



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

**(11) PI 0920028-2 B1**

**(22) Data do Depósito: 30/09/2009**

**(45) Data de Concessão: 21/08/2018**



---

**(54) Título:** PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DI-HIDROTESTOSTERONA NÃO DERIVATIZADA (DHT) EM UMA AMOSTRA

**(51) Int.Cl.:** C12Q 1/02

**(30) Prioridade Unionista:** 06/10/2008 US 61/103,202, 17/11/2008 US 12/272,663

**(73) Titular(es):** QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS LLC

**(72) Inventor(es):** AMIT GHOSHAL; NIGEL J. CLARKE; RICHARD REITZ

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 05/04/2011

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE DI-HIDROTESTOSTERONA NÃO DERIVATIZADA (DHT) EM UMA AMOSTRA**".

5 **REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido de Patente US nº 12/272.663, depositado em 17 de novembro de 2008 e reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório US nº 61/103.202 depositado em 6 de outubro de 2008, dos quais cada um é incorporado aqui como referência em sua totalidade.

10 **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se à detecção de di-hidrotestosterona (DHT). Em um aspecto particular, a invenção refere-se a métodos para a detecção de di-hidrotestosterona (DHT) por espectrometria de massa.

15 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A descrição a seguir do fundamento da invenção é fornecida simplesmente como um auxiliador para o entendimento da invenção e não é admitido descrever ou constituir a arte anterior à invenção.

A di-hidrotestosterona (DHT) [(17 $\beta$ -hidróxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona)] é um hormônio esteroide com um peso molecular de 290,4 Dáltons. A DHT é um androgênio potente sintetizado por tecidos periféricos partindo da testosterona. A secreção excessiva de DHT pode produzir acne, hirsutismo e virilização através da conversão em testosterona. A DHT é um agente causal na hiperplasia da próstata e medidas no sangue podem ser utilizadas para avaliar a compatibilidade e a resposta aos inibidores de testosterona para a conversão em DHT.

Foram relatados os métodos de espectrometria de massa para a medida de DHT em uma amostra. Ver, por exemplo, Chang, Y. e outros, *Analyst* 2003, 128:363-8; Caruso, D. e outros, *Neurochem Int* 2008, 52:560-8; Wang, C. e outros, *Steroids* 2008, XXX:XXX-XXX (doi:10.1016/j.steroids.2008.05.004); Zhao, M. e outros, *Steroids* 2004, 69:721-6; Janzen, N. e outros, *J Chroma B* 2008, 861:117-22; Licea-Perez, H. e outros, *Steroids* 2008, 73:601-10; Kashiwagi, B. e outros, *J Andrology* 2005, 26:586-91; Kashiwagi, B. e outros,

*Urology* 2005, 66:218-23; Umera, M. e outros, *Cancer Sci* 2007, 99:81-86; e Mohler e outros, Pedido de Patente U.S. Nº. 11/973.127 (depositado em 8 de outubro de 2007).

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

- 5                   A presente invenção fornece métodos para a detecção da quantidade de di-hidrotestosterona (DHT) em uma amostra por espectrometria de massa, incluindo a espectrometria de massa em tandem. Preferencialmente, os métodos da invenção não incluem a derivatização de DHT em uma amostra antes da análise por espectrometria de massa.
- 10                   Em um aspecto, são fornecidos métodos para a determinação da quantidade de di-hidrotestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de fluido corporal. Os métodos deste aspecto incluem: (a) a purificação de DHT em uma amostra de fluido corporal por extração em fase sólida; (b) a ionização de DHT proveniente da amostra de fluido corporal para produzir um ou mais íons de DHT detectáveis por espectrometria de massa, em que os íons produzidos são selecionados do grupo que consiste em um íon precursor de DHT com uma razão de massa em relação à carga de  $291,10 \pm 0,50$  e um ou mais íons de fragmentos de DHT selecionados do grupo que consiste em  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ ; e (c) a detecção da quantidade de
- 15                   um ou mais íons de DHT por espectrometria de massa. Uma vez que a quantidade do um ou mais íons de DHT é medida, a quantidade de íon(s) de DHT é utilizada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada na amostra de teste. Em algumas modalidades, a espectrometria de massa é a espectrometria de massa em tandem. Em algumas modalidades, a extração
- 20                   em fase sólida e a análise por espectrometria de massa são realizadas de uma maneira on-line. Em algumas modalidades, a extração em fase sólida é realizada na forma de cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC). Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda a purificação de DHT em uma amostra de fluido corporal antes da espectrometria de massa
- 25                   com cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC); preferencialmente com processamento on-line. Em algumas modalidades, a amostra de fluido corporal é plasma ou soro. Em algumas modalidades, os métodos possuem
- 30

um limite de quantificação dentro da faixa de 5 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive. Em algumas modalidades, a quantidade de um ou mais íons de DHT detectados por espectrometria de massa é utilizada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada em uma amostra de teste através da comparação com um padrão interno; preferencialmente 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona. As características das modalidades listadas anteriormente podem ser combinadas sem limitação para uso nos métodos da presente invenção.

Em um segundo aspecto, são fornecidos métodos para a determinação da quantidade de di-hidrotestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de teste por espectrometria de massa. Os métodos deste aspecto incluem: (a) a purificação de DHT em uma amostra de teste com cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC); (b) a ionização de DHT proveniente de uma amostra de teste para produzir um ou mais íons de DHT detectáveis por espectrometria de massa; e (c) a detecção da quantidade de um ou mais íons de DHT por espectrometria de massa. Nestes métodos, a quantidade do(s) íon(s) de DHT medida é utilizada para calcular a quantidade de DHT na amostra de teste. Em algumas modalidades, a espectrometria de massa é espectrometria de massa em tandem. Em algumas modalidades, a purificação de DHT em uma amostra de teste compreende a purificação com cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC); preferencialmente configurada para processamento on-line. Em algumas modalidades, a amostra de teste é uma amostra de fluido corporal; preferencialmente plasma ou soro. Em algumas modalidades, os íons de DHT detectáveis por espectrometria de massa incluem um ou mais íons selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$ ,  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ . Em algumas modalidades, a etapa de ionização de DHT inclui a produção de um íon precursor com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$  e a produção de um ou mais íons de fragmentos selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ . Em algumas modalidades, os métodos possuem um limite de quantificação dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive. Em algumas modalidades, a quantidade de um ou mais íons de

DHT detectados por espectrometria de massa é utilizada para determinar a quantidade de DHT não derivatizada em uma amostra de teste através da comparação com um padrão interno; preferencialmente 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona. As características das modalidades listadas anteriormente podem ser combinadas sem limitação para uso nos métodos da presente invenção.

Em um terceiro aspecto, são fornecidos métodos para a determinação da quantidade de di-hidrotestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de fluido corporal por espectrometria de massa em tandem. Os métodos deste aspecto incluem: (a) a purificação de DHT proveniente de uma amostra de fluido corporal por cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC); (b) a produção de um íon precursor da dita DHT que possui uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$ ; (c) a produção de um ou mais íons de fragmentos de um íon precursor, em que pelo menos um do dito um ou mais íons de fragmentos compreendem um íon de fragmento selecionado do grupo de íons de fragmentos que possuem uma razão de massa/carga de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ ; e (d) a detecção da quantidade de um ou mais dos ditos íons gerados na etapa (b) ou (c) ou ambas. A quantidade de íons detectados é utilizada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada em uma amostra de fluido corporal. Em algumas modalidades, a purificação de DHT proveniente de uma amostra de teste compreende ainda cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC); preferencialmente configurada para processamento on-line. Em algumas modalidades, a amostra de fluido corporal é plasma ou soro. Em algumas modalidades, os métodos possuem um limite de quantificação dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive. Em algumas modalidades, a quantidade de um ou mais íons de DHT detectados por espectrometria de massa é utilizada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada na amostra de teste através da comparação com um padrão interno; preferencialmente 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona. As características das modalidades listadas anteriormente podem ser combinadas sem limitação para uso nos métodos da presente invenção.

Os métodos da presente invenção envolvem a combinação de

cromatografia líquida com espectrometria de massa. Em modalidades preferidas, a cromatografia líquida é HPLC. Uma modalidade preferida utiliza HPLC sozinha ou em combinação com um ou mais métodos de purificação tais como, por exemplo, HTLC e/ou precipitação e filtração de proteínas, para purificar DHT em amostras. Em outra modalidade preferida, a espectrometria de massa é espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

Em certas modalidades preferidas dos métodos divulgados aqui, a espectrometria de massa é realizada no modo de íons positivos. Alternativamente, a espectrometria de massa é realizada no modo de íons negativos. Várias fontes de ionização, incluindo, por exemplo, ionização química com pressão atmosférica (APCI) ou ionização por eletrospray (ESI) podem ser utilizadas nas modalidades da presente invenção. Em certas modalidades preferidas, a DHT é medida utilizando APCI no modo de íons positivos.

Em modalidades preferidas, os íons de DHT detectáveis em um espectrômetro de massa são selecionados do grupo que consiste em íons positivos com uma razão de massa/carga ( $m/z$ ) de  $291,10 \pm 0,50$ ,  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ . Em modalidades particularmente preferidas, um íon precursor de DHT possui  $m/z$  de  $291,10 \pm 0,50$  e um ou mais íons de fragmentos são selecionados do grupo que consiste em íons que possuem  $m/z$  de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ .

Em modalidades preferidas, é fornecido um padrão interno detectável separadamente na amostra, cuja quantidade também é determinada na amostra. Nestas modalidades, todos ou uma parte de tanto DHT endógena quanto o padrão interno presentes na amostra é ionizada para produzir um grande número de íons detectáveis em um espectrômetro de massa e um ou mais íons produzidos provenientes de cada um são detectadas por espectrometria de massa.

Um padrão interno preferido é 16, 16, 17- $d_3$  di-hidrotestosterona (16, 16, 17- $d_3$  DHT). Em modalidades preferidas, os íons detectáveis do padrão interno em um espectrômetro de massa são selecionados do grupo que consiste em íons positivos com  $m/z$  de  $294,10 \pm 0,50$  e  $258,20 \pm 0,50$ . Em modalidades particularmente preferidas, um íon precursor do padrão interno

possui m/z de  $294,10 \pm 0,50$ ; e um íon de fragmento de padrão interno possui m/z de  $258,20 \pm 0,50$ .

Em modalidades preferidas, a presença ou a quantidade do íon de DHT está relacionada à presença ou à quantidade de DHT em uma amostra de teste através da comparação com uma referência tal como 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona.

Em certas modalidades preferidas, o limite de quantificação (LOQ) de DHT está dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive; preferencialmente dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 100 ng/dL, inclusive; preferencialmente dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 50 ng/dL, inclusive; preferencialmente dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 25 ng/dL, inclusive; preferencialmente dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 15 ng/dL, inclusive; preferencialmente dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 10 ng/dL, inclusive; preferencialmente aproximadamente 5,0 ng/dL.

Como utilizado aqui, a não ser que seja citado de outra maneira, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" incluem referência no plural. Assim, por exemplo, uma referência a "uma proteína" inclui um grande número de moléculas de proteína.

Como utilizado aqui, "derivatização" significa a reação de duas moléculas para formar uma nova molécula. A derivatização uma molécula de um androgênio, tal como uma molécula de DHT, pode ser realizada com vários reagentes de derivatização bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Kashiwagi, B. e outros, *J Andrology* 2005, 26:586-91 e Kashiwagi, B. e outros, *Urology* 2005, 66:218-23, que relatam a derivatização de DHT com sulfonato de fluoro-1-metilpiridínio-P-toluleno antes da extração. Como utilizado aqui, "não derivatizado" significa não derivatizado. Assim, a di-hidrotestosterona (DHT), sem indicação de derivatização, é DHT não derivatizada.

Como utilizado aqui, o termo "purificação" ou "purificando" não se refere à remoção de todos os materiais da amostra sem ser o(s) analito(s) de interesse. Ao invés disso, a purificação refere-se a um procedimento que enriquece a quantidade de um ou mais analitos de interesse em relação a

outros componentes na amostra que podem interferir com a detecção do analito de interesse. A purificação da amostra através de vários meios pode permitir a redução relativa de uma ou mais substâncias interferentes, por exemplo, uma ou mais substâncias que podem ou não interferir com a detecção dos íons parentais ou filhos de DHT selecionados por espectrometria de massa. A redução relativa como este termo é utilizado não requer que qualquer substância, presente com o analito de interesse no material que será purificado, seja inteiramente removida por purificação.

Como utilizado aqui, o termo "amostra de teste" refere-se a qualquer amostra que possa conter DHT. Como utilizado aqui, 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, suor e similares.

Como utilizado aqui, o termo "cromatografia" refere-se a um processo em que uma mistura química carregada por um líquido ou um gás é separada em componentes como um resultado da distribuição diferencial das entidades químicas à medida que fluem ao redor ou através de uma fase líquida estacionária ou sólida.

Como utilizado aqui, o termo "cromatografia líquida" ou "LC" significa um processo de retardo seletivo de um ou mais componentes de uma solução fluida à medida que o fluido sofre percolação uniforme 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 de massa, (isto é, fase móvel), à medida que o fluido se move em relação à(s) fase(s) estacionária(s). Os exemplos de "cromatografia líquida" incluem cromatografia líquida em fase inversa (RPLC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC).

Como utilizado aqui, o termo "cromatografia líquida de alto desempenho" ou "HPLC" refere-se à cromatografia líquida em que o grau de separação é maior forçando a fase móvel sob pressão ao longo de uma fase estacionária, tipicamente uma coluna densamente compactada.

Como utilizado aqui, o termo "cromatografia líquida de alta turbulência" ou "HTLC" refere-se a uma forma de cromatografia que utiliza o escoamento turbulento do material que será analisado através da coluna compactada como a base para a realização da separação. A HTLC foi aplicada na preparação de amostras contendo dois fármacos não demoninados antes da análise por espectrometria de massa. Ver, por exemplo, Zimmer e outros, *J Chromatogr A* 854: 23-35 (1999); ver também, Patentes U.S. Nos. 5.968.367, 5.919.368, 5.795.469 e 5.772.874, que explicam adicionalmente a HTLC. Os peritos comuns na arte entendem "escoamento turbulento". Quando o fluido escoar lenta e suavemente, o fluxo é chamado de "fluxo laminar". Por exemplo, o fluido que se move ao longo de uma coluna de HPLC em vazões baixas é laminar. No fluxo laminar o movimento das partículas de fluido é ordenado com as partículas que se movem geralmente em linhas retas. Em velocidades maiores, a inércia da água vence as forças de fricção do fluido e resulta no escoamento turbulento. O fluido que não está em contato com o limite irregular "ultrapassa" aquele que é retardado pela fricção ou desviado por uma superfície irregular. Quando um fluido escoar de forma turbulenta, este flui em redemoinhos e voltas rápidas (ou vórtices), com mais "arrasto" que quando o fluxo é laminar. Muitas referências estão disponíveis para auxiliar na determinação de quando o fluxo 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)).

Como utilizado aqui, o termo "cromatografia a gás" ou "GC" refere-se à cromatografia em que a mistura de amostras é vaporizada e injetada em uma corrente de gás carreador (como nitrogênio ou hélio) que se move ao longo de uma coluna que contém uma fase estacionária composta de um líquido ou um sólido particulado e é separada em seus compostos componentes de acordo com a afinidade dos compostos pela fase estacionária.

Como utilizado aqui, o termo "coluna de partículas grandes" ou "coluna de extração" refere-se a uma coluna para cromatografia que contém

um diâmetro médio de partícula maior que aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ . Como utilizado neste contexto, o termo "aproximadamente" significa  $\pm 10\%$ .

Como utilizado aqui, o termo "coluna analítica" refere-se a uma coluna para cromatografia que possui placas cromatográficas suficientes para realizar uma separação de materiais em uma amostra que são eluídos da coluna suficientes para permitira uma determinação da presença ou da quantidade de um analito. Tais colunas são frequentemente distinguidas das "colunas de extração", que possuem a finalidade geral de separar ou de extrair o material retido dos materiais não retidos com a finalidade de obter uma amostra purificada para análise adicional. Como utilizado neste contexto, o termo "aproximadamente" significa  $\pm 10\%$ . Em uma modalidade preferida a coluna analítica contém partículas de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Como utilizado aqui, o termo "on-line" ou "em linha", por exemplo, como utilizado em "de maneira automatizada on-line" ou "extração on-line" refere-se a um procedimento realizado sem a necessidade de intervenção do operador. Em contraste, o termo "desconectado" como utilizado aqui se refere a um procedimento que requer intervenção manual de um operador. Assim, se as amostras forem submetidas à precipitação e os sobrenadantes forem então carregados manualmente em um injetor automático, as etapas de precipitação e de carga são desconectadas das etapas subsequentes. Em várias modalidades dos métodos, uma ou mais etapas podem ser realizadas de maneira automatizada on-line.

Como utilizado aqui, o termo "espectrometria de massa" ou "MS" refere-se a uma técnica analítica para identificar compostos através de sua massa. A MS refere-se a métodos de filtração, detecção e medida de íons com base em sua razão de massa em relação à carga ou "m/z". A tecnologia de MS inclui geralmente (1) a ionização dos compostos para formar compostos carregados; e (2) a detecção do peso molecular dos compostos carregados e o cálculo de uma razão de massa em relação à carga. Os compostos podem ser ionizados e detectados através de quaisquer meios adequados. Um "espectrômetro de massa" geralmente inclui um ionizador e um detector

de íons. Em geral, uma ou mais moléculas de interesse são ionizadas e os íons são subsequentemente introduzidos em um instrumento espectrográfico de massa em que, devido a uma combinação de campos magnéticos e elétricos, os íons seguem um caminho no espaço que é dependente da massa ("m") e da carga ("z"). Ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 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* 1999, 2: 264-76; e Merchant e Weinberger, *Electrophoresis* 2000, 21: 1164-67.

Como utilizado aqui, o termo "operando no modo de íons negativos" refere-se aos métodos de espectrometria de massa em que os íons negativos são gerados e detectados. O termo "operando no modo de íons positivos" como utilizado aqui, se refere aos métodos de espectrometria de massa em que os íons positivos são gerados e detectados.

Como utilizado aqui, o termo "ionização" ou "ionizando" refere-se ao processo de produção de um íon de analito que possui uma carga elétrica líquida igual a uma ou mais unidades de elétrons. Os íons negativos são aqueles que possuem uma carga negativa líquida de uma ou mais unidades de elétrons, enquanto que os íons positivos são aqueles que possuem uma carga positiva líquida de uma ou mais unidades de elétrons.

Como utilizado aqui, o termo "ionização de elétrons" ou "EI" refere-se a métodos em que um analito de interesse em uma fase gasosa ou de vapor interage com um fluxo de elétrons. O impacto dos elétrons com o analito produz íons do analito, que podem então ser submetidos a uma técnica de espectrometria de massas.

Como utilizado aqui, o termo "ionização química" ou "CI" refere-se a métodos em que um gás reagente (por exemplo, amônia) é submetido ao impacto de elétrons e os íons do analito são formados pela interação dos íons de gás reagentes e as moléculas de analito.

Como utilizado aqui, o termo "bombardeio rápido de átomos" ou "FAB" refere-se a métodos em que um feixe de átomos de alta energia (frequentemente Xe ou Ar) sofre impacto sobre uma amostra não volátil, removendo uma substância do absorvente e ionizando as moléculas contidas na amostra. As amostras de teste são dissolvidas em uma matriz líquida viscosa tal como glicerol, tioglicerol, álcool m-nitrobenzílico; 18-coroa-6 coroa éter, éter 2-nitrofeniloctílico, sulfolano, dietanolamina e trietanolamina. A escolha de uma matriz apropriada para um composto ou uma amostra é um processo empírico.

10 Como utilizado aqui, o termo "ionização com dessorção a laser auxiliada por matriz" ou "MALDI" refere-se a métodos em que uma amostra não volátil é exposta à irradiação com laser, que remove do absorvente e ioniza analitos na amostra através de várias vias de ionização, incluindo fotoionização, protonação, deprotonação e decaimento de clusters. Para  
15 MALDI, a amostra é misturada com uma matriz que absorve energia, que facilita a dessorção das moléculas de analito.

Como utilizado aqui, o termo "ionização de dessorção a laser intensificada na superfície" ou "SELDI" refere-se a outro método em que uma amostra não volátil é exposta à irradiação com laser, que remove do absorvente e ioniza os analitos na amostra através de várias vias de ionização, incluindo fotoionização, protonação, deprotonação e decaimento de clusters. Para SELDI, a amostra é tipicamente ligada a uma superfície que mantém preferencialmente um ou mais analitos de interesse. Como em MALDI, este processo também pode empregar um material de absorção de energia para  
20 facilitar a ionização.

Como utilizado aqui, o termo "ionização por eletrospray" ou "ESI", refere-se a métodos em que uma solução é passada ao longo de um comprimento curto de um tubo capilar, até o final onde é aplicado um potencial elétrico positivo ou negativo alto. A solução que atinge o final do tubo é vaporizada (nebulizada) em um jato ou um spray de gotículas muito pequenas de solução no vapor de solvente. Esta névoa de gotículas escoo ao longo de uma câmara de evaporação, que é aquecida ligeiramente para preve-

nir a condensação e evaporar o solvente. À medida que as gotículas ficam menores a densidade da carga de superfície elétrica aumenta até o momento tal que a repulsão natural entre as cargas similares faz com que os íons bem como as moléculas neutras sejam liberados.

5                    Como utilizado aqui, o termo "ionização química com pressão atmosférica" ou "APCI", refere-se a métodos de espectrometria de massa que são similares a ESI; entretanto, APCI produz íons através de reações de íon-molécula que ocorrem dentro de um plasma à pressão atmosférica. O plasma é mantido por uma descarga elétrica entre o capilar de spray e um  
10 eletrodo contador. Então os íons são tipicamente extraídos dentro do analisador de massa através do uso de um conjunto de estágios de escumadeira bomboeados diferencialmente. Um contrafluxo de gás N<sub>2</sub> seco e pré-aquecido pode ser utilizado para aumentar a remoção do solvente. A ionização da fase gasosa em APCI pode ser mais eficiente que em ESI para a  
15 análise de espécies polares.

O termo "fotoionização com pressão atmosférica" ou "APPI" como utilizado aqui se refere à forma de espectrometria de massa em que o mecanismo para a fotoionização da molécula M é a absorção de fótons e a expulsão de elétrons para formar o íon molecular M<sup>+</sup>. Devido ao fato de que  
20 a energia de fótons fica tipicamente logo acima do potencial de ionização, o íon molecular é menos susceptível à dissociação. Em muitos casos pode ser possível analisar as amostras sem a necessidade de cromatografia, economizando assim tempo e custos significativos. Na presença de vapor de água ou solventes próticos, o íon molecular pode extrair H para formar MH<sup>+</sup>. Isto  
25 tende a ocorrer se M tiver uma alta afinidade por prótons. Isto não afeta a acurácia da quantificação porque a soma de M<sup>+</sup> e MH<sup>+</sup> é constante. Os compostos de fármacos em solventes próticos são geralmente observados na forma de MH<sup>+</sup>, enquanto que os compostos não polares tais como naftaleno ou testosterona geralmente formam M<sup>+</sup>. Ver, por exemplo, Robb e outros,  
30 *Anal. Chem.* 2000, 72(15): 3653-3659.

Como utilizado aqui, o termo "plasma acoplado de forma induzida" ou "ICP" refere-se a métodos em que uma amostra interage com um gás

parcialmente ionizado a uma temperatura suficientemente alta de forma que a maioria dos elementos é atomizada e ionizada.

Como utilizado aqui, o termo "dessorção do campo" refere-se a métodos em que uma amostra não volátil de teste é colocada sobre uma superfície de ionização e um campo elétrico intenso é utilizado para gerar ions do analito.

Como utilizado aqui, o termo "dessorção" refere-se à remoção de um analito de uma superfície e/ou à entrada de um analito em uma fase gasosa. A dessorção térmica com dessorção a laser é uma técnica em que uma amostra que contém o analito é removida do absorvente termicamente para dentro da fase gasosa por um pulso de laser. O laser atinge a parte posterior de uma placa de 96 poços produzida especialmente com uma base de metal. O pulso de laser aquece a base e o aquecimento faz com que a amostra seja transferida para dentro da fase gasosa. A amostra na fase gasosa é então puxada para dentro do espectrômetro de massa.

Como utilizado aqui, o termo "monitoramento seletivo de íons" é um modo de detecção para um instrumento espectrométrico de massa em que apenas os íons dentro de uma faixa de massa relativamente limitada, tipicamente aproximadamente uma unidade de massa, são detectados.

Como utilizado aqui, "modo de reação múltipla", algumas vezes conhecido como "monitoramento selecionado de reação", é um modo de detecção para um instrumento espectrométrico de massa em que um íon precursor e um ou mais íons de fragmentos são seletivamente detectados.

Como utilizado aqui, o termo "limite de quantificação" ou "LOQ" refere-se ao ponto em que as medidas ficam quantitativamente significativas. A resposta do analito neste LOQ pode ser identificada, separada e reproduzida com um desvio padrão relativo (RSD %) de 20% e uma acurácia de 80% até 120%.

Como utilizado aqui, o termo "limite de detecção" ou "LOD" é o ponto em que o valor medido é maior que a incerteza associada ao mesmo. O LOD é o ponto em que um valor está além da incerteza associada com sua medida e é definido como duas vezes o RSD da média na concentração

zero.

Como utilizado aqui, uma "quantidade" de DHT em uma amostra de fluido corporal refere-se geralmente a um valor absoluto que reflete a massa de DHT detectável no volume de fluido corporal. Entretanto, uma  
5 quantidade também considera uma quantidade relativa em comparação com outra quantidade de DHT. Por exemplo, uma quantidade de DHT em um fluido corporal pode ser uma quantidade que é maior que um controle ou um nível normal de DHT normalmente presente.

O termo "aproximadamente" como utilizado aqui em referência  
10 às medidas quantitativas não incluindo a medida da massa de um íon, refere-se ao valor indicado mais ou menos 10%. Os instrumentos de espectrometria de massa podem variar ligeiramente na determinação da massa de certo analito. O termo "aproximadamente" no contexto da massa de um íon ou da razão de massa/carga de um íon refere-se a +/- 0,50 unidade de massa atômica.  
15

O sumário da invenção descrito acima não é limitante e outras características e vantagens da invenção serão evidentes partindo da descrição detalhada a seguir da invenção e das reivindicações.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

20 A figura 1 mostra uma representação gráfica do coeficiente de variação dos ensaios de um branco e cinco padrões utilizados para determinar o limite de quantificação do ensaio de DHT. Os detalhes são discutidos no Exemplo 5.

A figura 2 mostra a linearidade da quantificação de DHT em a-  
25 mostras de estoque diluídas em série utilizando um ensaio de LC-MS/MS. Os detalhes são descritos no Exemplo 6.

As figuras 3A e 3B mostram a correlação da determinação de DHT por um exemplo de método de HPLC-MS da presente invenção com a determinação de DHT através de um método de radioimunoensaio de refe-  
30 rência (RIA). A correlação mostrada na figura 3A foi determinada por regressão linear. A correlação mostrada na figura 3B foi determinada pela análise de Deming. Os detalhes são descritos no Exemplo 10.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os métodos da presente invenção são descritos para a medida da quantidade de DHT em uma amostra. Mais especificamente, os métodos de espectrometria de massa são descritos para a detecção e para a quantifi-  
5 cação de DHT em uma amostra de teste. Os métodos podem utilizar cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC), para realizar uma purificação dos analitos selecionados e combinar esta purificação com métodos de espectrometria de massa (MS), fornecendo assim um sistema de ensaio de alto rendimento para a detecção e para a quantificação de DHT em uma amostra  
10 de teste. As modalidades preferidas são particularmente bem adequadas para aplicação em grandes laboratórios clínicos para o ensaio de DHT automatizado.

Amostras de teste adequadas para uso nos métodos da presente invenção incluem qualquer amostra de teste que possa conter o analito de  
15 interesse. Em algumas modalidades preferidas, uma amostra é uma amostra biológica; que é, uma amostra obtida de qualquer fonte biológica, tal como um animal, uma cultura de células, uma cultura de órgão etc. Em certas modalidades preferidas, as amostras são obtidas de um animal mamífero, tal como um cachorro, um gato, um cavalo etc. Os animais mamíferos particu-  
20 larmente preferidos são primatas, mais preferencialmente seres humanos do sexo masculino ou do sexo feminino. As amostras particularmente preferidas incluem fluidos corporais tal como sangue, plasma, soro, saliva, fluido cerebrospinal ou amostras de tecidos. Tais amostras podem ser obtidas, por exemplo, de um paciente; isto é, uma pessoa viva, do sexo masculino ou do  
25 sexo feminino, que se apresenta a um ambiente clínico para diagnóstico, prognóstico ou tratamento de uma doença ou um estado de saúde. A amostra de teste é preferencialmente obtida de um paciente, por exemplo, soro ou plasma do sangue. Um volume de amostra de aproximadamente 0,5 mL é preferido; entretanto, amostras de aproximadamente 0,1 mL podem ser ana-  
30 lisadas.

A presente invenção considera kits para um ensaio de quantificação de DHT. Um kit para um ensaio de quantificação de DHT da presente

invenção pode incluir um kit que compreende um padrão interno, em quantidades suficientes para pelo menos um ensaio. Tipicamente, os kits também incluirão instruções gravadas em uma forma tangível (por exemplo, contidas em papel ou um meio eletrônico) para a utilização dos reagentes embalados para uso em um ensaio de medida para a determinação da quantidade de DHT.

A calibração e os conjuntos de QC para uso nas modalidades da presente invenção podem ser preparados utilizando plasma ou soro "despojado" (despojado de DHT): por exemplo, soro despojado com carvão e deslipidizado duplo. Todas as fontes de plasma ou soro despojado humano ou não humano devem ser verificadas para garantir que não contêm quantidades mensuráveis de DHT.

#### Preparação de Amostra para Espectrometria de Massa

As amostras de teste podem ser armazenadas abaixo da temperatura ambiente. É primeiramente permitido que as amostras de teste (incluindo os controles) armazenadas abaixo da temperatura ambiente atinjam a temperatura ambiente e são misturadas com vortex mecânico. Um padrão interno pode ser adicionado nas amostras de teste neste ponto.

As amostras podem então ser preparadas para espectrometria de massa através da extração líquido-líquido ou em fase sólida. Vários métodos podem ser utilizados para enriquecer a DHT em relação a outros componentes na amostra (por exemplo, proteína) antes da espectrometria de massa, incluindo, por exemplo, cromatografia líquida, filtração, centrifugação, cromatografia em camada fina (TLC), eletroforese incluindo eletroforese em capilares, separações por afinidade incluindo separações por imunoafinidade, métodos de extração incluindo extração com acetato de etila ou metanol extraction e o uso de agentes caotrópicos ou qualquer combinação dos anteriores ou similar.

A precipitação de proteínas é um método de preparação de uma amostra de teste, especialmente uma amostra biológica de teste, tal como soro ou plasma. Tais métodos de purificação de proteínas são bem conhecidos na arte, por exemplo, Polson e outros, *Journal of Chromatography B* 2003,

785:263-275, descrevem técnicas de precipitação de proteínas adequadas para uso nos métodos da presente invenção. A precipitação de proteínas pode ser utilizada para remover a maior parte da proteína da amostra deixando DHT no sobrenadante. As amostras podem ser centrifugadas para separar o sobrenadante líquido das proteínas precipitadas; alternativamente as amostras podem ser filtradas para remover as proteínas precipitadas. O sobrenadante ou o filtrado resultante pode então ser aplicado diretamente à análise por espectrometria de massa; ou alternativamente à cromatografia líquida e análise subsequente por espectrometria de massa. Em certas modalidades, o uso da precipitação de proteínas tal como, por exemplo, a precipitação de proteínas com ácido fórmico, pode evitar a necessidade de H-TLC ou outra extração on-line antes da espectrometria de massa ou da H-PLC e a espectrometria de massa.

Conseqüentemente, em algumas modalidades, a precipitação de proteínas, isoladamente ou em combinação com um ou mais métodos de purificação, pode ser utilizada para a purificação de DHT antes da espectrometria de massa. Nestas modalidades, os métodos podem envolver (1) a realização de uma precipitação de proteínas da amostra de interesse; e (2) a carga do sobrenadante diretamente sobre o espectrômetro de massa com LC sem utilizar a extração on-line ou a HTLC. Alternativamente, os métodos podem envolver (1) a realização de uma precipitação de proteínas da amostra de interesse; e (2) a carga do sobrenadante sobre uma HTLC utilizando extração on-line para purificação adicional antes da espectrometria de massa.

Um meio de purificação de amostra que pode ser utilizado antes da espectrometria de massa é a cromatografia líquida (LC). Certos métodos de cromatografia líquida, incluindo HPLC, se baseiam na tecnologia de fluxo laminar relativamente lenta. A análise de HPLC tradicional se baseia na compactação da coluna em que o fluxo laminar da amostra ao longo da coluna é a base para a separação do analito de interesse da amostra. O perito na arte entenderá que a separação em tais colunas é um processo de difusão e poderá selecionar instrumentos e colunas de HPLC que são adequados para uso com DHT. A coluna cromatográfica inclui tipicamente um meio

(isto é, um material de compactação) para facilitar a separação de grupamentos químicos (isto é, fracionamento). O meio pode incluir partículas minúsculas. As partículas incluem uma superfície ligada que interage com os vários grupamentos químicos para facilitar a separação dos grupamentos químicos. Uma superfície adequada ligada é uma superfície ligada hidrofóbica tal como uma superfície ligada com alquila ou uma ligada com ciano. As superfícies ligadas com alquila podem incluir grupos alquila ligados a C-4, C-8, C-12 ou C-18. Em modalidades preferidas, a coluna é uma coluna de ciano. A coluna cromatográfica inclui uma porta de entrada para o recebimento de uma amostra diretamente ou indiretamente proveniente de uma extração em fase sólida ou uma coluna de HTLC e uma porta de saída para a descarga de um efluente que inclui a amostra fracionada.

Em uma modalidade, a amostra pode ser aplicada na coluna de LC na porta de entrada, eluída com um solvente ou uma mistura de solventes e descarregada na porta de saída. Modos de solventes diferentes podem ser selecionados para a eluição do(s) analito(s) de interesse. Por exemplo, a cromatografia líquida pode ser realizada utilizando um modo de gradiente, um modo isocrático ou um modo politépico (isto é, misto). Durante a cromatografia, a separação dos materiais é realizada através de variáveis tais como a escolha do eluente (também conhecido como uma "fase móvel"), o modo de eluição, as condições de gradiente, a temperatura etc.

Em certas modalidades, um analito pode ser purificado através da aplicação de uma amostra em uma coluna sob condições em que o analito de interesse é retido de forma reversível pelo material de compactação da coluna, enquanto um ou mais outros materiais não são retidos. Nestas modalidades, pode ser empregada uma primeira condição de fase móvel em que o analito de interesse é retido pela coluna e uma segunda condição de fase móvel pode ser subsequentemente empregada para remover o material retido da coluna, uma vez que os materiais não retidos foram lavados. Alternativamente, um analito pode ser purificado através da aplicação de uma amostra em uma coluna sob condições de fase móvel em que o analito de interesse é eluído a uma taxa diferencial em comparação a um ou mais ou-

tros materiais. Tais procedimentos podem enriquecer a quantidade de um ou mais analitos de interesse em relação a um ou mais outros componentes da amostra.

5 Em uma modalidade preferida, a HPLC é realizada com um sistema cromatográfico com coluna hidrofóbica. Em certas modalidades preferidas, uma coluna analítica de ciano (por exemplo, uma coluna analítica BetaBasic Cyano da Thermo Scientific, Inc. (tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 50 x 2,1 mm) ou equivalente) é utilizada. Em certas modalidades preferidas, a HTLC e/ou a HPLC são realizadas utilizando ácido fórmico aquoso a 0,1%  
10 de Grau de HPLC e 100% de metanol como as fases móveis.

Através da seleção cuidadosa de válvulas e tubulações conectadas, duas ou mais colunas para cromatografia podem ser conectadas quando necessário de forma que o material seja passado de uma para a seguinte sem a necessidade de quaisquer etapas manuais. Em modalidades preferidas,  
15 a seleção de válvulas e tubulação é controlada por um computador pré-programado para realizar as etapas necessárias. Mais preferencialmente, o sistema de cromatografia também é conectado de uma maneira on-line ao sistema detector, por exemplo, um sistema de MS. Assim, um operador pode colocar uma bandeja de amostras em um autoamostrador e as operações  
20 restantes são realizadas sob controle de um computador, resultando na purificação e na análise de todas as amostras selecionadas.

Em algumas modalidades, a HTLC pode ser utilizada para a purificação de DHT antes da espectrometria de massa. Em tais modalidades, as amostras podem ser extraídas utilizando um cartucho de extração de H-  
25 TLC que captura o analito, então eluídas e submetidas à cromatografia em uma segunda coluna de HTLC ou sobre uma coluna analítica de HPLC antes da ionização. Por exemplo, a extração das amostras com um cartucho de extração de HTLC pode ser realizada com uma coluna compactada com tamanho de partícula grande (50  $\mu\text{m}$ ). A amostra eluída desta coluna pode  
30 então ser transferida para uma coluna analítica de HPLC, tal como uma coluna analítica de ciano, para purificação adicional antes da espectrometria de massa. Devido ao fato de que as etapas envolvidas nestes procedimentos

de cromatografia podem estar ligadas de uma maneira automatizada, a necessidade do envolvimento do operador durante a purificação do analito pode ser minimizada. Esta característica pode resultar em economias no tempo e nos custos e eliminar a oportunidade de erro do operador.

## 5 Detecção e Quantificação por Espectrometria de Massa

Em várias modalidades, a DHT presente em uma amostra de teste pode ser ionizada através de qualquer método conhecido pelo perito na arte. A espectrometria de massa é realizada utilizando um espectrômetro de massa, que inclui uma fonte de íons para a ionização da amostra fracionada e para a criação de moléculas carregadas para análise adicional. Por exemplo, a ionização da amostra pode ser realizada através da ionização de elétrons, ionização química, ionização por eletrospray (ESI), ionização de fótons, ionização química com pressão atmosférica (APCI), fotoionização, fotoionização com pressão atmosférica (APPI), bombardeio rápido de átomos (FAB), ionização secundária de líquidos (LSI), ionização por dessorção com laser auxiliada por matriz (MALDI), ionização de campos, dessorção do campo, ionização por termospray/plasmaspray, ionização de dessorção a laser intensificado na superfície (SELDI), ionização de plasma acoplado de forma induzida (ICP) e de feixes de partículas. O perito na arte entenderá que a escolha do método de ionização pode ser determinada com base no analito que será medido, no tipo de amostra, no tipo de detector, na escolha do modo positivo versus negativo etc.

A DHT pode ser ionizada no modo positivo ou negativo; Em modalidades preferidas, a DHT é ionizada por APCI no modo positivo. Em modalidades preferidas relacionadas, os íons de DHT estão em um estado gasoso e o gás de colisão inerte é argônio ou nitrogênio; preferencialmente argônio.

Nas técnicas de espectrometria de massa geralmente, após a amostra ter sido ionizada, os íons carregados positivamente ou carregados negativamente criados dessa maneira podem ser analisados para determinar a razão de massa em relação à carga. Os analisadores adequados para a determinação de razões de massa em relação à carga incluem analisado-

res quadripolares, analisadores de captura iônica e analisadores de tempo de voo. Os íons podem ser detectados utilizando vários modos de detecção. Por exemplo, os íons selecionados podem ser detectados, isto é, utilizando um modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) ou alternativamente, os íons podem ser detectados utilizando um modo de varredura, por exemplo, monitoramento de várias reações (MRM) ou monitoramento de reação selecionada (SRM). Preferencialmente, a razão de massa em relação à carga é determinada utilizando um analisador quadripolar. Por exemplo, em um instrumento "quadripolar" ou "de captura iônica quadripolar", os íons em um campo com frequência de rádio oscilante sofrem uma força proporcional ao potencial DC aplicado entre os eletrodos, a amplitude do sinal de RF e a razão de massa/carga. A voltagem e a amplitude podem ser selecionadas de forma que somente os íons que possuem uma razão de massa/carga particular percorrem o comprimento do quadripolo, enquanto que todos os outros íons são desviados. Assim, os instrumentos quadripolares podem atuar tanto como um "filtro de massa" quanto como um "detector de massa" para os íons injetados no instrumento.

Pode-se aumentar a resolução da técnica de MS através do emprego de "espectrometria de massa em tandem" ou "MS/MS". Nesta técnica, um íon precursor (também chamado de um íon parental) gerado partindo de uma molécula de interesse pode ser filtrado em um instrumento de MS e o íon precursor é subsequentemente fragmentado para produzir um ou mais íons de fragmentos (também chamado de íons filhos ou íons de produto) que são então analisados em um segundo procedimento de MS. Através da seleção cuidadosa dos íons precursores, somente os íons produzidos por certos analitos são passados para a câmara de fragmentação, onde as colisões com átomos de um gás inerte produzem os íons de fragmentos. Devido ao fato de que tanto íons precursores quanto de fragmentos são produzidos de uma maneira que pode ser reproduzida sob certo conjunto de condições de ionização/fragmentação, a técnica de MS/MS pode fornecer uma ferramenta analítica extremamente poderosa. Por exemplo, a combinação de filtração/fragmentação pode ser utilizada para eliminar substâncias interferentes

e pode ser particularmente útil em amostras complexas, tais como amostras biológicas.

O espectrômetro de massa fornece tipicamente ao usuário uma varredura iônica; isto é, a abundância relativa de cada íon com uma massa/carga particular ao longo de certa faixa (por exemplo, 100 até 1000 amu). Os resultados de um ensaio de analitos, isto é, um espectro de massa, podem ser relacionados com a quantidade do analito na amostra original através de vários métodos conhecidos na arte. Por exemplo, dado que tais parâmetros de amostragem e de análise são cuidadosamente controlados, a abundância relativa de certo íon pode ser comparada com uma tabela que converte tal abundância relativa em uma quantidade absoluta da molécula original. Alternativamente, padrões moleculares podem ser corridos com as amostras e uma curva padrão pode ser construída com base nos íons gerados partindo de tais padrões. A utilização de tal curva padrão, a abundância relativa de certo íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta da molécula original. Em certas modalidades preferidas, um padrão interno é utilizado para gerar uma curva padrão para o cálculo da quantidade de DHT. Os métodos de produção e de utilização de tais curvas padrões são bem conhecidos na arte e um perito comum é capaz de selecionar um padrão interno apropriado. Por exemplo, um esteroide marcado com isótopo pode ser utilizado como um padrão interno; em certas modalidades preferidas o padrão é 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona (16, 16, 17-d<sub>3</sub> DHT). Vários outros métodos para relacionar a quantidade de um íon com a quantidade da molécula original serão bem conhecidos pelos peritos comuns na técnica.

Uma ou mais etapas dos métodos podem ser realizadas utilizando máquinas automatizadas. Em certas modalidades, uma ou mais etapas de purificação são realizadas on-line e mais preferencialmente todas as etapas de purificação e de espectrometria de massa podem ser realizadas de uma maneira on-line.

Em certas modalidades, tal como MS/MS, em que os íons precursores são isolados para fragmentação adicional, a dissociação com ativação por colisão é frequentemente utilizada para gerar os íons de fragmentos para

detecção adicional. Em CAD, os íons precursores ganham energia através das colisões com um gás inerte e subsequentemente se fragmenta através de um processo referido como "decomposição unimolecular". Tem que ser depositada energia suficiente no íon precursor de forma que certas ligações dentro do íon podem ser quebradas devido a maior energia de vibração.

Em modalidades particularmente preferidas, a DHT é detectada e/ou quantificada utilizando MS/MS como a seguir. As amostras são submetidas à cromatografia líquida, preferencialmente HTLC; o fluxo de solvente líquido proveniente da coluna cromatográfica entra na interface de nebulização aquecida 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, DHT), contido no solvente nebulizado, é ionizado pela agulha de descarga corona da interface, que aplica uma grande voltagem à mistura de solvente/analito nebulizada. Os íons, por exemplo, os íons precursores, passam através do orifício do instrumento e entram no primeiro quadripolo. Os Quadripolos 1 e 3 (Q1 e Q3) são filtros de massa, que permitem a seleção de íons (isto é, a seleção de íons "precursores" e "de fragmento" em Q1 e Q3, respectivamente) com base em sua razão de massa em relação à carga ( $m/z$ ). O Quadripolo 2 (Q2) é a célula de colisão, onde os íons são fragmentados. O primeiro quadripolo do espectrômetro de massa (Q1) seleciona moléculas com as razões de massa em relação à carga de DHT. É permitido que os íons precursores com as razões de massa/carga corretas passem para dentro da câmara de colisão (Q2), enquanto que os íons indesejados com qualquer outra razão de massa/carga colidem com as laterais do quadripolo e são eliminados. Os íons precursores que entram no Q2 colidem com moléculas neutras de gás argônio e se fragmentam. Este processo é chamado de dissociação ativada por colisão (CAD). Os íons de fragmentos gerados são passados para dentro do quadripolo 3 (Q3), onde os íons de fragmentos de DHT são selecionados enquanto outros íons são eliminados.

Os métodos podem envolver MS/MS realizada no modo de íons positivos ou negativos; preferencialmente no modo de íons positivos. Utilizando métodos padronizados bem conhecidos na arte, um perito comum é capaz

de identificar um ou mais íons de fragmentos de um íon precursor particular de DHT que podem ser utilizados para a seleção no quadripolo 3 (Q3).

À medida que os íons colidem com o detector estes produzem um pulso de elétrons que são convertidos em um sinal digital. Os dados adquiridos são retransmitidos para um computador, que representa graficamente as contagens dos íons coletados versus o tempo. Os cromatogramas de massa resultantes são similares aos cromatogramas gerados nos métodos de HPLC tradicionais. As áreas sob os picos correspondentes a íons particulares ou a amplitude de tais picos, é medida e a área ou a amplitude é correlacionada à quantidade do analito de interesse. Em certas modalidades, a área sob as curvas ou a amplitude dos picos, para íon(s) de fragmento e/ou íons precursores é medida para determinar a quantidade de DHT. Como descrito anteriormente, a abundância relativa de certo íon pode ser convertida em uma quantidade absoluta do analito original, por exemplo, DHT, utilizando curvas padrões de calibração baseadas nos picos de um ou mais íons de um padrão molecular interno, tal como 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona.

Os exemplos a seguir servem para ilustrar a invenção. Não é pretendido de forma alguma que estes exemplos limitem o âmbito dos métodos.

## 20 **EXEMPLOS**

### Exemplo 1: Preparação de Amostras de Soro e de Reagentes

As amostras de plasma foram preparadas através da coleta de sangue em um tubo Vacutainer sem aditivos e foram permitidas que coagulassem durante aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas e o soro separado das células. As amostras que exibiam hemólise evidente foram excluídas.

Três soluções de estoque foram preparadas com DHT (Sigma Chemical Company, Cat. No. A7755 ou equivalente). Uma solução padrão de estoque de DHT de 1 mg/mL em metanol foi preparada em um frasco volumétrico. Uma parte da solução padrão de estoque de DHT foi então diluída em 1:100 para preparar uma solução padrão de estoque intermediária de DHT de 1.000.000 ng/dL em metanol. Uma parte da solução padrão de es-

toque intermediária foi utilizada para preparar uma segunda solução padrão de estoque intermediária de 2.000 ng/dL em metanol. A segunda solução padrão de estoque intermediária foi utilizada para preparar um padrão de trabalho de DHT de 200 ng/dL em soro despojado.

5                    16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona (CDN, Cat. No. D-5079 ou equivalente) foi utilizada para preparar uma solução de estoque de padrão interno de 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona em metanol deuterado a 1,0 mg/mL, que foi utilizada para preparar uma solução de estoque de padrão interno intermediária de 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona em metanol deu-  
10 terado a 1.000.000 ng/dL. 1,0 mL desta solução de estoque intermediária foi utilizado para preparar uma segunda solução de estoque de padrão interno intermediária a 1000 ng/dL de 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona em água. Uma solução de trabalho de padrão interno de 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-  
15 hidrotestosterona a 500 ng/dL foi preparada através da diluição de 20 mL da segunda solução de estoque de padrão interno intermediária com água DI até o volume em um frasco volumétrico de 200 mL.

**Exemplo 2: Extração de DHT das Amostras Utilizando Cromatografia Líquida**

Os padrões de temperatura ambiente, os controles e as amostras de pacientes foram preparados para cromatografia líquida (LC) primei-  
20 ramente misturando com vórtex mecânico.

300 µL de cada padrão, controle e amostra de paciente misturados com vórtex foram então transferidos para um poço de uma placa de 96 poços. 300 µL de ácido fórmico a 20 % e 100 µL de solução de trabalho de padrão interno de 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona a 500 ng/mL foram en-  
25 tão adicionados em cada um. As placas foram então misturadas com vórtex e incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos antes de serem carregadas para dentro de uma gaveta do autoamostrador.

A injeção das amostras foi realizada com um sistema de HTLC Cohesive Technologies Aria TLX-1 utilizando Aria OS V 1.5 ou um software  
30 mais recente. Uma solução de lavagem do autoamostrador foi preparada utilizando 60 % de acetonitrila, 30 % de isopropanol e 10 % de acetona (v/v).

O sistema de HTLC injetou automaticamente 100 µL das amos-

tras preparadas anteriormente em uma coluna TurboFlow (50 x 1,0 mm, coluna C-18 de 50 µm da Cohesive Technologies) compactada com partículas grandes. As amostras foram carregadas a uma vazão alta (5,0 mL/min, reagente de carregamento ácido fórmico a 0,1 %) para criar turbulência dentro da coluna de extração. Esta turbulência garantiu a ligação otimizada de DHT com as partículas grandes na coluna e a passagem da proteína residual e dos restos celulares para descarte.

Após o carregamento, a direção do fluxo foi invertida e a amostra foi eluída para a coluna analítica (Thermo Scientific, coluna BetaBasic Cyano, tamanho de partícula de 5 µm, 50 x 2,1 mm). Um gradiente binário de HPLC foi aplicado na coluna analítica, para separar DHT de outros analitos contidos na amostra. A fase móvel A era ácido fórmico a 0,1 % e a fase móvel B era metanol a 100 %. O gradiente da HPLC começava com um gradiente orgânico a 3 % que aumentava até 50 % em aproximadamente 4,75 minutos. A amostra separada foi então submetida à MS/MS para a quantificação de DHT.

A especificidade da DHT contra analitos similares foi determinada para os compostos a seguir (cada um em uma concentração de 1000 ng/dL em soro despojado): testosterona, estriol, desidroepiandrosterona (DHEA), estrona, pregnenolona, estradiol, androstenediona, 17-OH pregnenolona, corticosterona e aldosterona. Não foi observada qualquer interferência significativa para qualquer um destes compostos.

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

A MS/MS foi realizada utilizando um sistema Finnigan TSQ Quantum Ultra MS/MS (Thermo Electron Corporation). Os programas de software a seguir todos da ThermoElectron foram utilizados nos Exemplos descritos aqui: Quantum Tune Master V 1.2 ou mais recente, Xcalibur V 1.4 SR1 ou mais recente, TSQ Quantum 1.4 ou mais recente e LCQuan V 2.0 com SP1 ou mais recente. O solvente líquido/analito que saía da coluna analítica fluía para a interface do nebulizador aquecido de um analisador Thermo Finnigan MS/MS. A mistura de solvente/analito foi convertida em vapor na tubulação aquecida da interface. Os analitos no solvente nebulizado fo-

ram ionizados por APCI.

Os íons passaram para o primeiro quadripolo (Q1), que selecionou íons com uma razão de massa em relação à carga de  $291,10 \pm 0,50$  m/z. Os íons que entraram no Quadripolo 2 (Q2) colidiram com gás argônio para gerar fragmentos de íons, que foram passados para o quadripolo 3 (Q3) para seleção adicional. Simultaneamente, o mesmo processo utilizando espectrometria de massa com diluição de isótopos foi realizado com um padrão interno, 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona. As transições de massa a seguir foram utilizadas para a detecção e para a quantificação durante a validação na polaridade positiva.

Tabela 1. Transições de Massa para DHT (Polaridade Positiva)

<b>Análito</b>	<b>Íon Precursor (m/z)</b>	<b>Íon de Produto (m/z)</b>
DHT	291,10	255,20 e 79,2
16, 16, 17-d <sub>3</sub> di-hidrotestosterona (padrão interno)	294,10	258,2

**Exemplo 4: Precisão e Acurácia Intraensaio e Interensaio**

Três grupos de controles de qualidade (QC) foram preparados partindo de soro humano despojado com carvão (Golden West Biologicals, Temecula, CA) com adição de DHT em uma concentração de 25, 75 e 150 ng/dL, para cobrir a faixa presuntiva do ensaio que pode ser reportada.

Dez alíquotas provenientes de cada dos três grupos de QC foram analisadas em um único ensaio para determinar o coeficiente de variação (CV (%)) de uma amostra dentro de um ensaio. Foram determinados os valores a seguir:

Tabela 2. Variação e Acurácia Intra-Ensaio

	<b>Nível I (25 ng/dL)</b>	<b>Nível II (75 ng/dL)</b>	<b>Nível III (150 ng/dL)</b>
<b>Média (ng/dL)</b>	26,8	73,83	145,23
<b>Desvio Padrão (ng/dL)</b>	3,98	3,02	4,58
<b>CV (%)</b>	14,8 %	4,09 %	3,16 %
<b>Acurácia (%)</b>	107,2 %	98,44 %	96,82 %

Dez alíquotas provenientes de cada dos três grupos de QC foram analisadas ao longo de dez dias para determinar o coeficiente de variação (CV (%)) entre ensaios. Foram determinados os valores a seguir:

Tabela 3. Variação e Acurácia Inter-Ensaio

	<i>Nível I</i> (25 ng/dL)	<i>Nível I</i> (75 ng/dL)	<i>Nível III</i> (150 ng/dL)
<b>Média (ng/dL)</b>	24,51	75,18	152,31
<b>Desvio Padrão (ng/dL)</b>	2,47	3,32	5,81
<b>CV (%)</b>	10,06 %	4,42 %	3,82 %
<b>Acurácia (%)</b>	98,04 %	100,24 %	101,54 %

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

O LOQ é o ponto onde as medidas se tornam quantitativamente significativas. A resposta do analito neste LOQ pode ser identificado, distinto e reproduzido com uma precisão de 20% e uma acurácia de 80% até 120%.

10 O LOQ foi determinado através da análise de espécimes de soro despojado de analito com adição de concentrações de 1,25, 2,5, 5,0, 10,0 e 20,0 ng/dL de DHT (cinco réplicas em cada nível) então da determinação do CV. Os resultados foram representados graficamente (mostrado na Figura 1) e o LOQ foi determinado partindo da curva como sendo de 5,0 ng/dL.

15 O LOD é o ponto em que um valor está além da incerteza associada com sua medida e é definido como dois desvios padrões partindo da concentração zero. Para determinar o LOQ para o ensaio da DHT, amostras de branco de soro despojado com carvão foram corridas em dez réplicas. Os resultados destes ensaios foram analisados estatisticamente com um valor  
20 médio de 1,0 ng/dL e um desvio padrão de 0,5 ng/dL. Assim, o LOD para a DHT era de 2,0 ng/dL.

**Exemplo 6: Faixa e Linearidade Reportáveis do Ensaio**

Para estabelecer a linearidade da detecção de DHT no ensaio, um branco especificado como padrão zero e cinco padrões de soro com adi-  
25 ções em concentrações variando de 10 até 200 ng/dL foram analisados. O valor de correlação da faixa de concentrações testada (0 até 200 ng/dL) era

maior que 0,995. Um gráfico que mostra a linearidade da curva padrão até 200 ng/dL é mostrado na Figura 2.

**Exemplo 7: Especificidade da Matriz**

A especificidade da matriz foi avaliada através da diluição de amostras de soro dos pacientes duas vezes e quatro vezes com as matrizes a seguir: soro despojado do analito (soro despojado com carvão, Cat. No. SP1070, Golden West Biologicals, Inc.), soro desfibrinado humano normal (Cat. No. 1101-00, Biocell Labs, Carson, CA 90746 ou equivalente) e água deionizada (DI). Duas amostras de soro receberam a adição das concentrações a seguir de DHT: 92,4 ng/dL, 64,1 ng/dL. Os soros que receberam adições foram então diluídos 2x e 4x com as matrizes anteriores e foram analisados. O estudo indicou que todas as três matrizes podiam ser utilizadas para diluir as amostras com valores de analito acima da faixa linear. Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 4.

15 Tabela 4. Especificidade da Matriz de DHT

	<i>Fator de Diluição</i>	<i>Concentração Esperada (ng/dL)</i>	<i>Soro Despojado (ng/dL)</i>	<i>Soro Bio-cell (ng/dL)</i>	<i>Água DI (ng/dL)</i>
<b>Amostra 1</b>	--	92,4			
	2x	46,2	47,7	50,8	49
	4x	21,1	24,1	21,1	22,5
<b>Amostra 2</b>	--	64,1			
	2x	32,05	37,3	34,6	34,8
	4x	16,03	19,1	18,9	16,4

**Exemplo 8: Estudos de Recuperação**

As amostras de controle de qualidade (QC) foram utilizadas para os estudos de recuperação. Amostras de QC baixo, médio e alto receberam adição de DHT a uma concentração de 112,5, 137,5 e 175 ng/dL, respectivamente.

Foi realizado um estudo de recuperação destas amostras que receberam adição de DHT (cinco ensaios em cada concentração). A recuperação absoluta foi calculada através da divisão da concentração detectada

de DHT nas amostras agrupadas pela concentração de DHT esperada nas amostras. As recuperações médias eram de 89,01 %, 90,15 % e 94,93 %, respectivamente. Todas as recuperações eram aceitáveis, isto é, estavam dentro da faixa de 80% até 120%.

#### 5 **Exemplo 9: Estudos dos Espécimes**

Os espécimes eram derivados de tubos de coleta de amostras sem aditivos (para o soro), tubos separadores de soro (SST), tubos com EDTA ou tubos com heparina sódica (36 amostras, 18 de homens e 18 de mulheres). Quatro amostras com EDTA de homens e uma de mulher, bem como uma amostra com heparina de mulher, foram excluídas como sendo inadequadas para a análise devido ao fato de sofrerem hemólise forte ou de serem lipêmicas. As restantes foram testadas em relação à capacidade de aplicação dos presentes métodos a vários tipos de amostras. A análise dos dados revelou que havia pouca diferença entre os níveis de DHT detectados nos vários tipos de amostras (ver as Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Comparações dos Tipos de Amostras para DHT, Homens

<b>Tipo de Amostra</b>	<b>DHT Média (ng/dL)</b>	<b>Desvio Padrão (ng/dL)</b>
<b>Soro</b>	34,1925	20,5794
<b>SST</b>	39,2492	17,1014
<b>EDTA</b>	37,4059	15,6782
<b>Heparina</b>	42,7082	15,0552

Tabela 6. Comparações dos Tipos de Amostras para DHT, Mulheres

<b>Tipo de Amostra</b>	<b>DHT Média (ng/dL)</b>	<b>Desvio Padrão (ng/dL)</b>
<b>Soro</b>	26,6482	14,6048
<b>SST</b>	24,3991	18,8417
<b>EDTA</b>	28,9525	12,8975
<b>Heparina</b>	23,0536	18,8463

#### **Exemplo 10: Comparação de Estudos de HTLC-MS e RIA**

Um estudo de comparação foi realizado utilizando amostras de pacientes que cobrem a faixa reportada, analisadas através dos presentes métodos com um método de radioimunoensaio de referência (RIA). A corre-

lação foi determinada através de regressão linear (mostrada na figura 3A) e da análise de Deming (mostrada na figura 3B). O coeficiente de correlação para a análise de regressão linear era de 0,88.

Os conteúdos dos artigos, das patentes e dos pedidos de patentes e todos os outros documentos e informação disponíveis eletronicamente mencionados ou citados aqui, são incorporados aqui como referência em sua totalidade até a mesma extensão como se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada como sendo incorporada como referência. Os requerentes reservam o direito de incorporar fisicamente neste pedido de patente qualquer e todos os materiais e informação provenientes de quaisquer tais artigos, patentes, pedidos de patentes ou outros documentos físicos e eletrônicos.

Os métodos descritos aqui de forma ilustrativa podem ser adequadamente praticados na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, não especificamente divulgadas aqui. Assim, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo" etc. devem ser lidos de maneira expansiva e sem limitação. Adicionalmente, os termos e as expressões empregados aqui foram utilizados como termos de descrição e não de limitação e não há intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características exibidas e descritas ou partes das mesmas. É reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do âmbito da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente divulgada pelas modalidades preferidas e características opcionais, a modificação e a variação da invenção incorporadas na mesma divulgadas aqui podem ser recorridas pelos peritos na arte e que tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do âmbito desta invenção.

A invenção foi descrita aqui de forma ampla e genérica. Cada uma das espécies e agrupamentos subgenéricos mais limitados que se encaixam dentro da divulgação genérica também faz parte dos métodos. Isto inclui a descrição genérica dos métodos com uma condição ou uma limitação negativa que remove qualquer assunto de objetivo do gênero, indepen-

dentamente do fato do material cortado ser ou não especificamente citado aqui.

Outras modalidades estão dentro das reivindicações a seguir. Em adição, quando características ou aspectos dos métodos são descritos em termos de grupos de Markush, os peritos na arte reconhecerão que a invenção também é descrita aqui em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo de Markush.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a determinação da quantidade de dihidrotestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de fluido corporal, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 a. a ionização da DHT não derivatizada, purificada da amostra de fluido corporal por extração em fase sólida (SPE), sob condições adequadas para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa; em que os ditos íons compreendem um ou mais íons selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$ ,  $255,20 \pm$   
10  $0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ ; e

b. a determinação da quantidade de um ou mais íons por espectrometria de massa e a utilização da quantidade determinada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada na amostra de fluido corporal, em que a dita SPE é realizada na forma de cromatografia líquida  
15 de alta turbulência (HTLC).

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita espectrometria de massa é espectrometria de massa em tandem.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado  
20 pelo fato de que a dita ionização compreende a produção de um íon precursor com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$  e a produção de um ou mais íons de fragmentos selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ .

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a  
25 3, caracterizado pelo fato de que as ditas SPE e espectrometria de massa são realizadas de uma maneira on-line.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dita purificação compreende ainda a purificação com cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

30 6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita SPE e a dita HPLC são ligadas para o processamento on-line da amostra.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de fluido corporal é plasma ou soro.

5 8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o dito processo possui um limite de quantificação dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a quantidade de um ou mais íons determinados por espectrometria de massa está relacionada à presença ou à  
10 quantidade de DHT não derivatizada na amostra de teste através da comparação com um padrão interno.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o padrão interno compreende 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona.

11. Processo para a determinação da quantidade de di-  
15 hidrottestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de teste por espectrometria de massa, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. a ionização da DHT não derivatizada, purificada da amostra de teste por cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC), sob condições adequadas para produzir um ou mais íons detectáveis por espectrometria de  
20 massa; e

b. a determinação da quantidade de um ou mais íons por espectrometria de massa e a utilização da quantidade determinada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada na amostra de fluido corporal.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo  
25 fato de que a dita espectrometria de massa é espectrometria de massa em tandem.

13. Processo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a dita purificação compreende ainda a purificação com cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

30 14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 13, caracterizado pelo fato de que a dita HTLC e a dita HPLC são configuradas para o processamento on-line.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de teste é uma amostra de fluido corporal.

5 16. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de teste é plasma ou soro.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, caracterizado pelo fato de que o um ou mais íons detectáveis por espectrometria de massa compreendem um ou mais íons selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$ ,  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ .

18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 17, caracterizado pelo fato de que a dita ionização compreende a produção de um íon precursor com uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$  e um ou mais íons de fragmentos selecionados do grupo que consiste em íons com uma razão de massa/carga de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ .

19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 18, caracterizado pelo fato de que o dito processo possui um limite de quantificação dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive.

20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 19, caracterizado pelo fato de que a quantidade de um ou mais íons detectados por espectrometria de massa está relacionada à presença ou à quantidade de DHT não derivatizada na amostra de teste através da comparação com um padrão interno.

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o padrão interno compreende 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona.

22. Processo para a determinação da quantidade de di-hidrotestosterona não derivatizada (DHT) em uma amostra de fluido corporal por espectrometria de massa em tandem, caracterizado pelo fato de que compreende:

30 a. a produção de um íon precursor de DHT não derivatizada, purificada de uma amostra de fluido corporal por cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC), que possui uma razão de massa/carga de  $291,10 \pm 0,50$ ;

b. a produção de um ou mais íons de fragmentos do dito íon precursor, em que pelo menos um do dito um ou mais íons de fragmentos compreendem um íon de fragmento selecionado do grupo de íons que possui uma razão de massa/carga de  $255,20 \pm 0,50$  e  $79,20 \pm 0,50$ ; e

5 c. a determinação da quantidade de um ou mais dos ditos íons gerados na etapa (b) ou (c) ou ambas e a utilização da quantidade determinada para calcular a quantidade de DHT não derivatizada na dita amostra de teste.

10 23. Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a dita purificação compreende ainda a purificação com cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a dita HTLC e a dita HPLC são configuradas para o processamento on-line.

15 25. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de fluido corporal é plasma ou soro.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 25, caracterizado pelo fato de que o dito processo possui um limite de quantificação dentro da faixa de 5,0 ng/dL até 200 ng/dL, inclusive.

20 27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, caracterizado pelo fato de que a quantidade de um ou mais íons determinados por espectrometria de massa está relacionada à presença ou à quantidade de DHT não derivatizada na amostra de teste através da comparação com um padrão interno.

25 28. Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o padrão interno compreende 16, 16, 17-d<sub>3</sub> di-hidrotestosterona.

FIG. 1

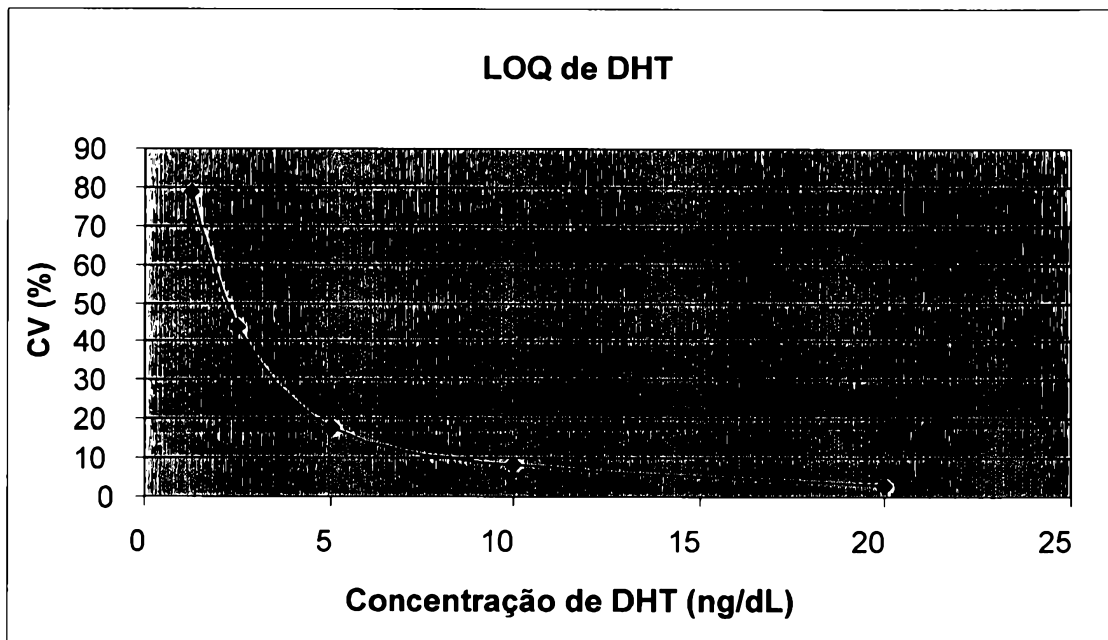


FIG. 2

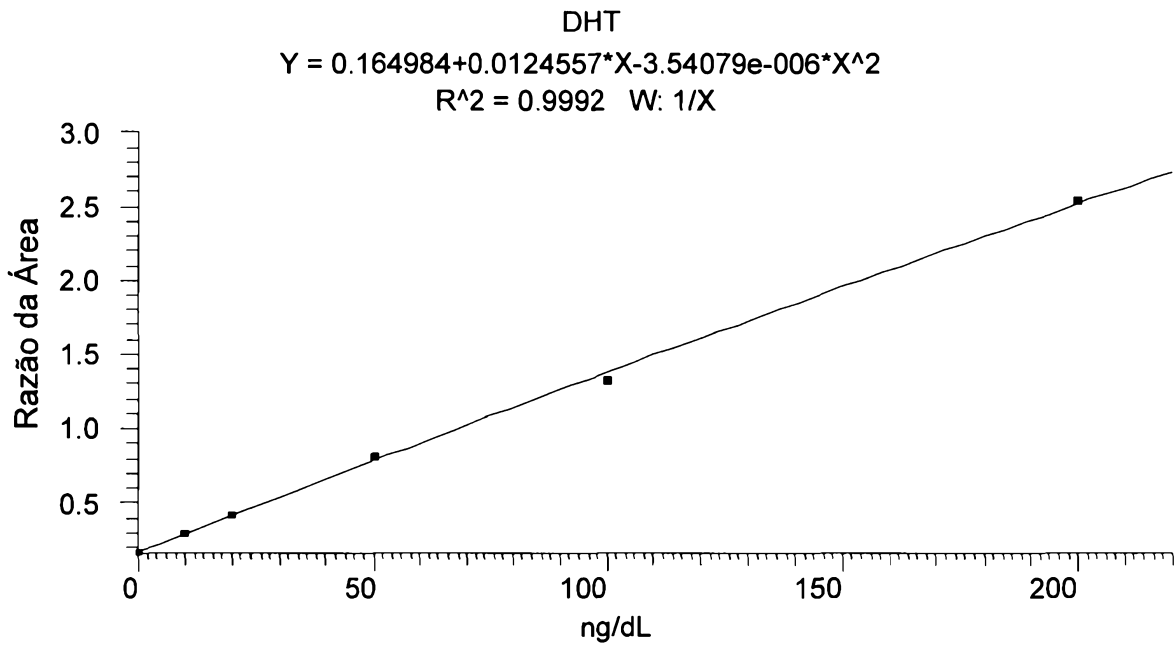


FIG. 3A

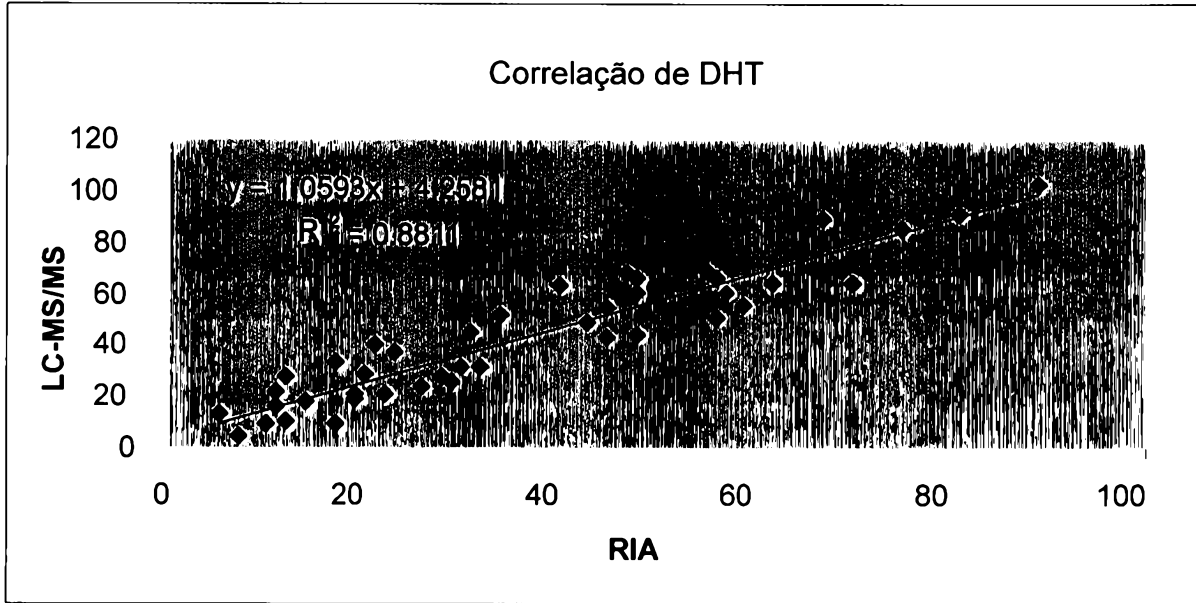


FIG. 3B

