, o termo “cromatografia de gás” ou “GC” (Gas Chromatography) refere-se à cromatografia onde a mistura de amostra é vaporizada e injetada em uma corrente de gás carreador (como nitrogênio ou hélio) se movendo através de uma coluna contendo uma fase estacionária composta de um líquido ou um sólido particular e é separada em seus compostos componentes de acordo com a afinidade dos compostos para a fase estacionária.

20 Conforme aqui usado, o termo “coluna de partícula grande” ou “coluna de extração” refere-se a uma coluna de cromatografia contendo um diâmetro de partícula médio maior do que cerca de 35  $\mu\text{m}$ . Conforme usado neste contexto, o termo “cerca de” significa  $\pm 10\%$ . Em uma modalidade preferida a coluna contém partículas de cerca de 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

25 Conforme aqui usado, o termo “coluna analítica” refere-se a uma coluna de cromatografia tendo placas cromatográficas suficientes para realizar uma separação de materiais em uma amostra que elui da coluna suficiente para permitir uma determinação da presença ou quantidade de um analito. Tais colunas são frequentemente distinguidas de “colunas de extração”, as quais têm o propósito geral de separação ou extração de material retido de materiais não-retidos a fim de obter uma amostra purificada para análise adicional. Conforme usado no presente contexto, o termo “cerca de” significa  $\pm 10\%$ . Em uma modalidade preferida a coluna analítica contém partículas de cerca de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Conforme aqui usado, o termo “on-line” ou “inline”, por exemplo,

conforme usado em “modo automático on-line” ou “extração on-line” refere-se a um procedimento realizado sem a necessidade de intervenção do operador. Em contraste, o termo “off-line” conforme aqui usado refere-se a um procedimento que requer intervenção manual de um operador. Então, se amostras forem submetidas à precipitação, e os sobrenadantes forem então manualmente carregados em um autoamostrador, as etapas de precipitação e carregamento estão off-line das etapas subsequentes. Em várias modalidades dos métodos, uma ou mais etapas podem ser realizadas de uma maneira automática on-line.

10 Conforme aqui usado, o termo “espectrometria de massa” ou “MS” (Mass Spectrometry) refere-se a uma técnica analítica para identificar compostos através de sua massa. MS refere-se a métodos de filtragem, detecção e medição de íons com base em sua razão massa-para-carga ou “m/z”. Tecnologia de MS geralmente inclui (1) ionização dos compostos para formar compostos carregados; e (2) detecção do peso molecular dos compostos carregados e cálculo de uma razão massa-para-carga. Os compostos podem ser ionizados e detectados através de qualquer meio adequado. Um “espectrômetro de massa” geralmente inclui um ionizador e um detector de íon. Em geral, uma ou mais moléculas de interesse são ionizadas, e os íons são subsequentemente introduzidos em um instrumento espectrográfico de massa onde, devido a uma combinação de campos magnéticos e elétricos, os íons fluem seguindo um curso no espaço que é dependente da massa (“m”) e carga (“z”). Vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.204.500 intitulada “Mass Spectrometry From Surfaces”; 6.107.623 intitulada “Methods and Apparatus for Tandem Mass Spectrometry”; 6.268.144 intitulada “DNA Diagnostics Based On Mass Spectrometry”; 6.124.137 intitulada “Surface-Enhanced Photolabile Attachment And Release For Desorption And Detection Of Analytes;” Wright e outros, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **2**:264-76 (1999); e Merchant and Weinberger, *Electrophoresis* **21**:1164-67 (2000).

Conforme aqui usado, o termo “operando em modo de ion negativo” refere-se àqueles métodos de espectrometria de massa onde íons

negativos são gerados e detectados. Similarmente, o termo “operação em modo de íon positivo”, conforme aqui usado, refere-se àqueles métodos de espectrometria de massa onde íons positivos são gerados e detectados.

5 Conforme aqui usado, o termo “ionização” ou “ionizando” refere-se ao processo de geração de um íon de analito tendo uma carga elétrica líquida igual a uma ou mais unidades de elétron. Íons negativos são aqueles tendo uma carga negativa líquida de uma ou mais unidades de elétron, enquanto íons positivos são aqueles tendo uma carga positiva líquida de uma ou mais unidades de elétron.

10 Conforme aqui usado, o termo “ionização de elétron” o “EI” (Electron Ionization) refere-se a métodos onde um analito de interesse em uma fase de gás ou vapor interage com um fluxo de elétrons. Impacto dos elétrons com o analito produz íons de analito, que podem então ser submetidos a uma técnica de espectrometria de massa.

15 Conforme aqui usado, o termo “ionização química” ou “CI” (Chemical Ionization) refere-se a métodos onde um gás reagente (por exemplo, amônia) é submetido a impacto de elétron, e íons de analito são formados pela interação de íons de gás reagente e moléculas de analito.

20 Conforme aqui usado, o termo “bombardeamento de átomo rápido” ou “FAB” refere-se a métodos onde um feixe de átomos de alta energia (frequentemente Xe ou Ar) impacta uma amostra não-volátil, realizando dessorção e ionização de moléculas contidas nas amostras. Amostras de teste são dissolvidas em uma matriz de líquido viscoso tal como glicerol, tioglicerol, álcool m-nitrobenzila, éter 18-coroa-6-coroa, 2-  
25 nitrofeniloctil éter, sulfolano, dietanolamina e trietanolamina. A escolha de uma matriz apropriada para um composto ou amostra é um processo empírico.

30 Conforme aqui usado, o termo “ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz” ou “MALDI” (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization”) refere-se a métodos onde uma amostra não-volátil é exposta à irradiação de laser, a qual dessorve e ioniza analitos na amostra através de vários cursos de ionização, incluindo fotoionização, protonação,

desprotonação e declínio de agrupamento. Para MALDI, a amostra é misturada com uma matriz de absorção de energia, que facilita dessorção de moléculas de analito.

Conforme aqui usado, o termo “ionização por dessorção de laser aumentada na superfície” ou “SELDI” (Surface Enhanced Laser Desorption Ionization) refere-se a outro método onde uma amostra não-volátil é exposta à irradiação a laser, que dessorve e ioniza analitos na amostra através de vários cursos de ionização, incluindo fotoionização, protonação, desprotonação e declínio de agrupamento. Para SELDI, a amostra é tipicamente ligada a uma superfície que preferivelmente retém um ou mais analitos de interesse. Como em MALDI, este processo pode também empregar um material de absorção de energia para facilitar ionização.

Conforme aqui usado, o termo “ionização por eletropulverização” ou “ESI” (Electrospray Ionization) refere-se a métodos onde uma solução é passada por um comprimento curto de tubo capilar, para o final do qual é aplicado um potencial elétrico positivo ou negativo alto. A solução que atinge o final do tubo é vaporizada (nebulizada) em um jato ou spray de gotículas muito pequenas de solução em um vapor de solvente. Esta névoa de gotículas flui através de uma câmara de evaporação, que é aquecida lentamente para prevenir condensação e evaporar solvente. Conforme as gotículas ficam menores a densidade de carga de superfície elétrica aumenta até o momento que a repulsão natural entre cargas iguais faz com que os íons bem como as moléculas neutras sejam liberados.

Conforme aqui usado, o termo “ionização química de pressão atmosférica” ou “APCI” (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) refere-se a métodos de espectrometria de massa que são similares a ESI; no entanto, APCI produz íons através de reações de molécula de íon que acontecem dentro de um plasma em pressão atmosférica. O plasma é mantido através de uma descarga elétrica entre o capilar de pulverização e um contra-eletrodo. Os íons são tipicamente extraídos para o analisador de massa através do uso de um conjunto de estágios de skimmer diferencialmente bombeados. Um contrafluxo de gás N<sub>2</sub> seco e preaquecido pode ser usado

para melhorar a remoção de solvente. A ionização de fase de gás em APCI pode ser mais eficaz do que ESI para análise de espécies menos polares.

O termo “fotoionização em pressão atmosférica” ou “APPI” (Atmospheric Pressure Photoionization) conforme aqui usado refere-se à forma de espectrometria de massa onde o mecanismo para a fotoionização de molécula M é absorção de fóton e ejeção de elétron para formar o íon molecular M<sup>+</sup>. Devido ao fato da energia de fóton estar tipicamente um pouco acima do potencial de ionização, o íon molecular é menos suscetível à dissociação. Em muitos casos pode ser possível analisar amostras sem a necessidade de cromatografia, então poupando tempo e gasto significantes. Na presença de vapor de água ou solventes próticos, o íon molecular pode extrair H para formar MH<sup>+</sup>. Isto tende a acontecer se M tiver uma afinidade para próton alta. Isto não afeta a precisão de quantificação porque a soma de M<sup>+</sup> e MS<sup>+</sup> é constante. Compostos de fármaco em solventes próticos são geralmente observados como MH<sup>+</sup>, enquanto compostos não-polares tal como naftaleno ou testosterona geralmente formam M<sup>+</sup>. Robb, D.B., Covey, T.R. and Bruins, A.P. (2000): See, e.g., Robb et al., “Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry”. Anal. Chem. 72(15): 3653-3659.

Conforme aqui usado, o termo “plasma indutivamente acoplado” ou “ICP” (Inductively Coupled Plasma) refere-se a métodos onde uma amostra interage com um gás parcialmente ionizado em uma temperatura suficientemente alta de maneira que a maioria dos elementos é atomizada e ionizada.

Conforme aqui usado, o termo “dessorção de campo” refere-se a métodos onde uma amostra de teste não-volátil é posta em uma superfície de ionização, e um campo elétrico intenso é usado para gerar íons de analito.

Conforme aqui usado, o termo “dessorção” refere-se à remoção de um analito de uma superfície e/ou a entrada de um analito em uma fase gasosa.

Conforme aqui usado, o termo “limite de quantificação”, “limite de

quantificação” ou “LQQ” (Limit of Quantification) refere-se ao ponto onde medições se tornam quantitativamente significantes. A resposta de analito neste LOQ é identificável, diferente e reproduzível com uma precisão de 20% e uma precisão de 80% a 120%.

5            Conforme aqui usado, o termo “limite de detecção” ou “LOD” (Limit of Detection) é o ponto no qual o valor medido é maior do que a incerteza associada com ele. O LOD é definido arbitrariamente como 2 desvios padrão (SD) a partir da concentração zero.

10            Conforme aqui usado, uma “quantidade” de estrona em uma amostra de fluido corporal refere-se em geral a um valor absoluto que reflete a massa de estrona detectável em volume de fluido corporal. No entanto, uma quantidade também compreende uma quantidade relativa em comparação com outra quantidade de estrona. Por exemplo, uma quantidade de estrona em um fluido corporal pode ser uma quantidade que é  
15 maior do que um controle ou nível normal de estrona normalmente presente.

              Em um segundo aspecto, são providos métodos para determinação da quantidade de estrona em uma amostra de fluido corporal através de espectrometria de massa em tandem que inclui: (a) purificação de estrona na amostra de fluido corporal através de cromatografia líquida; (b)  
20 geração de um íon precursor de estrona tendo uma razão de carga/massa de  $269,07 \pm 0,5$ ; (c) geração de um ou mais íons fragmentos a partir do íon precursor onde pelo menos um dos íons fragmentos tem uma razão de massa/carga de  $143,02 \pm 0,5$ ; e (d) detecção da quantidade de um ou mais dos íons gerados na etapa (b) ou (c) ou ambas e relação dos íons  
25 detectados com a quantidade de estrona na amostra de fluido corporal. Em algumas modalidades preferidas, o limite de quantificação dos métodos é menos do que ou igual a 500 pg/mL. Em outras modalidades preferidas, estrona não é derivatizada antes da espectrometria de massa. Em certas modalidades preferidas, os métodos podem incluir ainda geração de um ou  
30 mais íons fragmentos a partir de um íon precursor de estrona onde pelo menos um dos íons fragmentos tem uma razão de massa/carga de  $145,03 \pm 0,5$ . Em algumas modalidades preferidas, os métodos podem incluir adição

de um agente à amostra de fluido corporal em uma quantidade suficiente para liberar um pouco de estrona de uma proteína que pode estar presente na amostra de fluido corporal. Em modalidades preferidas relacionadas, os métodos podem incluir acidificação da amostra de fluido corporal; 5 preferivelmente acidificação antes de ionização; mais preferivelmente acidificação antes de purificação; preferivelmente acidificação com ácido fórmico. Em modalidades particularmente preferidas, a amostra de fluido corporal é soro, plasma ou urina.

Em um terceiro aspecto, são providos métodos para determinação 10 da quantidade de estrona em uma amostra de fluido corporal que inclui: (a) acidificação da amostra de fluido corporal com um agente em uma quantidade suficiente para liberar estrona de uma proteína que pode estar presente na amostra de fluido corporal; (b) purificação de estrona na amostra de fluido corporal através de cromatografia líquida; (c) ionização de 15 estrona na amostra de fluido corporal para produzir um ou mais íons detectáveis através de espectrometria de massa em tandem; e (d) detecção da quantidade do(s) íon(s) de estrona através de espectrometria de massa em tandem em modo de íon negativo e relação da quantidade do(s) íon(s) de estrona detectado(s) para a quantidade de estrona na amostra de fluido 20 corporal. Em algumas modalidades preferidas, o limite de quantificação dos métodos é menos do que ou igual a 500 pg/mL. Em outras modalidades preferidas, estrona não é derivatizada antes da espectrometria de massa. Em certas modalidades preferidas, íons de estrona são selecionados de um grupo de íons com uma razão de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$ ,  $145,03 \pm 0,5$  25 e  $143,02 \pm 0,5$ . Em algumas modalidades preferidas, os métodos incluem geração de um ou mais íons precursores de estrona onde pelo menos um dos íons precursores tem uma razão de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$ . Em modalidades preferidas relacionadas, os métodos podem incluir geração de um ou mais íons fragmentos de um íon precursor de estrona onde pelo 30 menos um dos íons fragmentos tem uma razão de massa/carga de  $145,03 \pm 0,5$  ou  $143,02 \pm 0,5$ . Em algumas modalidades preferidas, os métodos podem incluir acidificação da amostra de fluido corporal antes da ionização;

mais preferivelmente acidificação antes da purificação; preferivelmente acidificação com ácido fórmico. Em modalidades particularmente preferidas, a amostra de fluido corporal é soro, plasma ou urina.

5 Em algumas modalidades preferidas, estrona pode ser derivatizada antes da espectrometria de massa, no entanto, em certas modalidades preferidas, preparação de amostra exclui o uso de derivatização.

10 Em certas modalidades preferidas dos aspectos acima, cromatografia líquida é realizada usando HTLC e HPLC, preferivelmente HTLC é usada em conjunto com HPLC, no entanto, outros métodos que podem ser usados incluem, por exemplo, precipitação e purificação de proteína em conjunto com HPLC.

15 Modalidades preferidas utilizam cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), sozinha ou em combinação com um ou mais métodos de purificação, por exemplo, HTLC ou precipitação de proteína, para purificar estrona em amostras.

20 Em certas modalidades preferidas dos métodos revelados aqui, espectrometria de massa é realizada em modo de íon negativo. Em certas modalidades preferidas, estrona é medida usando APCI ou ESI em modo de ionização negativa.

Em modalidades preferidas dos aspectos acima, ambas as estronas glucuronidadas e não-glucuronidadas presentes na amostra de fluido corporal são detectadas e medidas.

25 Em modalidades preferidas, os íons de estrona detectáveis em um espectrômetro de massa são selecionados do grupo consistindo em íons com uma razão de massa/carga ( $m/z$ ) de  $269,07 \pm 0,5$ ,  $145,03 \pm 0,5$  e  $143,02 \pm 0,5$ ; os dois últimos sendo íons fragmentos dos íons precursores. Em modalidades particularmente preferidas, o íon precursor tem uma razão de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$  e os íons fragmentos têm uma razão de  
30 massa/carga de  $143,02 \pm 0,5$ .

Em modalidades preferidas, um padrão estrona interno separadamente detectável é provido na amostra, cuja quantidade é também

determinada na amostra. Nessas modalidades, toda ou uma porção de ambas as estronas endógena e padrão interno presentes na amostra é ionizada para produzir uma pluralidade de íons detectáveis em um espectrômetro de massa, e um ou mais íons produzidos de cada uma são detectados através de espectrometria de massa.

Um padrão de estrona interno preferido é 2,4,16,16-d4 estrona. Em modalidades preferidas, os íons padrão de estrona interno detectáveis em um espectrômetro de massa são selecionados do grupo consistindo em íons com uma razão de massa/carga de  $273,06 \pm 0,5$ ,  $147,07 \pm 0,5$  e  $145,04 \pm 0,5$ . Em modalidades particularmente preferidas, um íon precursor do padrão estrona interno tem uma razão de massa/carga de  $273,06 \pm 0,5$ ; e um ou mais íons fragmentos são selecionados do grupo consistindo em íons tendo uma razão de massa/carga de  $147,07 \pm 0,5$  e  $145,04 \pm 0,5$ .

Em modalidades preferidas, a presença ou quantidade do íon de estrona é relacionada com a presença ou quantidade de estrona na amostra de teste através de comparação a uma referência tal como 2,4,16,16-d4 estrona.

Em uma modalidade, os métodos envolvem a combinação de cromatografia líquida com espectrometria de massa. Em uma modalidade preferida, a cromatografia líquida é HPLC. Uma modalidade preferida utiliza HPLC sozinha ou em combinação com um ou mais métodos de purificação tal como, por exemplo, HTLC ou purificação de proteína, para purificar estrona em amostras. Em outra modalidade preferida, a espectrometria de massa é espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

Em certas modalidades preferidas dos aspectos revelados aqui, o limite de quantificação (LOQ) de estrona em amostras de teste é menos do que ou igual a 500 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 400 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 300 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 200 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 175 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 150 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 125 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 100 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 75

pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 50 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 25 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 20 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 15 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 14 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 14 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 12 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 11 pg/mL; preferivelmente 10 pg/mL.

O termo “cerca de” conforme aqui usado em referência a medições quantitativas não incluindo a medição da massa de um íon refere-se ao valor indicado mais ou menos 10%. Instrumentos de espectrometria de massa podem variar ligeiramente na determinação da massa de um dado analito. O termo “cerca de” no contexto da massa de um íon ou da razão de massa/carga de um íon refere-se a +/- 0,5 unidade de massa atômica.

O sumário da invenção descrito acima é não-limitante e outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da descrição detalhada que segue da invenção e a partir das reivindicações.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DO DESENHO**

A figura 1 mostra a linearidade da quantificação de estrona em amostras de estoque serialmente diluídas usando um ensaio LC-MS/MS. Detalhes são descritos no Exemplo 6.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

São descritos métodos para detecção e quantificação de estrona em uma amostra de teste. Os métodos utilizam cromatografia líquida (LC), mais preferivelmente HTLC em conjunto com HPLC, para realizar uma purificação adicional de analitos selecionados, e combinar esta purificação com métodos únicos de espectrometria de massa (MS), desta maneira provendo um sistema de ensaio de alto rendimento para detecção e quantificação de estrona em uma amostra de teste. As modalidades preferidas são particularmente bem adequadas para aplicação em laboratórios clínicos grandes. Métodos para estrona são providos, os quais têm especificidade aumentada e são realizados em menos tempo e com menos preparação de amostra do que requerido em outros ensaios de

estrona.

Em modalidades preferidas, o limite de detecção (LOD) de estrona em amostras de teste é menos do que ou igual a 75 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 50 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 25 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 10 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 5 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 4,5 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 4 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 3,5 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 3 pg/mL; preferivelmente menos do que ou igual a 2, pg/mL; preferivelmente 2 pg/mL.

Amostras de teste adequadas incluem qualquer amostra de teste que possa conter o analito de interesse. Por exemplo, amostras obtidas durante a fabricação de estrona sintética podem ser analisadas para determinar a composição e o rendimento do processo de fabricação. Em algumas modalidades preferidas, uma amostra é uma amostra biológica; isto é, uma amostra obtida de qualquer fonte biológica, tal como um animal, uma cultura celular, uma cultura de órgão, etc. Em certas modalidades preferidas, as amostras são obtidas de um animal mamífero, tal como um cachorro, gato cavalo, etc. Animais mamíferos particularmente preferidos são primatas, mais preferivelmente humanos machos ou fêmeas. Amostras particularmente preferidas incluem sangue, plasma, soro, cabelo, músculo, urina, saliva, lágrima, fluido cerebrospinal ou outra amostra de tecido. Tais amostras podem ser obtidas, por exemplo, de um paciente, isto é, uma pessoa viva, homem ou mulher, se apresentando em um consultório clínico para diagnóstico, prognóstico ou tratamento de uma doença ou condição. A amostra de teste é preferivelmente obtida de um paciente, por exemplo, soro sanguíneo.

#### Preparação de Amostra para Espectrometria de Massa

Métodos que podem ser usados para enriquecer em estrona com relação a outros componentes na amostra (por exemplo, proteína) incluem, por exemplo, filtração, centrifugação, cromatografia de camada fina (TLC) (Thin Layer Chromatography), eletroforese incluindo eletroforese

capilar, separações de afinidade incluindo separações de imunoafinidade, métodos de extração incluindo extração com acetato de etila e extração com metanol, e o uso de agentes caotrópicos ou qualquer combinação dos acima ou similar.

5                   Vários métodos podem ser usados para romper a interação entre estrona e proteína antes da cromatografia e/ou análise da amostra MS de maneira que a análise pode ser direcionada à quantidade total de estrona na amostra (por exemplo, estrona livre e estrona ligada à proteína). Precipitação de proteína é um método preferido de preparação de uma amostra de teste, especialmente uma amostra de teste biológica, tal como soro ou plasma. Tais métodos de purificação de proteína são bem-conhecidos na técnica, por exemplo, Polson e outros, *Journal of Chromatography B* **785**:263-275 (2003), descrevem técnicas de precipitação de proteína adequadas para uso nos métodos. Precipitação de proteína pode ser usada para remover a maior parte da proteína da amostra deixando estrona no sobrenadante. As amostras podem ser centrifugadas para separar o sobrenadante líquido das proteínas precipitadas. O sobrenadante resultante pode então ser aplicado à cromatografia líquida e subsequente análise de espectrometria de massa. Em certas modalidades, o uso de precipitação de proteína tal como, por exemplo, precipitação da proteína acetonitrila, obvia a necessidade de cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC) ou outra extração on-line antes de HPLC e espectrometria de massa. Desta maneira em tais modalidades, o método envolve (1) realização de uma precipitação de proteína da amostra de interesse; e (2) carregamento do sobrenadante diretamente no HPLC-espectrômetro de massa sem uso de extração on-line ou cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC).

30                   Em outras modalidades preferidas, estrona pode ser liberada de uma proteína sem ter que precipitar a proteína. Por exemplo, ácidos, sais ou alcoóis podem ser adicionados em quantidades apropriadas para romper interação entre uma proteína e estrona. Exemplar de tais agentes incluem ácido fórmico, NaCl ou etanol.

Em algumas modalidades preferidas, HTLC, sozinha ou em combinação com um ou mais métodos de purificação, pode ser usada para purificar estrona antes da espectrometria de massa. Em tais modalidades, amostras podem ser extraídas usando um cartucho de extração de HTLC que captura o analito, então eluído e cromatografado em uma segunda coluna de HTLC ou sobre uma coluna de HPLC analítica antes da ionização. Devido ao fato das etapas envolvidas nesses procedimentos cromatográficos poderem ser ligadas de maneira automática, a necessidade de envolvimento do operador durante a purificação do analito pode ser minimizada. Esta característica pode resultar em economias de tempo e custos, e eliminação da oportunidade de erro do operador.

Acredita-se que fluxo turbulento, tal como aquele provido por colunas e métodos de HTLC, possa aumentar a taxa de transferência de massa, melhorando as características de separação. Colunas de HTLC separam componentes por meio de taxas de fluxo cromatográfico altas através de uma coluna revestida contendo partículas rígidas. Ao empregar taxas de fluxo altas (por exemplo, 3-5 mL/min), fluxo turbulento acontece na coluna o que causa interação quase completa entre a fase estacionária e o(s) analito(s) de interesse. Uma vantagem do uso de colunas de HTLC é que a formação macromolecular associada com matrizes de fluido biológico é evitada uma vez que espécies de peso molecular alto não são retidas sob as condições de fluxo turbulento. Métodos de HTLC que combinam separações múltiplas em um procedimento diminuem a necessidade de preparação de amostra longa e operam em uma velocidade significativamente maior. Tais métodos também atingem um desempenho de separação superior à cromatografia de fluxo laminar (HPLC). HTLC permite injeção direta de amostras biológicas (plasma, urina, etc). Injeção direta é difícil obter em formas tradicionais de cromatografia porque proteínas desnaturadas e outros restos biológicos rapidamente bloqueiam as colunas de separação. HTLC também permite volume de amostra muito baixo de menos do que 1 mL, preferivelmente menos do que 0,5 mL, preferivelmente menos do que 0,2 mL, preferivelmente 0,1 mL.

Exemplos de HTLC aplicada à preparação de amostra antes da análise através de espectrometria de massa foram descritos em outro local. Vide, por exemplo, Zimmer e outros, J. Chromatogr. A 854:23-35 (1999); vide também Patentes U.S. Nos. 5.968.367; 5.919.368; 5.795.469; e 5.772.874. Em certas modalidades do método, as amostras são submetidas à precipitação de proteína conforme descrito acima antes do carregamento na coluna de HTLC; em modalidades preferidas alternativas, as amostras podem ser carregadas diretamente em HTLC sem serem submetidas à precipitação de proteína. Preferivelmente, HTLC é usada em conjunto com HPLC para extrair e purificar estrona sem a amostra ser submetida à precipitação de proteína. Em modalidades preferidas relacionadas, a etapa de purificação envolve (i) aplicação da amostra a uma coluna de extração de HTLC, (ii) lavagem da coluna de extração de HTLC sob condições com o que estrona é retida pela coluna, (iii) eluição da estrona retida da coluna de extração de HTLC, (iv) aplicação do material retido a uma coluna analítica e (v) eluição de estrona purificada da coluna analítica. A coluna de extração de HTLC é preferivelmente uma coluna de partícula grande. Em várias modalidades, uma ou mais etapas de métodos podem ser realizadas de uma maneira automática, on-line. Por exemplo, em uma modalidade, as etapas (i)-(v) são realizadas de uma maneira automática, on-line. Em outra, as etapas de ionização e detecção são realizadas nas etapas (i)-(v) que seguem on-line.

Cromatografia líquida (LC) (Liquid Chromatography) incluindo cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) se apóia em tecnologia de fluxo laminar, relativamente lento. Análise de HPLC tradicional se apóia em revestimentos de coluna onde fluxo laminar da amostra através da coluna é a base para separação do analito de interesse da amostra. O versado na técnica vai compreender que separação em tais colunas é um processo difuso. HPLC foi aplicada com sucesso para separação de compostos em amostras biológicas, mas uma quantidade significativa de preparação de amostra é requerida antes da separação e subsequente análise com um espectrômetro de massa (MS), tornando esta técnica de trabalho intensa.

Ainda, a maioria dos sistemas de HPLC não utiliza espectrômetro de massa até seu potencial maior, permitindo que apenas um sistema de HPLC seja conectado a um único instrumento de MS, resultando em necessidades de longo tempo para realização de um grande número de ensaios.

- 5                   Vários métodos foram descritos para uso de HPLC para limpeza da amostra antes da análise de espectrometria de massa. Vide, por exemplo, Taylor e outros, *Therapeutic Drug Monitoring* **22**:608-12 (2000); e Salm e outros, *Clin. Therapeutics* **22**. Supl. B:B71-B85 (2000).

Um versado na técnica pode selecionar instrumentos e colunas  
10 de HPLC que são adequados para uso com estrona. A coluna cromatográfica tipicamente inclui um meio (isto é, um material de revestimento) para facilitar separação de porções químicas (isto é, fracionamento). O meio pode incluir partículas pequenas. As partículas incluem uma superfície ligada que interage com as várias porções químicas  
15 para facilitar separação das porções químicas. Uma superfície ligada adequada é uma superfície ligada hidrofóbica, tal como uma superfície ligada de alquila. Superfícies ligadas de alquila podem incluir grupos alquila C-4, C-8, C-12 ou C-18 ligados, preferivelmente grupos ligados C-18. A  
20 coluna cromatográfica inclui uma porta de entrada para recebimento de uma amostra e uma porta de saída para descarga de um efluente que inclui a amostra fracionada. Em uma modalidade, a amostra (ou amostra pré-purificada) é aplicada à coluna na porta de entrada, eluída com um solvente ou misturas de solvente e descarregada na porta de saída. Modos de solvente diferentes podem ser selecionados para eluição do(s) analito(s) de  
25 interesse. Por exemplo, cromatografia líquida pode ser realizada usando um modo de gradiente, um modo isocrático, ou um modo polifásico (isto é, misturado). Durante a cromatografia, a separação de materiais é realizada por variáveis tais como escolha de eluente (também conhecida como "fase móvel"), modo de eluição, condições de gradiente, temperatura, etc.

- 30                   Em certas modalidades, um analito pode ser purificado aplicando uma amostra a uma coluna sob condições onde o analito de interesse é reversivelmente retido pelo material de revestimento da coluna,

enquanto um ou mais outros materiais não são retidos. Nessas modalidades, uma primeira condição de fase móvel pode ser empregada, onde o analito de interesse é retido pela coluna, e uma segunda condição de fase móvel pode ser subsequentemente empregada para remover material retido da  
5 coluna, uma vez materiais não-retidos são retirados com lavagem. Alternativamente, um analito pode ser purificado através da aplicação de uma amostra a uma coluna sob condições de fase móvel onde o analito de interesse elui em uma taxa diferencial em comparação com um ou mais outros materiais. Tais procedimentos podem enriquecer a quantidade de um  
10 ou mais analitos de interesse com relação a um ou mais outros componentes da amostra.

Em uma modalidade preferida, a HTLC pode ser seguida por HPLC em um sistema cromatográfico de coluna hidrofóbica. Em certas modalidades preferidas, uma coluna à base de polímero TurboFlow  
15 Cyclone® da Cohesive Technologies (partícula de 60  $\mu\text{m}$ , coluna de 50 x 1,0 mm, poro de 10Å) é usada. Em modalidades preferidas relacionadas, uma coluna analítica, de fenila ligada a éter, Synergi Polar-RP®, da Phenomenex, Inc. (partícula de 4  $\mu\text{m}$ , coluna de 150 x 2,0 mm, poro de 80Å) com capeamento de extremidade hidrofílico, é usada. Em certas modalidades  
20 preferidas, HTLC e HPLC são realizadas usando Água Ultra Pura de Grau HPLC e metanol 100% como as fases móveis.

Através de seleção cuidadosa de válvulas e tubulação de conector, duas ou mais colunas cromatográficas podem ser conectadas conforme necessário de maneira que material é passado de uma para a  
25 outra sem a necessidade de quaisquer etapas manuais. Em modalidades preferidas, a seleção de válvulas e tubulação é controlada por um pré-programa de computador para realizar as etapas necessárias. Mais preferivelmente, o sistema de cromatografia é também conectado de tal maneira on-line ao sistema de detector, por exemplo, um sistema de MS.  
30 Então, um operador pode pôr uma bandeja de amostras em um autoamostrador, e as operações restantes são realizadas sob controle do computador, resultando em purificação e análise de todas as amostras

selecionadas.

Em certas modalidades preferidas, estrona presente em uma amostra de teste pode ser purificada antes da ionização. Em modalidades particularmente preferidas a cromatografia não é cromatografia de gás.

- 5 Preferivelmente, os métodos são realizados sem submeter a estrona à cromatografia de gás antes da análise espectrométrica de massa.

#### Detecção e Quantificação Através de Espectrometria de Massa

- Em várias modalidades, estrona presente em uma amostra de teste pode ser ionizada através de qualquer método conhecido do versado na técnica. Espectrometria de massa é realizada usando um espectrômetro de massa, que inclui uma fonte de íon para ionização da amostra fracionada e criação de moléculas carregadas para análise adicional. Por exemplo, ionização da amostra pode ser realizada através de ionização de elétron, ionização química, ionização por eletropulverização (ESI), ionização de fóton, ionização química de pressão atmosférica (APCI), fotoionização, fotoionização de pressão atmosférica (APPI), bombardeamento de átomo rápido (FAB), ionização secundária líquida (LSI), ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI), ionização de campo, dessorção de campo, ionização de termopulverização/pulverização de plasma, ionização de dessorção a laser aumentada na superfície (SELDI), plasma indutivamente acoplado (ICP) e ionização de feixe de partícula. O versado na técnica vai compreender que a escolha de método de ionização pode ser determinada com base no analito a ser medido, tipo de amostra, o tipo de detector, a escolha de modo positivo versus negativo, etc.

- 25 Em modalidades preferidas, estrona é ionizada através de ionização por eletropulverização (ESI) em modo negativo. Em modalidades preferidas relacionadas, íon de estrona está em um estado gasoso e o gás de colisão inerte é argônio ou nitrogênio. Em modalidades preferidas alternativas, a estrona é ionizada através de ionização química de pressão atmosférica (APCI) em modo negativo. Em outras modalidades preferidas, a estrona é ionizada através de ionização por eletropulverização (ESI) ou ionização química por pressão atmosférica (APCI) em modo positivo. As

transições de massa de 271,17 (íon precursor) e 159,2 e 133,2 (íons fragmentos) podem ser usadas para detecção e quantificação em modo positivo.

Após a amostra ter sido ionizada, os íons negativamente ou positivamente carregados desta maneira criados podem ser analisados para determinar uma razão de massa-para-carga. Analisadores adequados para determinação de razões de massa-para-carga incluem analisadores quadrupolo, analisadores de armadilha e íon e analisadores de tempo-de-voou. Os íons podem ser detectados usando vários modos de detecção. Por exemplo, íons selecionados podem ser detectados, isto é, usando um modo de monitoramento de íon seletivo (SIM) ou, alternativamente, os íons podem ser detectados usando um modo de varredura, por exemplo, monitoramento de reação múltiplo (MRM) ou monitoramento de reação selecionado (SRM). Preferivelmente, a razão de massa-para-carga é determinada usando um analisador quadrupolo. Por exemplo, em um instrumento "quadrupolo" ou de armadilha de íon quadrupolo", íons em um campo de radiofrequência de oscilação sofrem uma força proporcional ao potencial DC aplicado entre os eletrodos, a amplitude do sinal RF e a razão de massa/carga. A tensão e a amplitude podem ser selecionadas de maneira que apenas os íons tendo uma razão de massa/carga particular viajam o comprimento do quadrupolo, enquanto todos os outros íons são defletidos. Então, instrumentos quadrupolo podem agir como ambos um "filtro de massa" e como um "detector de massa" para os íons injetados no instrumento.

Uma pessoa pode aumentar a resolução da técnica de MS empregando "espectrometria de massa em tandem" ou "MS/MS". Nesta técnica, um íon precursor (também chamado um íon de origem) gerado de uma molécula de interesse pode ser filtrado em um instrumento MS, e o íon precursor é subsequentemente fragmentado para dar um ou mais íons fragmentos (também chamados íons filhas ou íons produtos) que são então analisados em um segundo procedimento MS. Através de seleção cuidadosa de íons precursores, apenas íons produzidos por certos analitos são passados para a câmara de fragmentação, onde colisões com átomos de um

gás inerte produzem os íons fragmentos. Devido ao fato de ambos os íons precursores e fragmentos serem produzidos de uma maneira reproduzível sob um dado conjunto de condições de ionização/fragmentação, a técnica de MS/MS pode prover uma ferramenta analítica extremamente poderosa. Por exemplo, a combinação de filtragem/fragmentação pode ser usada para eliminar substância de interferência, e pode ser particularmente útil em amostras complexas, tais como amostras biológicas.

O espectrômetro de massa provê tipicamente o usuário com uma varredura de íon; isto é, a abundância relativa de cada íon com uma massa/carga particular em uma dada faixa (por exemplo, 100 a 1000 amu). Os resultados de um ensaio de analito, isto é, um espectro de massa, podem ser relacionados com a quantidade do analito na amostra original através de vários métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, devido ao fato de parâmetros de amostragem e análise serem cuidadosamente controlados, a abundância relativa de um dado íon pode ser comparada com uma tabela que converte esta abundância relativa em uma quantidade absoluta da molécula original. Alternativamente, padrões moleculares podem ser ativados com a amostra, e uma curva padrão construída com base em íons gerados a partir desses padrões. Usando tal curva padrão, a abundância relativa de um dado íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta da molécula original. Em certas modalidades preferidas, um padrão interno é usado para gerar uma curva padrão para cálculo da quantidade de estrona. Métodos de geração e uso de tais curvas padrão são bem-conhecidos na técnica e um versado na técnica é capaz de selecionar um padrão interno apropriado. Por exemplo, um isótopo de estrona pode ser usado como um padrão interno; em certas modalidades preferidas, o padrão é d4-estrona. Vários outros métodos de relação da quantidade de um íon com a quantidade da molécula original serão bem-conhecidos daqueles de habilidade comum na técnica.

Uma ou mais etapas dos métodos podem ser realizadas usando máquinas automáticas. Em certas modalidades, uma ou mais etapas de purificação são realizadas on-line, e mais preferivelmente todas as etapas de

purificação e espectrometria de massa podem ser realizadas de uma maneira on-line.

Em certas modalidades, tal MS/MS, onde íons precursores são isolados para fragmentação adicional, dissociação por ativação de colisão (CAD) (Collision Activated Dissociation) é frequentemente usada para gerar os íons fragmentos para detecção adicional. Em CAD, íons precursores ganham energia através de colisões com um gás inerte, e subsequentemente fragmentam através de um processo referido como “decomposição unimolecular”. Energia suficiente deve ser depositada no íon precursor de maneira que certas ligações dentro do íon podem ser rompidas devido à energia vibracional alta.

Em modalidades particularmente preferidas, estrona é detectada e/ou quantificada usando MS/MS como segue. As amostras são submetidas à cromatografia líquida, preferivelmente HTLC seguido por HPLC, o fluxo de solvente líquido da coluna cromatográfica entra na interface do nebulizador aquecido de um analisador de MS/MS e a mistura de solvente/analito é convertida em vapor na tubulação aquecida da interface. O analito (por exemplo, estrona), contido no solvente nebulizado, é ionizado pela agulha de descarga corona da interface, que aplica uma tensão grande à mistura de solvente/analito nebulizada. Os íons, por exemplo, íons precursores, passam pelo orifício do instrumento e entram no primeiro quadrupolo. Os quadrupolos 1 e 3 (Q1 e Q3) são filtros de massa, permitindo seleção de íons (isto é, íons “precursores” e “fragmentos”) com base em sua razão de massa para carga ( $m/z$ ). O quadrupolo 2 (Q2) é a célula de colisão, onde íons são fragmentados. O primeiro quadrupolo do espectrômetro de massa (Q1) seleciona íons de estrona precursores com uma razão de massa para carga particular. Íons de estrona precursores com a razão de massa/carga correta são deixados passar para a câmara de colisão (Q2), enquanto íons indesejados sem qualquer outra razão de massa/carga colidem com as laterais do quadrupolo e são eliminados. Íons precursores que entram em Q2 colidem com moléculas de gás argônio neutro e fragmentam. Este processo é chamado dissociação ativada por colisão (CAD). Os íons

fragmentos gerados são passados para o quadrupolo 3 (Q3), onde os íons fragmentos de estrona são selecionados enquanto outros íons são eliminados.

Os métodos podem envolver MS/MS realizada em modo de íon negativo ou positivo. Usando métodos padrão bem-conhecidos na técnica, um versado na técnica é capaz de identificar um ou mais íons fragmentos de um íons precursor particular de estrona que pode ser usado para seleção em quadrupolo 3 (Q3).

Se o íon precursor de estrona incluir um álcool ou grupo amina, íons fragmentos são geralmente formados que representam desidratação ou desaminação do íon precursor, respectivamente. No caso de íons precursores que incluem um grupo álcool, tais íons fragmentos formados através de desidratação são causados por uma perda de uma ou mais moléculas de água do íon precursor (isto é, onde a diferença em razão de massa para carga entre o íon precursor e íon fragmento é cerca de 18 para a perda de uma molécula de água, ou cerca de 36 para a perda de duas moléculas de água, etc). No caso de íons precursores que incluem um grupo amina, tais íons fragmentos formados por desaminação são causados por uma perda de uma ou mais moléculas de amônia (isto é, onde a diferença em razão de massa para carga entre o íon precursor e íon fragmento é cerca de 17 para a perda de uma molécula de amônia ou 34 para a perda de duas moléculas de amônia, etc). Da mesma maneira, íons precursores que incluem um ou mais grupos álcool e amina geralmente formam íons fragmentos que representam a perda de uma ou mais moléculas de água e/ou uma ou mais moléculas de amônia (isto é, onde a diferença em razão de massa para carga entre o íon precursor e íon fragmento é cerca de 35 para a perda de uma molécula de água e a perda de uma molécula de amônia). Em geral, os íons fragmentos que representam desidratações ou desaminações do íon precursor não são íons fragmentos específicos para um analito particular. Desta maneira, em modalidades preferidas da invenção, MS/MS é realizada de maneira que pelo menos um íon fragmento é detectado que não representa apenas uma perda de uma ou mais

moléculas de água e/ou uma perda de uma ou mais moléculas de amônia do íon precursor.

Conforme o íon colide com o detector eles produzem um pulso de elétrons que são convertidos para um sinal digital. Os dados adquiridos são transmitidos para um computador, que faz um gráfico da contagem dos íons coletados versus tempo. Os cromatogramas de massa resultantes são similares a cromatogramas gerados em métodos de HPLC tradicionais. As áreas sob os picos correspondendo a íons particulares, ou a amplitude de tais picos, são medidas e a área de amplitude é relacionada com a quantidade do analito (estrona) de interesse. Em certas modalidades, a área sob as curvas, ou amplitude dos picos, para íon(s) fragmento(s) e/ou íons precursores é medida para determinar a quantidade de estrona. Conforme acima descrito, a abundância relativa de um dado íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta do analito original, por exemplo, estrona, usando curvas padrão de calibragem com base em picos de um ou mais íons de um padrão molecular interno, tal como d4-estrona.

Os exemplos que seguem servem para ilustrar a invenção. Esses exemplos não pretendem de maneira nenhuma limitar o escopo dos métodos.

## 20 **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1: Preparação de Amostra e Reagente**

Sangue foi coletado em um Vacutainer sem quaisquer aditivos e deixado coagular 30 minutos em temperatura ambiente, 18° a 25° C. As amostras que exibiram hemólise intensa, lipemia e/ou icterícia forte foram excluídas.

Um estoque de estrona padrão de 1 mg/mL em metanol foi preparado e diluído mais em metanol para preparar um padrão estoque intermediário de estrona de 1.000.000 pg/mL, que foi usado para preparar dois padrões de trabalho de estrona de 10.000 pg/mL, diluídos ou em metanol para padrão A ou em soro esvaziado para padrão B.

Metanol deuterado (álcool metil-d1; No. Cat. Fisher AC29931-1000 ou equivalente) foi usado para preparar um padrão de estoque de d4-

estrona de 1 mg/mL (2,4,16,16-d4 estrona), que foi usado para preparar um padrão de estoque intermediário de 1.000.000 pg/mL em metanol deuterado. O padrão de estoque de intermediário de d4-estrona foi usado para preparar um padrão interno de d4-estrona de trabalho de 5000 pg/mL em água DI: 1  
5 mL do padrão de estoque do intermediário d4-estrona foi diluído para volume com água DI em um frasco volumétrico de 200 mL.

Uma solução de ácido fórmico a 20% foi preparada através da adição de 50 mL de ácido fórmico (~98% de Aldrich No. Cat. 06440 puro ou equivalente) a um frasco volumétrico de 250 mL, que foi diluído para volume  
10 com água de grau de HPLC ultrapura.

Todos os calibradores/padrões usados em cada rodada foram preparados frescos semanalmente da série de diluições de alíquotas congeladas de 10.000 pg/mL de padrão de estrona em soro esvaziado. Os padrões foram preparados a partir da concentração mais alta para a mais  
15 baixa com um volume total final para cada padrão de 10 mL.

#### **Exemplo 2: Extração de Estrona do Soro usando Cromatografia Líquida**

Amostras de cromatografia líquida (LC) foram preparadas pipetando 200 µL de padrões, controles ou amostras de paciente em uma placa de 96 cavidades. Ainda, 300 µL de ácido fórmico 20% foram aplicados  
20 a cada cavidade para uma concentração final de ~11% (V/V). Finalmente, 50 µL dos 500 pg/mL do padrão de d4-estrona foram adicionados a cada cavidade. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos antes de LC.

Cromatografia líquida foi realizada com um sistema de HTLC  
25 Cohesive Technologies Aria TX-4 usando um software Aria OS V 1.5 ou mais novo. Uma solução de lavagem de autoamostrador foi preparada usando acetonitrila a 60%, isopropanol a 30% e acetona a 10% (V/V).

O sistema de HTLC injetou automaticamente 75 µL das amostras preparadas acima em uma coluna TurboFlow (50 x 1,0 mm, 60 µM  
30 de Coluna de Extração Cyclone P da Cohesive Technologies) revestida com partículas grandes. As amostras foram carregadas em uma taxa de fluxo alta (5 mL/min, reagente de carregamento água DI 100%) para criar turbulência

dentro da coluna de extração. Esta turbulência assegurou ligação otimizada de estrona às partículas grandes na coluna e a passagem de proteína residual e restos para refugo.

5 Seguindo carregamento, a direção do fluxo foi revertida e a amostra eluída para a coluna analítica (coluna analítica Phenomenex, coluna Synergi Polar-RP® 150 x 2,0 mm, 4 µm) com 200 µL de metanol 90% na alça. Um gradiente de HPLC binário foi aplicado à coluna analítica, para separar estrona de outros analitos contidos na amostra. A Fase móvel A era Água UltraPura (grau HPLC) e a fase móvel B era metanol 100%. O  
10 gradiente de HPLC começou com um gradiente orgânico de 10% que aumentou para 75% e então aumentou em 5 a 10% aumentos até 99% em aproximadamente 3,35 minutos. O tempo de gradiente total era 6,58 minutos. As amostras separadas foram então submetidas à MS/MS para quantificação de estrona.

15 Para determinar interferência com outras moléculas, soro vazio foi reforçado com 1000 pg/mL dos esteroides que seguem: 17-β Estradiol, Estriol, Testosterona, 17-α Hidroxiprogesterona, Progesterona, Androestenodiona, Aldosterona, 11-Desoxicortisol, Corticosterona e Diidroxitestosterona. As amostras foram submetidas à LC. Não houve  
20 nenhuma interferência observada a partir desses esteroides; nenhum dos esteroides coeluiu com estrona.

### **Exemplo 3: Detecção e Quantificação de Estrona através de MS/MS**

MS/MS foi realizada usando um sistema Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS (Thermo Electron Corporation). Os programas de software que  
25 seguem todos da ThermoElectron foram usados nos Exemplos descritos aqui: Tune Master V1.2 ou mais novo, Excalibur V 2.0 SR1 ou mais novo, TSQ Quantum 1.4 ou mais novo, LCQuan V 2.5 SUR1 ou mais novo e Xreport 1.0 ou mais novo. Solvente/analito líquido saindo da coluna de HPLC analítica fluiu para a interface do nebulizador aquecido de um analisador  
30 MS/MS Thermo Finnigan. A mistura de solvente/analito foi convertida em vapor na tubulação aquecida da interface. Analitos no solvente nebulizado foram ionizados através da agulha de descarga corona da interface, que

aplicou tensão à mistura de solvente/analito nebulizada.

Íons passaram para o primeiro quadrupolo (Q1), que selecionou íons com uma razão de massa para carga de  $269,07 \pm 0,5$  m/z. Íons entraram no Quadrupolo 2 (Q2) colidiram com gás argônio para gerar fragmentos de íons, que foram passados para quadrupolo 3 (Q3) para seleção adicional. Simultaneamente, o mesmo processo usando espectrometria de massa com diluição de isótopo foi realizado com um padrão interno, uma molécula de estrona 4-deuterada. As transições de massa que seguem foram usadas para detecção e quantificação durante validação em polaridade negativa.

Tabela 1. Transições de Massa para Estrona (Polaridade Negativa)

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)
Estrona	269,07	143,02 & 145,03
2,,4,16,16-d4 Estrona	273,06	145,04 & 147,07

As transições de massa que seguem foram usadas para detecção e quantificação durante validação em polaridade positiva.

Tabela 2. Transições de Massa para Estrona (Polaridade Positiva)

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)
Estrona	271,17	159,20 & 133,20
2,,4,16,16-d4 Estrona	275,12	159,10

#### 15 Exemplo 4: Precisão e Exatidão Intraensaio e Interensaio

Três grupos de controle de qualidade (QC) (Quality Control) foram preparados a partir de soro sem carvão, reforçados com estrona para uma concentração de 25, 200 e 800 pg/mL.

Dez alíquotas de cada um dos três grupos de QC foram analisadas em um único ensaio para determinar a reprodutibilidade (CV) de uma amostra dentro de um ensaio. Os valores que seguem foram determinados:

Tabela 3: Variação e Exatidão IntraEnsaio

	Nível I (25 pg/mL)	Nível II (200 pg/mL)	Nível III (800 pg/mL)
<b>Média</b>	25	213	845

<b>DesvPad</b>	0,7	22,4	77,4
<b>CV</b>	3 %	10%	9%
<b>Exatidão</b>	98 %	107 %	106 %

Dez alíquotas de cada um dos três grupos QC foram ensaiadas durante 5 dias para determinar a reproducibilidade (RSD%) entre os ensaios. Os valores que seguem foram determinados:

Tabela 4: Variação e Exatidão InterEnsaio

	<b>Nível 1 (25 pg/mL)</b>	<b>Nível II (200 pg/mL)</b>	<b>Nível III (800 pg/mL)</b>
<b>Média</b>	26	224	882
<b>DesvPad</b>	2,5	20,6	71,2
<b>RSD (%)</b>	6,9	8,2	7,8
<b>Exatidão (%)</b>	104,0	112,2	110,2

#### 5 Exemplo 5: Sensibilidade Analítica: Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O padrão zero de estrona foi ativado em 10 réplicas para determinar o limite de detecção do ensaio, que é o ponto no qual o valor medido é maior do que a incerteza associada com ele. O LOD foi definido arbitrariamente como 2 desvios padrão (SD) da concentração zero. As razões de área de pico resultantes para padrão zero foram estatisticamente analisadas com um valor médio de 0,014 e um SD de 0,004. O LOD para o ensaio de estrona foi 2,0 pg/mL.

Para determinar o limite de quantificação com uma precisão de 20% e uma exatidão de 80% a 120%, cinco amostras diferentes em concentrações próximas ao LOQ esperado foram ensaiadas e a reproducibilidade determinada para cada uma. O LOQ para o ensaio de estrona foi definido a 10,0 pg/mL.

#### Exemplo 6: Faixa e Linearidade do Ensaio que Podem ser Relatadas

Para detectar a linearidade de detecção de estrona no ensaio, um vazio designado padrão zero e 10 padrões de soro reforçados foram preparados e analisados em 5 dias separados. Uma regressão quadrática de cinco rodadas consecutivas deu correlações de coeficiente de 0,995 ou

mais, com uma precisão de  $\pm 20\%$  revelando uma faixa linear quantificável de 10 a 2000 pg/mL.

#### **Exemplo 7: Especificidade de Matriz**

5 A especificidade da matriz foi avaliada usando água, soro vazio e soro humano normal Biocell para determinar se as amostras do paciente poderiam ser diluídas de uma maneira linear. Os controles médio (MC) (Mid Control) e alto (HC) (High Control) foram diluídos duas vezes e quatro vezes. As amostras foram ativadas em duplicata seguindo uma rodada de calibragem. A precisão foi como segue.

10 **Tabela 5. Precisão de Especificidade de Matriz**

	<b>% De Recuperação de Água MC/HC</b>	<b>% de Recuperação de Soro Esvaziado MC/HC</b>	<b>% de Recuperação de Soro Agrupado MC/HC</b>
<b>Diluição 1:2</b>	121/89	84/110	84/97
<b>Diluição 1:4</b>	164/116	113/92	25/90

Os conteúdos dos artigos, patentes e pedidos de patente, e todos os outros documentos e informação eletronicamente disponíveis ou mencionados aqui, são aqui incorporados a título de referência em sua totalidade até o mesmo ponto que se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada ser incorporada a título de  
15 referência. A requerente se reserva o direito de incorporar fisicamente ao presente pedido qualquer um e todos os materiais e informação de qualquer um de tais artigos, patentes, pedidos de patente ou outros documentos físicos e eletrônicos.

20 Os métodos ilustrativos descritos aqui podem ser praticados adequadamente na ausência de quaisquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, não especificamente aqui revelados. Então, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo", etc, devem ser lidos expansivamente e sem limitação. Ainda, os termos e expressões  
25 empregados aqui foram usados como termos de descrição e não de limitação, e não há nenhuma intenção no uso de tais termos e expressões

de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou suas porções. É reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Então, deve ser compreendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada por

5 modalidades preferidas e características opcionais, modificação e variação da invenção concretizada aqui revelada aqui podem realizadas por aqueles versados na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas estar dentro do escopo da presente invenção.

A invenção foi descrita amplamente e genericamente aqui. Cada

10 uma das espécies mais limitadas e agrupamentos subgenéricos se encaixando na descrição genérica também formam parte dos métodos. Isto inclui a descrição genérica dos métodos com uma condição ou limitação negativa removendo qualquer matéria objeto do gênero, sem importar se ou não o material excisado é especificamente aqui mencionado.

15 Outras modalidades estão nas reivindicações que seguem. Ainda, onde características ou aspectos dos métodos forem descritos em termos de grupos Markush, aqueles versados na técnica vão reconhecer que a invenção é também então descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinação da quantidade de estrona em uma amostra de fluido corporal, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) acidificação da dita amostra de fluido corporal com um agente em uma quantidade suficiente para liberar estrona de uma proteína que possa estar presente na dita amostra de fluido corporal;

(b) purificação de estrona a partir da dita amostra de fluido corporal através de cromatografia líquida;

(c) ionização da estrona purificada a partir da dita amostra de fluido corporal para produzir um ou mais íons detectáveis através de espectrometria de massa em tandem; e

(d) detecção da quantidade do(s) íon(s) de estrona através de espectrometria de massa em tandem em modo de íon negativo, onde a quantidade do(s) íon(s) de estrona está relacionada com a quantidade de estrona na dita amostra de fluido corporal,

em que os referido(s) íon(s) compreende(m) um ou mais íons de fragmento de um íon precursor de estrona no qual pelo menos um dos íons de fragmento apresenta uma relação de massa/carga de  $143,02 \pm 0,5$ .

2. Método de acordo com a reivindicações 1 3, caracterizado pelo fato de que o referido agente acidificante é ácido fórmico.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os referidos íons de estrona compreendem um ou mais íons selecionados do grupo que consiste em íons com uma relação de massa/carga de  $269,07 \pm 0,5$  e  $145,03 \pm 0,5$ .

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido método apresenta um limite de quantificação de menos do que ou igual a 500 pg/mL.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 4, caracterizado pelo fato de que a estrona é não é derivatizada antes da ionização.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 5, caracterizado pelo fato de que a cromatografia líquida é cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), em que a referida purificação compreende ainda opcionalmente uma cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC) seguida por uma cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 3 a 6, em que ambas as estronas glucuronizadas e não-glucuronizadas presentes na dita amostra de fluido corporal são detectadas e medidas através do método.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 3 a 7, caracterizado pelo fato de que a amostra de fluido corporal é soro, plasma ou urina.

**Fig 1. Linearidade – Curva de Calibragem Típica**