



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

**(21) BR 112021000983-3 A2**



\* B R 1 1 2 0 2 1 0 0 0 9 8 3 A 2 \*

**(22) Data do Depósito: 23/07/2019**

**(43) Data da Publicação Nacional: 20/04/2021**

**(54) Título:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO, KIT, ADUTO COVALENTE, USO DE UM COMPOSTO E MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

**(51) Int. Cl.:** C07D 249/06; C07D 257/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 24/07/2018 EP 18185354.0.

**(71) Depositante(es):** F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

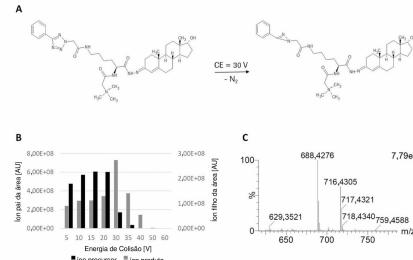
**(72) Inventor(es):** DIETER HEIDL; HANS-PETER JOSEL; UWE KOBOLD; CHRISTOPH SEIDEL; MARTIN REMPT; ANDREAS LEINENBACH; GIUSEPPE PRENCIPE; SILVIA BAECHER; SIMON FERDINAND LOIBL; ANNA-SKROLLAN GEIERMANN; JELENA MILIC; ROBERT HAHN; NICOLE PIRKL.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2019069729 de 23/07/2019

**(87) Publicação PCT:** WO 2020/020849 de 30/01/2020

**(85) Data da Fase Nacional:** 19/01/2021

**(57) Resumo:** A presente invenção refere-se a reagentes que são adequados para serem usados em espectrometria de massa, bem como a métodos de determinação de espectrometria de massa de moléculas de analito usando os referidos reagentes.



**“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO, KIT, ADUTO COVALENTE, USO DE UM COMPOSTO E MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[0001] A presente invenção refere-se a reagentes que são adequados para serem usados em espectrometria de massa, bem como a métodos de determinação de espectrometria de massa de moléculas de analito usando os referidos reagentes.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] A espectrometria de massa (MS) é uma técnica amplamente usada para a análise qualitativa e quantitativa de substâncias químicas que variam de pequenas moléculas a macromoléculas. Em geral, é um método muito sensível e específico, permitindo inclusive a análise de amostras biológicas complexas, por exemplo, amostras ambientais ou clínicas. No entanto, para vários analitos, especialmente se analisados a partir de matrizes biológicas complexas, tais como o soro, a sensibilidade da medição permanece um problema.

[0003] Frequentemente, a MS é combinada com técnicas cromatográficas, particularmente cromatografia gasosa e líquida, tal como, por exemplo, HPLC. Aqui, a molécula de interesse analisada é separada cromatograficamente e é individualmente submetida a análise de espectrometria de massa (Higashi et al. (2016) *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 p. 181-190).

[0004] Há, no entanto, ainda a necessidade de aumentar a sensibilidade dos métodos de análise de MS, principalmente para a análise de analitos que têm baixa abundância ou quando poucos materiais (tais como tecidos de biópsia) estão disponíveis.

[0005] Na técnica, vários reagentes de derivatização são

conhecidos que visam melhorar a sensibilidade da medição para esses analitos. Entre outros, reagentes compreendendo unidades carregadas e unidades de perda neutra que são combinadas em uma única unidade funcional (por exemplo, WO 2011/091436). Outros reagentes que compreendem unidades separadas são estruturalmente relativamente grandes, o que afeta o fluxo de trabalho geral da preparação da amostra e a medição da MS (Rahimoff et al. (2017) *J. Am. Chem. Soc.* 139 (30), p. 10359–10364). Os reagentes de derivatização conhecidos são, por exemplo, reagentes do tipo Cookson, Amplifex Diene, Amplifex Keto, Girard T, Girard P. Todos estes apresentam desvantagens devido a eficiências de marcação muitas vezes insuficientes, geração de isômeros estruturais devido à química de acoplamento, eficiências de ionização não ideais, desvantagens para a separação cromatográfica após o acoplamento, comportamento de fragmentação não ideal devido a muitas vias de fragmentação e necessidade de altas energias de colisão.

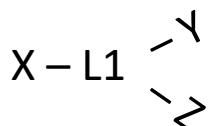
[0006] Existe, portanto, uma necessidade urgente na técnica para reagentes de derivatização que permitam uma detecção sensível de analitos a partir de matrizes biológicas complexas, bem como exibindo uma estrutura química que não influencia negativamente o fluxo de trabalho da medição da MS. Isto é de particular importância em um acesso aleatório, configuração de MS de alto rendimento, em que vários analitos diferentes exibindo diferentes propriedades químicas devem ser medidos em um curto período de tempo.

[0007] A presente invenção refere-se a um novo reagente que permite uma determinação sensível de moléculas de analito, tais como esteroides, proteínas e outros tipos de analitos, em amostras biológicas. O reagente é projetado em uma maneira modular para permitir a adaptação individual para necessidades específicas que surgem na medição de certos

analitos ou para adaptações específicas de fluxo de trabalho.

**DESCRÍÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO**

[0008] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a compostos de fórmula A:



em que:

X é um grupo reativo capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração permanentemente carregada, e

incluindo qualquer sal do mesmo.

[0009] Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende o composto do primeiro aspecto da presente invenção.

[00010] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se a um kit que compreende o composto do primeiro aspecto ou a composição do segundo aspecto da presente invenção.

[00011] Em um quarto aspecto, a presente invenção refere-se a um aduto covalente que compreende uma molécula de analito e o composto do primeiro aspecto da presente invenção, em particular a um aduto covalente formado pela reação química de uma molécula de analito e o composto do primeiro aspecto da presente invenção.

[00012] Em um quinto aspecto, a presente invenção refere-se ao

uso do composto do primeiro aspecto da presente invenção, ou à composição do segundo aspecto da presente invenção, ou ao kit do terceiro aspecto da presente invenção para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito.

[00013] Em um sexto aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito compreendendo as etapas:

- (a) reagir a molécula de analito com o composto do primeiro aspecto da presente invenção, em que um aduto covalente da molécula de analito e do composto de fórmula A é formado, e
- (b) submeter o aduto da etapa (a) a uma análise de espectrometria de massa.

#### LISTA DE FIGURAS

[00014] **Figura 1: Derivado de Marca 1-Testosterona:** (A) Fragmentação de MS de derivado de Marca 1-Testosterona: perda neutra de N2 ( $\Delta$  28 Da) do grupo tetrazol; (B) Área de pico do íon precursor (eixo esquerdo, barras pretas) e íon produto (eixo direito, barras cinza) do derivado de Marca 1-Testosterona em diferentes energias de colisão; (C) Espectro de MS da Marca 1-Testosterona a uma energia de colisão de 30 V. Íon precursor m/z 716,4305, íon produto m/z 688,4276.

[00015] **Figura 2: Comparação com outros Reagentes:** (A) As áreas de pico dos íons produto em intensidades máximas de Marca 1-Testosterona, Reagente A-testosterona e Testosterona  $^{13}\text{C}_3$  não marcada a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (B) Áreas de pico dos íons precursores em intensidades máximas de Marca 1-Testosterona, Reagente A-Testosterona, Amplifex Keto-Testosterona, Girard P-Testosterona e  $^{13}\text{C}_3$ -Testosterona não marcada a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

[00016] **Figura 3: Derivado de Marca 2-Testosterona:** (A) Fragmentação de MS de derivado de Marca 2-Testosterona: perda neutra de

N2 ( $\Delta$  28 Da) do grupo tetrazol; (B) Área de pico do íon precursor (eixo esquerdo, barras pretas) e íon produto (eixo direito, barras cinza) do derivado de Marca 2-Testosterona em diferentes energias de colisão; (C) Espectro de MS da Marca 2-Testosterona a uma energia de colisão de 35 V. Íon precursor m/z 684,4454, íon produto m/z 656,4384.

[00017] **Figura 4: Representação esquemática** do fluxo de trabalho determinando o fator de intensificação do reagente de derivatização Marca 16, Marca 17 e Marca 18 em comparação com testosterona não derivatizada e testosterona derivatizada de Amplifex.

[00018] **Figura 5: Ilustração esquemática da "separação" ("splitting") do pico:** Descreve a capacidade do sistema cromatográfico de separar os diferentes isômeros resultantes da reação de derivatização da molécula de analito uns dos outros.

#### DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00019] Antes da presente invenção ser descrita em detalhes abaixo, deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes específicos descritos neste documento, pois estes podem variar. Também deve ser entendido que a terminologia usada neste documento tem o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não se destina a limitar o escopo da presente invenção, que será limitado somente pelas reivindicações anexas. A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles técnicos no assunto a que esta invenção pertence.

[00020] Vários documentos são citados ao longo do texto deste relatório descritivo. Cada um dos documentos citados neste documento (incluindo todas as patentes, pedidos de patentes, publicações científicas, especificações do fabricante, instruções etc.), sejam supra ou infra, são

incorporados por meio deste por referência em sua totalidade. No caso de um conflito entre as definições ou ensinamentos de tais referências incorporadas e definições ou ensinamentos recitados no presente relatório descritivo, o texto do presente relatório descritivo tem precedência.

[00021] A seguir, os elementos da presente invenção serão descritos. Esses elementos são listados com modalidades específicas, no entanto, deve ser entendido que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os vários exemplos descritos e modalidades preferidas não devem ser interpretados como limitando a presente invenção apenas às modalidades explicitamente descritas. Esta descrição deve ser entendida para apoiar e abranger modalidades que combinam as modalidades explicitamente descritas com qualquer número dos elementos divulgados e/ou preferidos. Além disso, quaisquer permutações e combinações de todos os elementos descritos neste pedido devem ser consideradas divulgadas pela descrição do presente pedido, a menos que o contexto indique o contrário.

### **DEFINIÇÕES**

[00022] A palavra "compreender", e variações como "compreende" e "compreendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de um número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

[00023] Conforme usado neste documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um(a)" e "o(a)" incluem referentes plurais a menos que o contexto dite claramente o contrário.

[00024] Porcentagens, concentrações, quantidades e outros dados numéricos podem ser expressos ou apresentados neste documento em um formato de "faixa". Deve ser entendido que tal formato de faixa é usado

meramente por conveniência e brevidade e, portanto, deve ser interpretado de forma flexível para incluir não apenas os valores numéricos explicitamente citados como os limites da faixa, mas também para incluir todos os valores numéricos individuais ou subfaixas englobadas dentro dessa faixa, como se cada valor numérico e subfaixa fosse explicitamente recitado. A título de ilustração, um faixa numérico de "4% a 20%" deve ser interpretado para incluir não apenas os valores explicitamente recitados de 4% a 20%, mas também para incluir valores individuais e subfaixas dentro da faixa indicada. Assim, incluídos nesta faixa numérica estão valores individuais, tais como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ... 18, 19, 20% e subfaixas, tais como de 4-10%, 5-15%, 10-20%, etc. Este mesmo princípio se aplica a faixas que recitam valores mínimos ou máximos. Além disso, tal interpretação deve ser aplicada independentemente da amplitude da faixa ou das características descritas.

[00025] O termo "cerca de", quando usado em conexão com um valor numérico, pretende abranger valores numéricos dentro de uma faixa tendo um limite inferior que é 5% menor do que o valor numérico indicado e tendo um limite superior que é 5% maior do que o valor numérico indicado.

[00026] O termo “Espectrometria de Massa” (“Espec. de Massa” ou “MS”) refere-se a uma tecnologia analítica usada para identificar compostos por sua massa. A MS é um método de filtragem, detecção e medição de íons com base em sua razão massa-carga, ou "m/z". A tecnologia MS geralmente inclui (1) ionizar os compostos para formar compostos carregados; e (2) detectar o peso molecular dos compostos carregados e calcular uma razão massa-carga. Os compostos podem ser ionizados e detectados por qualquer meio adequado. 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 onde, devido a uma combinação de campos

magnéticos e elétricos, os íons seguem um caminho no espaço que depende da massa ("m") e carga ("z"). O termo "ionização" ou "ionizar" refere-se ao processo de gerar um íon analito tendo uma carga elétrica líquida igual a uma ou mais unidades de elétrons. Os íons negativos são aqueles que têm uma carga líquida negativa de uma ou mais unidades de elétrons, enquanto os íons positivos são aqueles que têm uma carga líquida positiva de uma ou mais unidades de elétrons. O método de MS pode ser realizado em "modo de íon negativo", em que íons negativos são gerados e detectados, ou em "modo de íon positivo", em que íons positivos são gerados e detectados.

[00027] "Espectrometria de massa em tandem" ou "MS/MS" envolve várias etapas de seleção de espectrometria de massa, em que a fragmentação do analito ocorre entre as etapas. Em um espectrômetro de massa em tandem, os íons são formados na fonte de íons e separados pela razão massa-carga no primeiro estágio da espectrometria de massa (MS1). Íons de uma relação massa-carga particular (íons precursores ou íon parental) são selecionados e íons de fragmento (ou íons filhos) são criados por dissociação induzida por colisão, reação íon-molécula ou fotodissociação. Os íons resultantes são então separados e detectados em um segundo estágio de espectrometria de massa (MS2).

[00028] A maioria dos fluxos de trabalho de amostra em MS inclui ainda a preparação da amostra e/ou etapas de enriquecimento, em que, por exemplo, o(s) analito(s) de interesse são separados da matriz usando, por exemplo, cromatografia gasosa ou líquida. Normalmente, para a medição da espectrometria de massa, as seguintes três etapas são realizadas:

1. uma amostra compreendendo um analito de interesse é ionizada, geralmente por formação de aduto com cátions, frequentemente por protonação para cátions. A fonte de ionização inclui, mas não está limitada a, ionização por eletropulverização (ESI) e ionização química a pressão

atmosférica (APCI);

2. os íons são classificados e separados de acordo com sua massa e carga. A espectrometria de mobilidade iônica de forma de onda assimétrica de alto campo (FAIMS) pode ser usada como filtro de íons; e

3. os íons separados são então detectados, por exemplo, no modo de reação múltipla (MRM), e os resultados são exibidos em um gráfico.

[00029] O termo "ionização por eletropulverização" ou "ESI" refere-se a métodos nos quais uma solução é passada ao longo de um pequeno tubo capilar, ao final do qual é aplicado um alto potencial elétrico positivo ou negativo. A solução que chega ao fim do tubo é vaporizada (nebulizada) em um jato ou spray de gotículas muito pequenas de solução em vapor de solvente. Esta névoa de gotículas flui através de uma câmara de evaporação, que é ligeiramente aquecida para evitar a condensação e evaporar o solvente. À medida que as gotículas ficam menores, a densidade da carga elétrica da superfície aumenta até o momento em que a repulsão natural entre as cargas semelhantes faz com que íons e também moléculas neutras sejam liberados.

[00030] O termo "ionização química à pressão atmosférica" ou "APCI," refere-se a métodos de espectrometria de massa que são semelhantes a ESI; entretanto, APCI produz íons por reações íon-molécula que ocorrem dentro de um plasma à pressão atmosférica. O plasma é mantido por uma descarga elétrica entre o capilar de pulverização e um contra-eletrodo. Em seguida, os íons são normalmente extraídos para o analisador de massa pelo uso de um conjunto de estágios de skimmer com bombeamento diferencial. Um contrafluxo de gás Ni seco e pré-aquecido pode ser usado para melhorar a remoção do solvente. A ionização de fase gasosa em APCI pode ser mais eficaz do que ESI para analisar entidades menos polares.

[00031] "Modo de reação múltipla" ou "MRM" é um modo de

detecção para um instrumento MS no qual um íon precursor e um ou mais íons de fragmento são seletivamente detectados.

[00032] "Espectrometria de massa em tandem" ou "MS/MS" envolve várias etapas de seleção de espectrometria de massa, em que a fragmentação do analito ocorre entre as etapas. Em um espectrômetro de massa em tandem, os íons são formados na fonte de íons e separados pela razão massa-carga no primeiro estágio da espectrometria de massa (MS1). Íons de uma relação massa-carga particular (íons precursores ou íon parental) são selecionados e íons de fragmento (ou íons filhos) são criados por dissociação induzida por colisão, reação íon-molécula ou fotodissociação. Os íons resultantes são então separados e detectados em um segundo estágio de espectrometria de massa (MS2).

[00033] Como um espectrômetro de massa separa e detecta íons de massas ligeiramente diferentes, ele distingue facilmente diferentes isótopos de um determinado elemento. A espectrometria de massa é, portanto, um método importante para a determinação precisa da massa e caracterização de analitos, incluindo, mas não se limitando a, analitos de baixo peso molecular, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Suas aplicações incluem a identificação de proteínas e suas modificações pós-tradicionais, a elucidação de complexos proteicos, suas subunidades e interações funcionais, bem como a medição global de proteínas em proteômica. A sequenciação de novo de peptídeos ou proteínas por espectrometria de massa pode normalmente ser realizada sem conhecimento prévio da sequência de aminoácidos.

[00034] A determinação de espectrometria de massa pode ser combinada com métodos analíticos adicionais, incluindo métodos cromatográficos, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC), particularmente HPLC, e/ou técnicas de separação baseadas em mobilidade iônica.

[00035] No contexto da presente divulgação, o termo "analito", "molécula de analito" ou "analito(s) de interesse" são usados de forma intercambiável, referindo-se à espécie química a ser analisada por meio de espectrometria de massa. As espécies químicas adequadas para serem analisadas por meio de espectrometria de massa, ou seja, analitos, podem ser qualquer tipo de molécula presente em um organismo vivo, incluindo, mas não se limitando a, ácido nucleico (por exemplo, DNA, mRNA, miRNA, rRNA etc.), aminoácidos, peptídeos, proteínas (por exemplo, receptor de superfície celular, proteína citosólica, etc.), metabólitos ou hormônios (por exemplo, testosterona, estrogênio, estradiol, etc.), ácidos graxos, lipídios, carboidratos, esteróides, cetosteróides, secosteróides (por exemplo, vitamina D), moléculas características de uma determinada modificação de outra molécula (por exemplo, frações de açúcar ou resíduos de fosforila em proteínas, resíduos de metila no DNA genômico) ou uma substância que foi internalizada pelo organismo (por exemplo, fármacos terapêuticos, drogas de abuso, toxinas, etc.) ou um metabólito de tal substância. Esse analito pode servir como um biomarcador. No contexto da presente invenção, o termo "biomarcador" refere-se a uma substância dentro de um sistema biológico que é usada como um indicador de um estado biológico do referido sistema.

[00036] O termo "limite de detecção" ou "LOD" é a concentração mais baixa de um analito que o procedimento bioanalítico pode diferenciar com segurança o analito do ruído de fundo.

[00037] O termo "limite de quantificação" ou "LOQ" refere-se à menor quantidade de um analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis, com um desvio padrão relativo (RSD%) de 20% e uma precisão de 80% a 120%.

[00038] Os analitos podem estar presentes em uma amostra de interesse, por exemplo, uma amostra biológica ou clínica. O termo "amostra" ou

"amostra de interesse" é usado de forma intercambiável neste documento, referindo-se a uma parte ou pedaço de um tecido, órgão ou indivíduo, sendo normalmente menor do que tal tecido, órgão ou indivíduo, destinado a representar a totalidade do tecido, órgão ou indivíduo. Após a análise, uma amostra fornece informações sobre o estado do tecido ou o estado de saúde ou doença de um órgão ou indivíduo. Exemplos de amostras incluem, mas não estão limitados a, amostras de fluidos, tais como sangue, soro, plasma, fluido sinovial, fluido espinhal, urina, saliva e fluido linfático, ou amostras sólidas, tais como manchas de sangue secas e extratos de tecido. Outros exemplos de amostras são culturas de células ou culturas de tecidos.

[00039] No contexto da presente divulgação, a amostra pode ser derivada de um "indivíduo" ou "sujeito". Normalmente, o sujeito é um mamífero. Mamíferos incluem, mas não estão limitados a, animais domesticados (por exemplo, vacas, ovelhas, gatos, cães e cavalos), primatas (por exemplo, humanos e primatas não humanos, como macacos), coelhos e roedores (por exemplo, camundongos e ratos).

[00040] Antes de ser analisada por espectrometria de massa, uma amostra pode ser pré-tratada de maneira específica para amostra e/ou analito. No contexto da presente divulgação, o termo "pré-tratamento" refere-se a quaisquer medidas necessárias para permitir a análise subsequente de um analito desejado por meio de Espectrometria de Massa. As medidas de pré-tratamento normalmente incluem, mas não estão limitadas à eluição de amostras sólidas (por exemplo, eluição de manchas de sangue secas), adição de reagente hemolisante (HR) a amostras de sangue total e adição de reagentes enzimáticos a amostras de urina. Também a adição de padrões internos (ISTD) é considerada como pré-tratamento da amostra.

[00041] O termo "reagente de hemólise (HR)" refere-se a reagentes que lisam células presentes em uma amostra, no contexto desta

invenção, reagentes de hemólise, em particular, referem-se a reagentes que lisam a célula presente em uma amostra de sangue incluindo, mas não se limitando a, eritrócitos presentes em amostras de sangue total. Um reagente de hemólise bem conhecido é água ( $H_2O$ ). Outros exemplos de reagentes de hemólise incluem, mas não estão limitados a água desionizada, líquidos com alta osmolaridade (por exemplo, ureia a 8M), líquidos iônicos e diferentes detergentes.

[00042] Normalmente, um padrão interno (ISTD) é uma quantidade conhecida de uma substância que exibe propriedades semelhantes às do analito de interesse quando submetida ao fluxo de trabalho de detecção por espectrometria de massa (ou seja, incluindo qualquer pré-tratamento, enriquecimento e etapa de detecção real). Embora o ISTD exiba propriedades semelhantes às do analito de interesse, ele ainda é claramente distinguível do analito de interesse. Exemplificado, durante a separação cromatográfica, tal como cromatografia gasosa ou líquida, o ISTD tem aproximadamente o mesmo tempo de retenção que o analito de interesse da amostra. Assim, tanto o analito quanto o ISTD entram no espectrômetro de massa ao mesmo tempo. O ISTD, no entanto, exibe uma massa molecular diferente do analito de interesse da amostra. Isso permite uma distinção da espectrometria de massa entre íons do ISTD e íons do analito por meio de suas diferentes razões de massa/carga ( $m/z$ ). Ambos estão sujeitos à fragmentação e fornecem íons filhos. Esses íons filhos podem ser distinguidos por meio de suas razões  $m/z$  entre si e dos respectivos íons parentais. Consequentemente, uma determinação separada e quantificação dos sinais do ISTD e do analito podem ser realizadas. Uma vez que o ISTD foi adicionado em quantidades conhecidas, a intensidade do sinal do analito da amostra pode ser atribuída a uma quantidade quantitativa específica do analito. Assim, a adição de um ISTD permite uma comparação relativa da quantidade de analito detectado e permite a identificação e

quantificação inequívoca do(s) analito(s) de interesse presente(s) na amostra quando o(s) analito(s) atinge(m) o espectrômetro de massa. Normalmente, mas não necessariamente, o ISTD é uma variante marcada isotopicamente (compreendendo, por exemplo,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , ou  $^{15}\text{N}$  etc.) do analito de interesse.

[00043] Além do pré-tratamento, a amostra também pode ser submetida a uma ou mais etapas de enriquecimento. No contexto da presente divulgação, o termo "primeiro processo de enriquecimento" ou "primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento" refere-se a um processo de enriquecimento que ocorre subsequentemente ao pré-tratamento da amostra e fornece uma amostra que compreende um analito enriquecido em relação à amostra inicial. O primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento pode compreender precipitação química (por exemplo, usando acetonitrila) ou o uso de uma fase sólida. Fases sólidas adequadas incluem, mas não estão limitadas a cartuchos de extração de fase sólida (SPE) e esferas. As esferas podem ser não magnéticas, magnéticas ou paramagnéticas. As esferas podem ser revestidas de forma diferente para serem específicas para o analito de interesse. O revestimento pode ser diferente dependendo do uso pretendido, ou seja, da molécula de captura pretendida. É bem conhecido pelo técnico qual revestimento é adequado para qual analito. As esferas podem ser feitas de vários materiais diferentes. As esferas podem ter vários tamanhos e compreender uma superfície com ou sem poros.

[00044] No contexto da presente divulgação, o termo "segundo processo de enriquecimento" ou "segundo fluxo de trabalho de enriquecimento" refere-se a um processo de enriquecimento que ocorre subsequentemente ao pré-tratamento e ao primeiro processo de enriquecimento da amostra e fornece uma amostra compreendendo um analito enriquecido em relação à amostra inicial e a amostra após o primeiro processo de enriquecimento.

[00045] O termo "cromatografia" refere-se a um processo no qual

uma mistura química transportada por um líquido ou gás é separada em componentes como um resultado da distribuição diferencial das entidades químicas conforme elas fluem ao redor ou sobre uma fase líquida ou sólida estacionária.

[00046] O termo "cromatografia líquida" ou "LC" refere-se a um processo de retardo seletivo de um ou mais componentes de uma solução de fluido à medida que o fluido se infiltra uniformemente 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 este fluido se move em relação à(s) fase(s) estacionária(s). Métodos em que a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel (por exemplo, tolueno como a fase móvel, sílica como a fase estacionária) são denominados cromatografia líquida de fase normal (NPLC) e métodos em que a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel fase (por exemplo, mistura de água-metanol como a fase móvel e C18 (octadecilsilila) como a fase estacionária) são denominados cromatografia líquida de fase reversa (RPLC).

[00047] "Cromatografia líquida de alta eficiência" ou "HPLC" refere-se a um método de cromatografia líquida em que o grau de separação é aumentado forçando a fase móvel sob pressão através de uma fase estacionária, normalmente uma coluna densamente compactada. Normalmente, a coluna é preenchida com uma fase estacionária composta de partículas de formato irregular ou esférico, uma camada monolítica porosa ou uma membrana porosa. HPLC é historicamente dividida em duas subclasses diferentes com base na polaridade das fases móvel e estacionária. Métodos em que a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel (por exemplo, tolueno como a fase móvel, sílica como a fase estacionária) são denominados cromatografia líquida de fase normal (NPLC) e o oposto (por exemplo, mistura

de água-metanol como a fase móvel e C18 (octadecilsilila) como a fase estacionária) é denominado cromatografia líquida de fase reversa (RPLC). LC Micro refere-se a um método de HPLC usando uma coluna tendo um diâmetro interno de coluna amanhã, normalmente abaixo de 1 mm, por exemplo, cerca de 0,5 mm. "Cromatografia líquida de ultra alta eficiência" ou "UHPLC" refere-se a um método de HPLC usando uma pressão de 120 MPa (17.405 lbf/in<sup>2</sup>), ou cerca de 1200 atmosferas. LC rápido refere-se a um método de LC usando uma coluna com um diâmetro interno como mencionado acima, com um comprimento curto <2 cm, por exemplo, 1 cm, aplicando uma taxa de fluxo como mencionado acima e com uma pressão como mencionado acima (Micro LC, UHPLC). O protocolo rápido de LC rápido inclui uma etapa de captura/lavagem/eluição usando uma única coluna analítica e realiza LC em um tempo muito curto <1 min.

[00048] Outros modi LC bem conhecidos incluem cromatografia de interação hidrofílica (HILIC), LC de exclusão por tamanho, LC de troca iônica e LC de afinidade.

[00049] A separação de LC pode ser LC de canal único ou LC de múltiplos canais, compreendendo uma pluralidade de canais de LC dispostos em paralelo. Em LC, os analitos podem ser separados de acordo com a sua polaridade ou valor log P, tamanho ou afinidade, como é geralmente conhecido pelo técnico no assunto.

[00050] No contexto da presente invenção, o termo "composto" refere-se a uma substância química tendo uma estrutura química específica. O referido composto pode compreender uma ou mais unidades funcionais. Cada unidade pode cumprir uma funcionalidade diferente, ou duas ou mais unidades funcionais podem cumprir a mesma função. As unidades funcionais incluem, mas não estão limitadas a unidades reativas, unidades carregadas e unidades de perda neutra.

[00051] O termo “unidade de perda neutra” refere-se a uma unidade que é capaz de liberar uma entidade sem carga, ou seja, que é capaz de liberar uma entidade neutra. Normalmente, a entidade neutra compreende um único átomo ou uma pluralidade de átomos. Uma unidade de perda neutra pode ter carga neutra, positiva ou negativa. Uma unidade de perda neutra é, sob as condições de MS, por exemplo, quando submetida a dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo, em MS tripla quadrupola, capaz de fragmentação, em que pelo menos uma entidade neutra é liberada. Após a liberação da entidade neutra, o restante da unidade de perda neutra permanece com sua carga original. Consequentemente, caso a unidade de perda neutra não seja carregada, ela permanece neutra após a perda da entidade neutra. Caso a unidade de perda neutra seja carregada positivamente, ela permanece positiva após a perda da entidade neutra. Caso a unidade de perda neutra seja carregada negativamente, ela permanece negativa após a perda da entidade neutra. Normalmente, mas não necessariamente, uma entidade neutra é liberada. No entanto, também mais de uma entidade neutra pode ser liberada. Isso pode ocorrer em um único evento de fragmentação (ou seja, duas ou mais entidades neutras são liberadas simultaneamente) ou em dois ou mais eventos de fragmentação subsequentes (uma entidade neutra é relançada primeiro e uma ou mais entidades neutras adicionais são liberadas subsequentemente).

[00052] O termo "fragmentação" refere-se à dissociação de uma única molécula em duas ou mais moléculas separadas. Conforme usado no presente documento, o termo fragmentação refere-se a um evento de fragmentação específico, no qual o ponto de ruptura na molécula parental em que o evento de fragmentação ocorre é bem definido e em que as duas ou mais moléculas filhas resultantes do evento de fragmentação são bem caracterizadas. É bem conhecido pelo técnico como determinar o ponto de

ruptura de uma molécula parental, bem como as duas ou mais moléculas filhas resultantes. As moléculas filhas resultantes podem ser estáveis ou podem se dissociar em eventos de fragmentação subsequentes. Exemplificado, no caso de uma molécula parental sob fragmentação compreender uma unidade de triazol ou tetrazol, o técnico é capaz de determinar com base na estrutura geral da molécula onde a unidade de triazol ou tetrazol se fragmentará para liberar uma entidade de N<sub>2</sub>, ou seja, as moléculas filhas resultantes seriam uma molécula de N<sub>2</sub> e uma molécula parental sem N<sub>2</sub> (ainda compreendendo o restante da unidade triazol ou tetrazol). A fragmentação pode ocorrer por meio de dissociação induzida por colisão (CID), dissociação de captura de elétrons (ECD), dissociação de transferência de elétrons (ETD), dissociação de transferência de elétrons negativos (NETD), dissociação de desprendimento de elétrons (EDD), fotodissociação, particularmente dissociação multifotônica infravermelha (IRMPD) e dissociação radiativa infravermelha de corpo negro (BIRD), dissociação induzida por superfície (SID), dissociação C-trap de alta energia (HCD), fragmentação remota de carga.

[00053] O termo "unidade reativa" refere-se a uma unidade capaz de reagir com outra molécula, ou seja, que é capaz de formar uma ligação covalente com outra molécula, tal como um analito de interesse. Normalmente, essa ligação covalente é formada com um grupo químico presente na outra molécula. Consequentemente, após a reação química, a unidade reativa do composto forma uma ligação covalente com um grupo químico adequado presente na molécula de analito. Como este grupo químico presente na molécula do analito cumpre a função de reagir com a unidade reativa do composto, o grupo químico presente na molécula do analito também é referido como o "grupo funcional" do analito. A formação da ligação covalente ocorre em cada caso em uma reação química, em que a nova ligação covalente é formada entre os átomos do grupo reativo e os grupos funcionais do analito. É

bem conhecido pelo técnico no assunto que, na formação da ligação covalente entre o grupo reativo e os grupos funcionais do analito, os átomos são perdidos durante esta reação química.

[00054] O termo "unidade carregada" refere-se a uma unidade de um composto que compreende uma fração carregada. A cobrança pode ser permanente ou pode ser alterada dependendo das condições do ambiente. Normalmente, a carga é positiva ou negativa. No caso de a unidade carregada compreender pelo menos uma fração permanentemente carregada, considera-se que a carga não se altera com base nas condições circundantes, por exemplo, a alteração do valor do pH não conduz a uma alteração na carga da unidade permanentemente carregada.

[00055] As diferentes unidades funcionais de um composto podem ser conectadas por meio de um ligante. O termo ligante refere-se a estruturas químicas ramificadas ou não ramificadas, normalmente compreendendo unidades de alquila substituídas ou não substituídas, e pode opcionalmente também incluir um ou mais heteroátomos. Um ligante conecta diferentes unidades funcionais dentro de um composto. Normalmente, um ligante não ramificado conecta duas unidades funcionais em um composto, ou seja, um ligante não ramificado também pode ser referido como um ligante bifuncional ou como um ligante linear. Um ligante ramificado pode conectar três, quatro, cinco ou mais unidades funcionais, dependendo de quantas ramificações o referido ligante compreende.

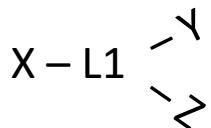
[00056] No contexto da presente divulgação, o termo "aduto" refere-se ao produto produzido pela reação de um composto com uma molécula de analito. Essa reação leva à formação de uma ligação covalente entre o composto e o analito. Consequentemente, o termo aduto refere-se ao produto de reação ligado covalentemente formado pela reação do composto com a molécula de analito.

[00057] Um "kit" é qualquer manufatura (por exemplo, uma embalagem ou recipiente) compreendendo pelo menos um reagente, por exemplo, um medicamento para o tratamento de um distúrbio, ou uma sonda para detectar especificamente um gene ou proteína biomarcadores da invenção. O kit é preferencialmente promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para realizar os métodos da presente invenção. Os kits podem ainda compreender um meio de veículo sendo compartmentalizado para receber em íntimo confinamento um ou mais meios de recipientes, tais como frascos, tubos e similares, cada um dos meios de recipiente compreendendo um dos elementos separados sendo usado no método. Os kits podem compreender ainda um ou mais outros recipientes compreendendo outros materiais, incluindo, mas não se limitando a, tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso. Um marcador pode estar presente no recipiente para indicar que a composição usada para uma terapia específica ou aplicação não terapêutica, e pode também indicar orientações para uso in vivo ou in vitro, tais como aqueles descritos acima. O código do programa de computador pode ser fornecido em um meio de armazenamento de dados ou dispositivo, tal como um meio de armazenamento óptico (por exemplo, um CD) ou diretamente em um computador ou dispositivo de processamento de dados. Além disso, o kit pode compreender quantidades padrão para os biomarcadores, conforme descrito em outro lugar neste documento para fins de calibração.

[00058] Uma "bula" é usada para referir-se a instruções normalmente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos ou medicamentos, que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contra-indicações, outros produtos terapêuticos a serem combinados com o produto embalado e/ou avisos sobre o uso de tais produtos terapêuticos ou medicamentos, etc

### MODALIDADES

[00059] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a compostos de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração permanentemente carregada, em particular compreendendo uma fração permanentemente carregada, e

incluindo qualquer sal do mesmo.

[00060] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto de fórmula A de acordo com a presente invenção compreende uma unidade reativa X que é capaz de reagir com uma molécula de analito. A unidade reativa X é capaz de reagir com uma molécula de analito de tal modo que uma ligação covalente entre o composto de fórmula A e a molécula de analito seja formada. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X forma uma ligação covalente com o composto de fórmula A. Em particular, a ligação covalente é formada entre a unidade reativa X do composto de fórmula A e um grupo funcional presente na molécula do analito.

[00061] Dependendo dos grupos funcionais presentes na molécula de analito a ser determinada, o técnico no assunto selecionará uma unidade reativa X apropriada para o composto de fórmula A. É de

conhecimento comum decidir qual unidade reativa X se qualificará para a ligação a um grupo funcional de um analito de interesse.

[00062] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo funcional selecionado a partir do grupo que consiste em grupo carbonila, grupo dieno, grupo hidroxila, grupo amina, grupo imina, grupo tiol, grupo diol, grupo fenólico, grupo expoxídeo, grupo dissulfeto e grupo azida, cada um dos quais é capaz de formar uma ligação covalente com a unidade reativa X do composto de fórmula A. Além disso, também está contemplado no âmbito da presente invenção que um grupo funcional presente em um a molécula de analito seria primeiro convertido em outro grupo que está mais prontamente disponível para reação com a unidade X reativa de compostos de fórmula A.

[00063] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito é selecionada a partir do grupo que consiste em esteróides, cetosteróides, secosteróides, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas incluindo metabolitos e cofatores de moléculas pequenas, bem como fármacos terapêuticos, drogas de abuso, toxinas ou metabólitos dos mesmos.

[00064] Nas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo carbonila como grupo funcional que é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo ácido carboxílico, grupo aldeído, grupo ceto, um aldeído mascarado, grupo ceto mascarado, grupo éster, grupo amida e grupo anidrido.

[00065] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo amida, o técnico está bem ciente de que o grupo amida, como tal, é um grupo estável, mas que pode ser hidrolisado para converter o grupo amida em um grupo de ácido carboxílico e

um grupo amino. A hidrólise do grupo amida pode ser alcançada por meio da reação catalisada por ácido/base ou por processo enzimático, qualquer um dos quais é bem conhecido pelo técnico. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo aldeído mascarado ou um grupo ceto mascarado, o respectivo grupo é um grupo hemiacetal ou grupo acetal, em particular, um grupo hemiacetal cíclico ou acetal cíclico. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo acetal é convertido em um grupo aldeído ou ceto antes da reação com o composto de fórmula A.

[00066] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo ceto. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo ceto pode ser transferido para um grupo imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa dos compostos de fórmula A. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos ceto é um cetosteróide. Em modalidades particulares do primeiro aspecto da presente invenção, o cetosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em testosterona, epitestosterona, di-hidrotestosterona (DHT), desoximetiltestosterona (DMT), tetra-hidrogestrinona (THG), aldosterona, estrona, 4-hidroxiestrona, 2- metoxiestrona, 2-hidroxiestrona, 16-cetoestradiol, 16 alfa-hidroxiestrona, 2-hidroxiestrona-3-metiléter, prednisona, prednisolona, pregnenolona, progesterona, DHEA (de-hidroepiandrosterona), 17-OH pregnenolona, 17-OH progesterona, 17-OH progesterona, androsterona, epiandrosterona e delta 4 androstenediona) 11-desoxicortisol corticosterona, 21-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona, alopregnolona e aldosterona.

[00067] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo carboxila. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carboxila reage diretamente com o

composto de fórmula A ou é convertido em um grupo éster ativado antes da reação com o composto de fórmula A. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido  $\Delta$ 8-tetra-hidrocanabinol, benzoilecgonina, ácido salicílico, ácido 2-hidroxibenzoico, gabapentina, pregabalina, ácido valpróico, Vancomicina, Metotrexato, ácido micofenólico, Montelucaste, Repaglinida, Furosemida, Telmisartan, Gemfibrozil, Diclorofenaco, Ibuprofeno, Indometacina, Zomepirac, Isoxepac e Penicilina. Nas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é um aminoácido selecionado a partir do grupo que consiste em arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, asparagina, histidina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, valina, prolina e glicina.

[00068] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo aldeído. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo aldeído pode ser transferido para um grupo imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa dos compostos de fórmula A. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos aldeído é selecionada a partir do grupo que consiste em Piridoxal, N-Acetyl-D-glucosamina, Alcaftadina, Estreptomicina e Josamicina.

[00069] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo éster carbonila. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos éster é selecionada a partir do grupo que consiste em Cocaína, Heroína, Ritalina, Aceclofenaco, Acetocolina, Amcinonida, Amiloxato, Amilocaína, Anileridina, Aranidipina e Artesunato e Petidina.

[00070] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo anidrido. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos anidrido é selecionada a partir do grupo que consiste em Cantharidina, Anidrido Succínico, Anidrido Trimelítico e Anidrido Maleico.

[00071] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dieno, em particular, grupos dieno conjugados, tais como um grupo funcional. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dieno é um secosteróide. Em modalidades, o secosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em Colecalciferol (Vitamina D3), Ergocalciferol (Vitamina D2), Calcidiol, Calcitriol, Taquisterol, Lumisterol e Tacalcitol. Em particular, o secosteróide é Vitamina D, em particular, Vitamina D2 ou D3 ou derivados das mesmas. Em modalidades particulares, o secosteróide é selecionado do grupo que consiste em Vitamina D2, Vitamina D3, 25-Hidroxi Vitamina D2, 25-Hidroxi Vitamina D3, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D2, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D3, 1,25-Di-hidroxi Vitamina D2, 1,25-Di-hidroxi Vitamina D3, 24,25-Dihidroxi Vitamina D2 e 24,25-Dihidroxi Vitamina D3, Vitamina A, Tretinoína, Isotretinoína, Alitretinoína, Natamicina, Sirolimus, Anfotericina B, Nistatina, Everolimo, Tensirolimo, Fidaxomicina.

[00072] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila como grupo funcional. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um único grupo hidroxila ou dois grupos hidroxila. Em modalidades em que mais de um grupo hidroxila está presente, os dois grupos hidroxila podem ser posicionados adjacentes um ao outro (1,2-diol) ou podem ser separados por 1, 2 ou 3 átomos de C (1,3-diol, 1,4-diol, 1,5-diol, respectivamente). Em modalidades particulares do primeiro aspecto, a

molécula de analito compreende um grupo 1,2 diol. Em modalidades em que apenas um grupo hidroxila está presente, o referido analito é selecionado do grupo que consiste em álcool primário, álcool secundário e álcool terciário. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em álcool benzílico, Mentol, L-Carnitina, Piridoxina, Metronidazol, Mononitrato de Isossorbida, Guaifenesina, Clavulanato, Migitol, Zalcitabina, Isoprenalina, Aciclovir, Metocarbamol, Tramadol, Venlafaxina, Atropina, Clofedanol, alfa-Hidroxi-alprazolam, alfa-Hidroxi-triazolam, Lorazepam, Oxazepam, Temazepam, Etil glucuronido, Etilmorfina, Morfina, Morfina-3-glucuronido, Buprenorfina, Codeína, Di-Hidrocodeína, p-Hidroxipropoxifeno, O-Desmetiltramadol, Di-hidroquinidina, Quinidina. Nas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a molécula de analito compreende mais de um grupo hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em Vitamina C, Glucosamina, Manitol, Tetra-hidrobiopterina, Citarabina, Azacitidina, Ribavirina, Floxuridina, Gemcitadina, Esteptozocina, Adenosina, Vibarabina, Cladribina, Estriol, Trifluridina, Clofarabina, Nadolol, Zanamivir, Lactulose, Monofosfato de adenosina, Idoxuridina, Regadenoson, Lincomicina, Clindamicina, Canagliforcina, Tobramicina, Netilmicina, Canamicina, Ticagrelor, Epirubicina, Doxorrubicina, Arbecacina, Esteptomicina, Ouabaína, Amicacina, Neomicina, Framicetina, Paromomicina, Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina, Vindesina, Digitoxina, Digoxina, Metrizamida, Acetildigitoxina, Deslanoside, Fludarabina, Clofarabina, Gemcitabina, Citarabina, Capecitabina, Vindicadina, Trifarabina, Idoxuridina e Plicamicina.

[00073] Nas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos tiol (incluindo, mas não se limitando a grupos alquil-tiol e tiol-ariла) como grupo funcional. Em

modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido Tiomandélico, DL-Captopril, DL-Tiorfano, N-Acetilcisteína, D-Penicilamina, Glutationa, L-Cisteína, Zefenoprilato, Tiopronina, Dimercaprol, Succímero.

[00074] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dissulfeto como grupo funcional. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em Dissulfeto de Glutationa, Dipiritiona, Sulfeto de Selênio, Dissulfiram, Ácido Lipóico, L-Cistina, Fursultiamina, Octreotida, Desmopressina, Vapreotide, Terlipressina, Linaclotide, Peginesatide.

[00075] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos epóxidos como grupo funcional. Nas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos epóxidos é selecionada a partir do grupo que consiste em Carbamazepina 10,11 epóxido, Carfilzomib, Furosemida epóxido e Fosfomicina, Sevelamer, Cerulenina, Escopolamina, Tiotrópico, Metil-escopolamina brometo, Eplerenona, Mupirocina, Natamicina, Carfilzomib, Troleandomicina.

[00076] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos fenol como grupo funcional. Em modalidades particulares do primeiro aspecto da presente invenção, as moléculas de analito compreendendo um ou mais grupos fenol são esteróides ou compostos semelhantes a esteróides. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos fenol é um esteróide ou um composto semelhante a

esteróide tendo um anel A que é  $sp^2$  hibridizado e um grupo OH na posição 3 do anel A. Em modalidades particulares do primeiro aspecto da presente invenção, o esteróide ou molécula de analito semelhante a esteróide é selecionada a partir do grupo que consiste em estrogênio, compostos semelhantes a estrogênio, estrona (E1), estradiol (E2), 17a-estradiol, 17p-estradiol, estriol (E3), 16-epiestriol, 17-epiestriol e 16, 17-epiestriol e/ou seus metabólitos. Nas modalidades, os metabólitos são selecionados a partir do grupo que consiste em estriol, 16-epiestriol (16-epiE3), 17-epiestriol (17-epiE3), 16,17-epiestriol (16,17-epiE3), 16-cetoestradiol (16-cetoE2), 16a-hidroxiestrona (16a-OHE1), 2-metoxiestrona (2-MeOE1), 4-metoxiestrona (4-MeOE1), 2-hidroxiestrona-3-éter metílico (3-MeOE1), 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), 4-metoxiestradiol (4-MeOE2), 2-hidroxiestrona (20HE1), 4-hidroxiestrona (4-OHE1), 2-hidroxiestradiol (2-OHE2), estrona (E1), sulfato de estrona (E1s), 17a-estradiol (E2a), 17p-estradiol (E2b), sulfato de estradiol (E2s), equilina (EQ), 17a-di-hidroequilina (EQa), 17p-di-hidroequilina (EQb), Eqilenina (EN), 17-di-hidroequilenina (ENa) 17 $\beta$ -di-hidroequilenina (ENb), A8,9-desidroestrona (dE1), A8,9-desidroestrona sulfato (dE1s),  $\Delta$ 9-Tetra-hidrocanabinol, ácido micofenólico.

[00077] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo amina como grupo funcional. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo amina é uma alquil-amina ou um grupo aril-amina. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o analito compreendendo um ou mais grupos amina é selecionado a partir do grupo que consiste em proteínas e peptídeos. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um grupo amina é selecionada a partir do grupo que consiste em 3,4-metilendioxianfetamina, 3,4-metilendoxi-N-etilanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina, anfetamina, metanfetamina, N-metil-1,3-

benzodioxolilbutanamina, 7-Aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, 3,4-Dimetilmecatinona, 3-Fluorometcatinona, 4-Metoximetcatinona, 4-Metiletcatinona, 4-Metilmecatinona, Anfepramona, Butilona, Metilmetona, Ethcathinone, Flefedrona, Metcatinona, Metilona, Methylendioxypyrovaleron, Benzoilecgonina, Dehydronorketamine, Cetamina, Norcetamina, Metadona, Normetadona, 6-acetilmorfina, Diacetilmorfina, Morfina, Norhydrocodone, Oxicodona, Oximorfona, Fenciclidina, Norpropoxyphene, Amitriptilina, Clomipramina, Dothiepin, doxepina, Imipramina, Nortriptilina, Trimipramina, Fentanila, Glicilxilidida, Lidocaína, Monoetilglicilxilidida, N-Acetil Procainamida, Procainamida, Pregabalina, 2-Metilamino-1-(3, 4-metilendioxifenil) butano, 2-Amino-1-(3,4-metilendioxifenil) butano, Normeperidina, O-Destramadol, Tramadol, Lidocaína, N-Acetil Procainamida, Procainamida, Gabapentina, Lamotrigina, Teofilina, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Vancomicina, Metotrexat, Gabapentina, Sisomicina e 5-Metilcitosina.

[00078] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito é um carboidrato ou substância tendo uma fração de carboidrato, por exemplo, uma glicoproteína ou um nucleosídeo. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito é um monossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em ribose, desoxirribose, arabinose, ribulose, glicose, manose, galactose, fucose, frutose, N-acetilglucosamina, N- acetilgalactosamina, ácido neuramínico, ácido N-acetilneuromínico, etc. Em modalidades, a molécula de analito é um oligossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em um dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, polissacarídeo. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o dissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em sacarose, maltose e lactose. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito é uma substância compreendendo a fração mono-, di-, tri-, tetra-, oligo- ou

polissacarídeo descrita acima.

[00079] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito comprehende um grupo azida como grupo funcional que é selecionado do grupo que consiste em alquila ou arila azida. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a molécula de analito comprehendendo um ou mais grupos azida é selecionada a partir do grupo que consiste em Zidovudina e Azidocilina.

[00080] Essas moléculas de analito podem estar presentes em amostras biológicas ou clínicas, como líquidos corporais, por exemplo, sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal, etc., tecidos ou extratos celulares, etc. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a(s) molécula(s) de analito estão presentes em uma amostra biológica ou clínica selecionada do grupo que consiste em sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal e uma mancha de sangue seco. Em algumas modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, as moléculas de analito podem estar presentes em uma amostra que é uma amostra purificada ou parcialmente purificada, por exemplo, uma mistura ou extrato de proteína purificada ou parcialmente purificada.

[00081] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carbonila, unidade reativa de dieno, unidade reativa de hidroxila, unidade reativa de amino, uma unidade reativa de imina, uma unidade reativa de tiol, uma unidade reativa de diol, uma unidade reativa de fenol, unidade reativa de epóxido, uma unidade reativa de dissulfeto e uma unidade reativa de azido.

[00082] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de carbonila, que é capaz de reagir com qualquer tipo de molécula possuindo um grupo carbonila. Em

modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carboxila, unidade reativa de ceto, unidade reativa de aldeído, unidade reativa de anidrido, unidade reativa de éster carbonílico e unidade reativa de imida. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila pode ter um átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito a através de um átomo O ou N adjacente NH<sub>2</sub>-N/O ou uma molécula de ditiol. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo:

- (i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,
- (ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>2</sup>-C(O)-,
- em que R<sup>2</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou C<sub>1-3</sub>alcoxi,
- (iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-O-, e
- (iv) uma unidade ditiol, particularmente uma unidade 1,2-ditiol ou 1,3-ditiol.

[00083] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a unidade reativa de carbonila é uma unidade reativa de carboxila, as unidades reativas de carboxila reagem com grupos carboxila em uma molécula de analito. Na modalidade do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa carboxila é selecionada a partir do grupo que

consistem em uma unidade de diazo, um haleto de alquila, amina, e unidade de hidrazina.

[00084] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dieno, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo dieno. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dieno é selecionada a partir do grupo que consiste em reagentes do tipo Cookson, por exemplo, 1,2,4-triazolin-3,5-dionas, que são capazes de atuar como dienófilos.

[00085] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de hidroxila, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo hidroxila. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, as unidades reativas de hidroxila são selecionadas a partir do grupo que consiste em cloretos de sulfonila, ésteres carboxílicos ativados (NHS ou imidazolida) e fluoro aromatos/heteroaromatos capazes de substituição nucleofílica do flúor (T. Higashi J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Sep;162:57-69). Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de diol que reage com um grupo diol em uma molécula de analito. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a unidade reativa é uma unidade reativa de 1,2 diol, a unidade reativa de 1,2 diol compreende ácido borônico. Em outras modalidades, os dióis podem ser oxidados nas respectivas cetonas ou aldeídos e, em seguida, reagir com unidades reativas X de cetona/aldeído.

[00086] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino reage com grupos amino em uma molécula de analito. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo éster ativo, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS)

ou sulfo éster de NHS, éster pentafluorofenílico, éster carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HO<sub>Bt</sub>), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HO<sub>At</sub>) e uma unidade de cloreto de sulfonila.

[00087] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol reage com um grupo tiol em uma molécula de analito. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo haloacetila, em particular selecionado a partir do grupo que consiste em unidade Br/I-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, unidade acrilamida/éster, unidade de imida insaturada, tais como unidade de metilsulfonil feniloxadiazol e cloreto de sulfonila.

[00088] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol reage com grupos fenol em uma molécula de analito. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade de éster ativa, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) ou éster de sulfo-NHS, éster pentafluorofenílico, éster de carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HO<sub>Bt</sub>), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HO<sub>At</sub>) e uma unidade de cloreto de sulfonila. Grupos fenol presentes em uma molécula de analito podem ser reagidos com triazol diona por meio de uma reação (H. Ban et al J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (5), pp 1523–1525) ou por diazotização ou, alternativamente, por orto nitração seguida por redução a uma amina que pode então reagir com um reagente reativo de amina.

[00089] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de epóxido, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo epóxido. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é

selecionada a partir do grupo que consiste em amino, tiol, átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito  $\alpha$  através de um átomo O ou N adjacente da molécula NH<sub>2</sub>-N/O. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é selecionada a partir do grupo:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,

(ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>2</sup>-C(O)-,

em que R<sup>2</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou C<sub>1-3</sub> alcoxi, e

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo uma unidade H<sub>2</sub>N-O-.

[00090] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dissulfeto, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo dissulfeto. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em tiol. Em outras modalidades, o grupo dissulfeto pode ser reduzido ao respectivo grupo tiol e, em seguida, reagir com as unidades X reativas com tiol.

[00091] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de azido que reage com grupos azido em uma molécula de analito. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade reativa com azido reage com grupos

azido através da cicloadição azida-alquino. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade azido-reativa é selecionada a partir do grupo que consiste em alquino (alquila ou arila), alquino linear ou alquino cíclico. A reação entre o azido e o alcino pode ocorrer com ou sem o uso de um catalisador. Em outras modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o grupo azido pode ser reduzido ao respectivo grupo amino e, em seguida, reagido com unidades reativas X de amino.

[00092] Os compostos de fórmula A compreendem uma unidade de perda neutra Y. A unidade de perda neutra Y é capaz de perder uma fração (uma entidade neutra) sem carga. A unidade de perda neutra Y é capaz de fragmentação, ou seja, sob condições de MS, por exemplo, quando submetida a dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo, em MS triplo quadrupolo, em que uma entidade neutra é liberada. A entidade neutra perdida é um único átomo ou uma pluralidade de átomos. Após a liberação da entidade neutra, o restante da unidade de perda neutra Y ainda permanece neutra. Normalmente, mas não necessariamente, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades particulares do primeiro aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas.

[00093] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y libera pelo menos uma entidade neutra após ionização. A entidade neutra é uma entidade neutra de baixo peso molecular, em particular em uma faixa de 10-100 Da, em particular 20-80 Da, em particular 25-65 Da. Em particular, a entidade neutra tem um peso molecular de 100 Da ou menos, em particular de 80 Da ou menos, em particular de 70 Da ou menos, em particular de 50 Da ou menos, em particular de 30 Da ou menos.

[00094] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a entidade neutra é selecionada a partir do grupo que consiste em

$N_2$ ,  $NO$ ,  $NO_2$ ,  $S_2$ ,  $SO$ ,  $SO_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ . Em modalidades particulares, a entidade neutra é  $N_2$ .

[00095] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a perda da entidade neutra leva a uma redução da razão massa/carga (m/z) em -28 Da (no caso de perda de  $N_2$  ou  $CO$ ), -30 Da (no caso de perda de  $NO$ ), -44 Da (no caso de perda de  $CO_2$ ), -46 Da (no caso de perda de  $NO_2$ ), -48 Da (no caso de perda de  $SO$ ) ou -64 Da (no caso de perda de  $S_2$  ou  $SO_2$ ).

[00096] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas. Em particular, a segunda entidade neutra liberada é diferente da primeira entidade neutra liberada. A liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente ou subsequentemente à liberação da primeira entidade neutra. Em particular, a liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente à liberação da primeira entidade neutra, ou seja, ambas as entidades neutras são liberadas ao mesmo tempo, ou seja, em um único evento de fragmentação.

[00097] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y comprehende ou consiste em uma fração heterocíclica de 4, 5 ou 6 membros, particularmente uma fração heterocíclica de 4, 5, 6 membros com pelo menos 2 heteroátomos adjacentes uns aos outros, em particular dois átomos N adjacentes uns aos outros. Na modalidade do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y comprehende ou consiste em triazol, tetrazol, tetrazina, oxadiazol, fração tiadiazol ou um derivado hidrogenado dos mesmos. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y comprehende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,4,5-triazol,

fração 3,4,5-triazol, uma fração 1,2,3,4-tetrazol, 2,3,4,5-tetrazol ou uma fração 2,3,5,6 tetrazol ou uma fração 1,2,4,5 tetrazina. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol ou 1,2,4-triazol, ou uma fração 1,2,3,4-tetrazol, ou uma fração 1,2,4,5 tetrazina.

[00098] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é permanentemente carregada, em particular sob condições neutras, em particular a um valor de pH de 6-8.

[00099] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é carregada positivamente ou negativamente, de preferência carregada positivamente.

[000100] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z compreende ou consiste em:

- (i) pelo menos uma fração carregada positivamente;
- ou
- (ii) pelo menos uma fração carregada negativamente.

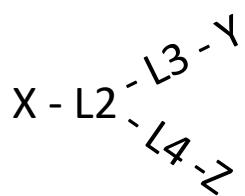
[000101] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada positivamente. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z, é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pKa de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pKa de 12 ou mais. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z é selecionada a partir do grupo que consiste em amônio primário, secundário, terciário ou quaternário, sulfônio, imidazólio, piridínio ou um fosfônio. Em modalidades particulares do primeiro aspecto, a fração carregada positivamente é tri-metil-amônio, N,N-dimetil-piperidínio ou N-alquil-quinuclidínio.

[000102] Em modalidades do primeiro aspecto da presente

invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada negativamente. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pK<sub>b</sub> de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pK<sub>b</sub> de 12 ou mais. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é selecionada a partir do grupo que consiste em um fosfato, sulfato, sulfonato ou carboxilato.

[000103] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o ligante ramificado L1 é um ligante trifuncional. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o ligante L1 é substituído ou não substituído. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 não é protonável. Em modalidades do primeiro aspecto, o ligante trifuncional L1 compreende 3 a 30 átomos de C, em particular 5-20 átomos de C, em particular 8-16 átomos de C. Em modalidades, o ligante trifuncional L1 compreende 1 ou mais heteroátomos, em particular N, O ou S. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 compreende pelo menos 4 heteroátomos, em particular 5, 6 ou 7 heteroátomos, em particular N e/ou O. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 compreende 5 heteroátomos, em particular 3 átomos de O e 2 átomos de N.

[000104] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de acordo com a fórmula B:



em que:

X, Y e Z, são conforme definidos em detalhes acima, no que diz respeito ao composto de fórmula A,

L2, L3 e L4 são ramificações de ligante, cada um individualmente compreendendo C1-C10, em particular C1-C5, opcionalmente, cada um individualmente compreendendo um ou mais heteroátomos, e

em que as ramificações de ligante L2, L3 e L4, juntas, formam o ligante L1 ramificado, em particular o trifuncional, conforme definido acima.

[000105] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 são cada uma individualmente ligante linear.

[000106] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 têm o comprimento idêntico ou diferente. Em particular, a ramificação de ligante L2 é mais longa do que as ramificações de ligante L3 e L4, respectivamente. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L2 tem um comprimento de C3-C6. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L3 e L4 têm, cada uma, um comprimento de C1-C3. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, independentemente do comprimento de cada uma das ramificações, individualmente cada ramificação de ligante L2, L3, L4 pode compreender um ou mais heteroátomos. Em modalidades particulares do primeiro aspecto da presente invenção, todas as três ramificações de ligante compreendem pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o heteroátomo é N, S, P ou O, em particular N e/ou O.

[000107] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a ramificação linear L4 compreende uma unidade de estabilização. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z durante o evento de

fragmentação. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z ao desestabilizar a carbocação potencialmente formada. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é separada por um átomo de C da unidade carregada Z. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização compreende pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é selecionada a partir do grupo que consiste em CO, ou seus análogos isoelétricos, como SO ou SO<sub>2</sub>.

[000108] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L<sub>2</sub> compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L<sub>2</sub> compreende 7 átomos de C, ela compreende 3 heteroátomos, em particular um átomo de O e N. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L<sub>2</sub> compreende 3, 4, 5 ou 6 átomos de C, ela compreende 2 heteroátomos, em particular um átomo de O e N, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O. Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L<sub>2</sub> compreende 2 átomos de C, ela compreende 1 heteroátomo, em particular um átomo de O.

[000109] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L<sub>3</sub> compreende 2-10 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000110] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L<sub>4</sub> compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 1 ou 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N ou 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000111] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade reativa de carbonila, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros e a unidade carregada Z é uma unidade permanentemente carregada positivamente.

[000112] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade reativa de dieno, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros e a unidade carregada Z é uma unidade permanentemente carregada positivamente.

[000113] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000114] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000115] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000116] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é

uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos, e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000117] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000118] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000119] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000120] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000121] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000122] Em modalidades do primeiro aspecto da presente

invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de amônio terciária.

[000123] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000124] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000125] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-O-C-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de dimetil-piperidina ou quinuclidina.

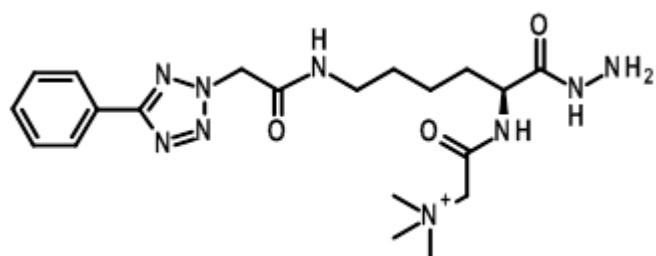
[000126] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é 1,2,4-triazolin-3,5-diona, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma fração dimetil-piperidina ou quinuclidina.

[000127] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é azido-benzeno, ou 1,2,5-triazaespiro[2.4]hept-1-eno ou metilsulfiniletano, e a unidade carregada Z

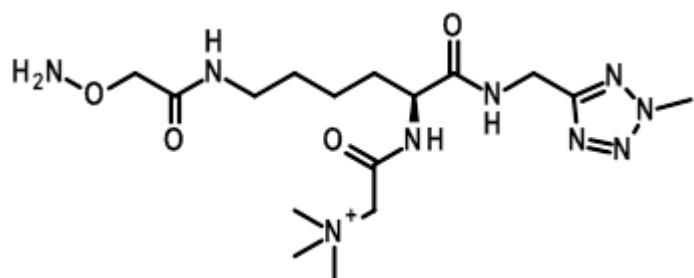
é um espiro[2H-isoindol-2,1'-pirrolidínio], 1,3-di-hidro ou 5-Azoniaspiro[4.4]nonano.

[000128] Em modalidades do primeiro aspecto da presente invenção, o composto de fórmula B é selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) Marca 1:

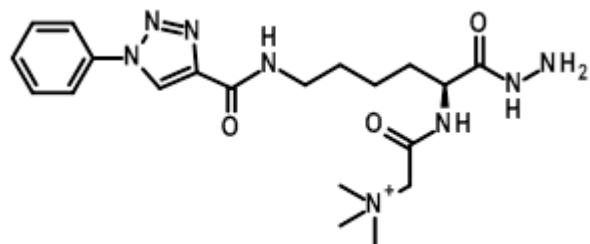


(ii) Marca 2:



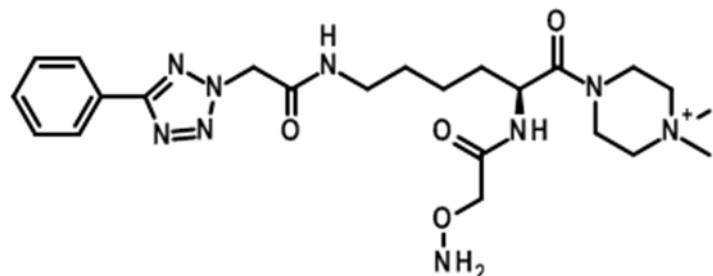
e

(iii) Marca 3:

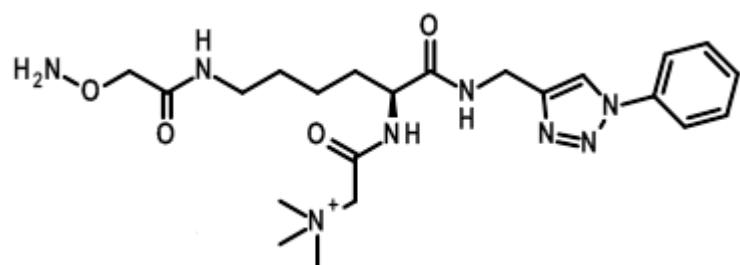


[000129] Outros exemplos do composto de fórmula A ou fórmula B são os seguintes:

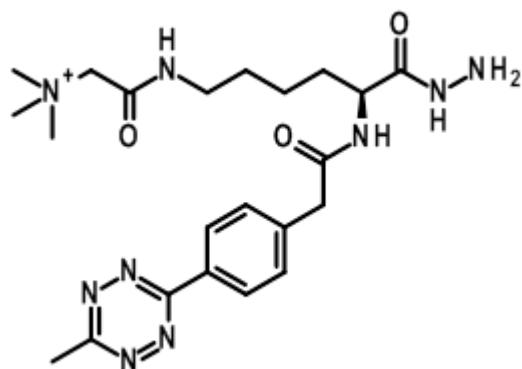
(iv) Marca 4:



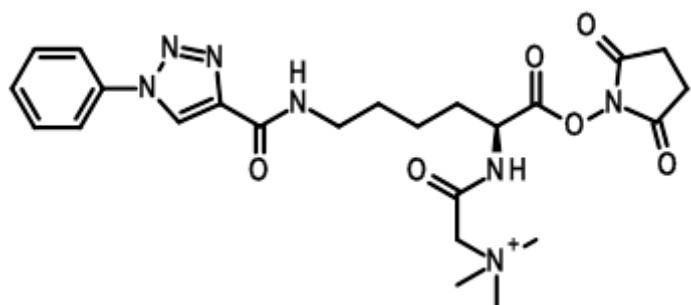
(v) Marca 5:



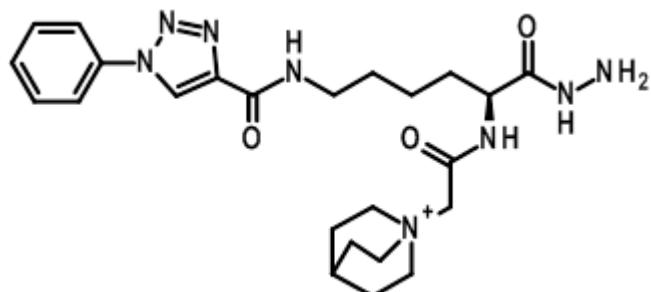
(vi) Marca 6:



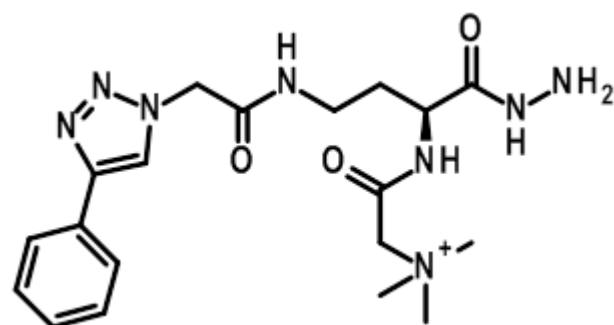
(vii) Marca 7:



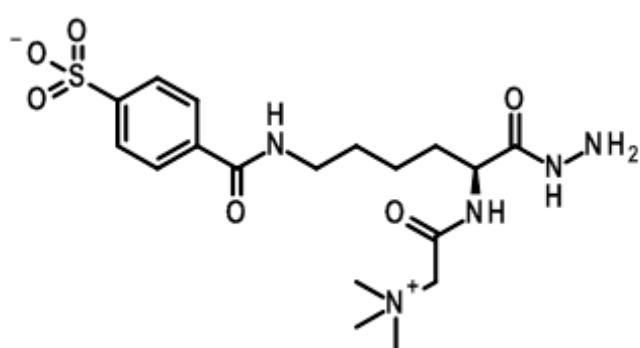
(viii) Marca 8:



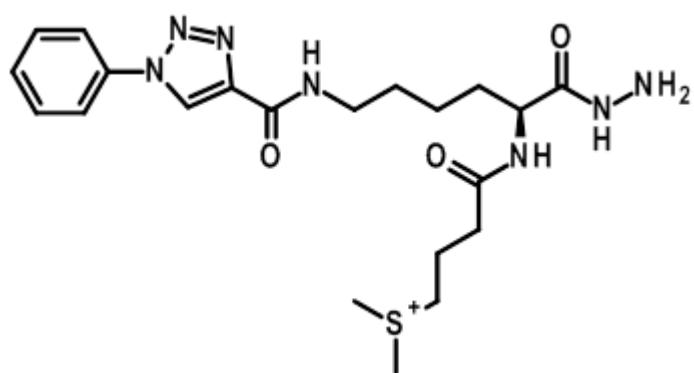
(ix) Marca 9:



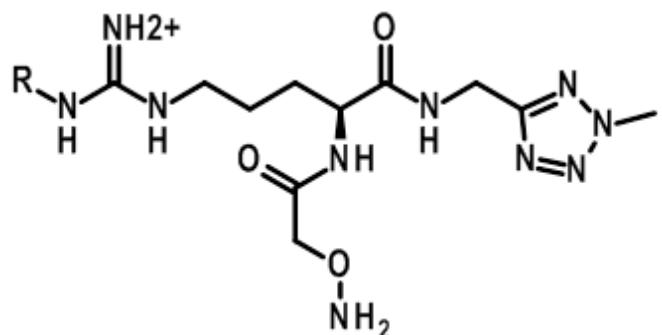
(x) Marca 10:



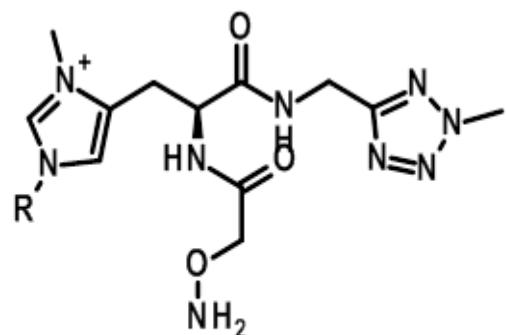
(xi) Marca 11:



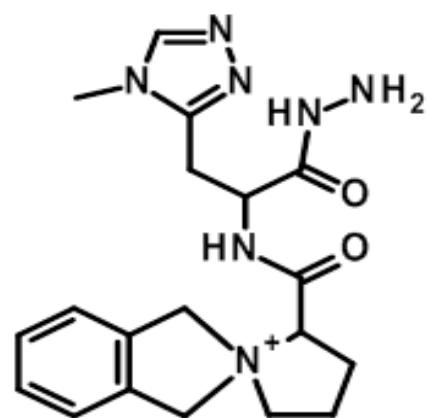
(xii) Marca 12:



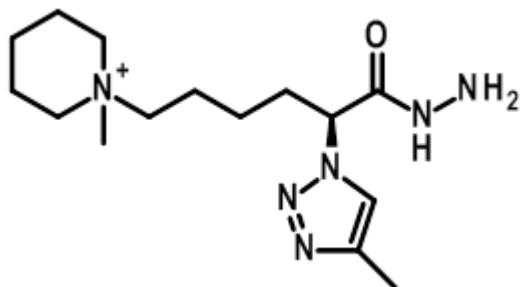
(xiii) Marca 13:

**R = H, alquila, arila**

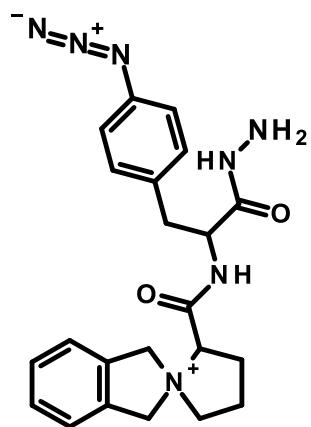
(xiv) Marca 14:



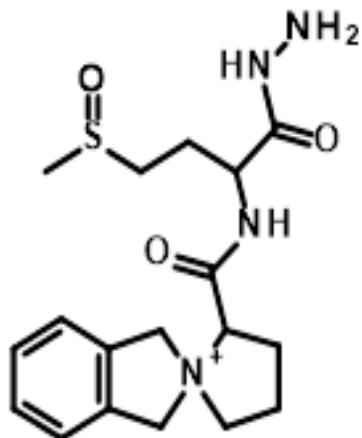
(xv) Marca 15:



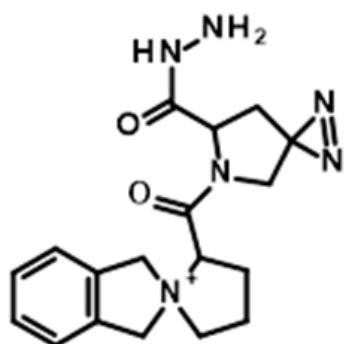
(xvi) Marca 16:



(xvii) Marca 17:



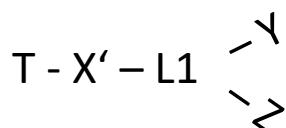
(xviii) Marca 18:



[000130] Num segundo aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição compreendendo o composto de fórmula A ou fórmula B, conforme divulgado em detalhes acima no que diz respeito ao primeiro aspecto da presente invenção.

[000131] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se a um kit compreendendo o composto de fórmula A ou fórmula B, conforme divulgado em detalhes aqui, acima, no que diz respeito ao primeiro aspecto da presente invenção ou à composição do segundo aspecto da presente invenção, conforme divulgado em detalhes aqui, acima.

[000132] Num quarto aspecto, a presente invenção refere-se a um aduto compreendendo uma molécula de analito e o composto do primeiro aspecto da presente invenção, conforme divulgado aqui, acima, que estão covalentemente ligados um ao outro. Nas modalidades, o aduto tem uma estrutura de fórmula A':



em que:

T é uma molécula de analito,

X' é uma fração resultante da reação de uma unidade reativa X do

composto de fórmula A com uma molécula de analito T,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração carregada permanentemente, em particular uma fração carregada permanentemente, e

incluindo qualquer sal do mesmo.

[000133] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto de fórmula A' compreende X' resultante da formação de uma ligação covalente entre a unidade reativa X do composto de fórmula A com um grupo funcional presente na molécula de analito T. Dependendo da unidade reativa X do composto de fórmula A e o grupo funcional da molécula de analito T, o técnico no assunto é bem capaz de determinar a ligação covalente formada entre os dois.

[000134] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo funcional selecionado do grupo que consiste em grupo carbonila, grupo dieno, grupo hidroxila, grupo amina, grupo imina, grupo tiol, grupo diol, grupo fenólico, grupo epóxido, grupo dissulfeto e grupo azida, cada um dos quais é capaz de formar uma ligação covalente com a unidade reativa X do composto de fórmula A. Além disso, também está contemplado no escopo da presente invenção que um grupo funcional está presente em uma molécula de analito seria primeiro convertido em outro grupo que está mais prontamente disponível para reação com a unidade X reativa de compostos de fórmula A.

[000135] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é selecionada a partir do grupo que consiste em esteróides, cetosteróides, secosteróides, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos,

ácidos nucleicos e outras biomoléculas incluindo metabólitos e cofatores de moléculas pequenas, bem como drogas terapêuticas, drogas de abuso, toxinas ou seus metabólitos.

[000136] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo carbonila como grupo funcional que é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo ácido carboxílico, grupo aldeído, grupo ceto, um aldeído mascarado, grupo ceto mascarado, grupo éster, grupo amida e grupo anidrido.

[000137] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo amida, o técnico no assunto está bem ciente de que o grupo amida, como tal, é um grupo estável, mas que pode ser hidrolisado para converter o grupo amida em um grupo de ácido carboxílico e um grupo amina. A hidrólise do grupo amida pode ser alcançada por meio da reação catalisada por ácido/base ou por processo enzimático, qualquer um dos quais é bem conhecido pelo técnico. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo aldeído mascarado ou um grupo ceto mascarado, o respectivo grupo é um grupo hemiacetal ou grupo acetal, em particular um grupo hemiacetal cílico ou grupo acetal. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo acetal, é convertido em um grupo aldeído ou ceto antes da reação com o composto de fórmula A.

[000138] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo ceto. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo ceto pode ser transferido para um grupo imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa de compostos de fórmula A. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos ceto é um cetosteróide. Em modalidades particulares do quarto aspecto da presente

invenção, o cetosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em testosterona, epitestosterona, dihidrotestosterona (DHT), desoximetiltestosterona (DMT), tetrahidrogestrinona (THG), aldosterona, estrona, 4-hidroxiestrona, 2- metoxiestrona, 2-hidroxiestrona, 16-cetoestradiol, 16 alfa-hidroxiestrona, 2-hidroxiestrona-3-metiléter, prednisona, prednisolona, pregnenolona, progesterona, DHEA (dehidroepiandrosterona), 17-OH pregnenolona, 17-OH progesterona, 17-OH progesterona, androsterona, epiandrosterona e delta 4 androstenediona) 11-desoxicortisol corticosterona, 21-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona, alopregnolona e aldosterona.

[000139] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo carboxila. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carboxila reage diretamente com o composto de fórmula A ou é convertido em um grupo éster ativado antes da reação com o composto de fórmula A. Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido  $\Delta$ 8-Tetrahidrocanabinol, Benzoilecgonina, ácido Salicílico, ácido 2-hidroxibenzóico, Gabapentina, Pregabalina, ácido Valpróico, Vancomicina, Metotrexato, ácido Micofenólico, Montelucaste, Repaglinida, Furosemida, Telmisartan, Gemfibrozil, Diclorofenaco, Ibuprofeno, Indometacina, Zomepirac, Isoxepac e Penicilina. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, asparagina, histidina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenialanina, valina, prolina e glicina.

[000140] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo aldeído. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo aldeído pode ser transferido para um

grupo imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa de compostos de fórmula A. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos aldeído são selecionados do grupo que consiste em Piridoxal, N-Acetyl-D-glucosamina, Alcaftadina, Estreptomicina, Josamicina.

[000141] Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo éster carbonila. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos éster é selecionada a partir do grupo que consiste em Cocaína, Heroína, Ritalina, Aceclofenaco, Acetocolina, Amcinonida, Amiloxato, Amilocaina, Anileridina, Aranidipina e Artesunato, Petidina.

[000142] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo anidrido. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos anidrido é selecionada a partir do grupo que consiste em Cantaridina, Anidrido Succínico, Anidrido Trimelítico e Anidrido Maleico.

[000143] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dieno, em particular, grupos dieno conjugados, como grupo funcional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dieno é um secosteróide. Em modalidades, o secosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em Colecalciferol (Vitamina D3), Ergocalciferol (Vitamina D2), Calcidiol, Calcitriol, Taquisterol, Lumisterol e Tacalcitol. Em particular, o secosteróide é Vitamina D, em particular, Vitamina D2 ou D3 ou derivados das mesmas. Em modalidades particulares, o secosteróide é selecionado do grupo que consiste em Vitamina D2, Vitamina D3, 25-Hidroxi Vitamina D2, 25-Hidroxi Vitamina D3, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D2, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D3, 1,25-Di-hidroxi Vitamina D2, 1,25-Di-hidroxi

Vitamina D3, 24,25-Diidroxi Vitamina D2 e 24,25-Di-hidroxi Vitamina D3, Vitamina A, Tretinoína, Isotretinoína, Alitretinoína, Natamicina, Sirolimus, Anfotericina B, Nistatina, Everolimo, Tensirolimo, Fidaxomicina.

[000144] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila como grupo funcional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um único grupo hidroxila ou dois grupos hidroxila. Em modalidades em que mais de um grupo hidroxila está presente, os dois grupos hidroxila podem ser posicionados adjacentes um ao outro (1,2 diol) ou podem ser separados por 1, 2 ou 3 átomos de C (1,3-diol, 1,4-diol, 1,5-diol, respectivamente). Em modalidades particulares do quarto aspecto, a molécula de analito compreende um grupo 1,2 diol. Em modalidades em que apenas um grupo hidroxila está presente, o referido analito é selecionado do grupo que consiste em álcool primário, álcool secundário e álcool terciário. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em álcool benzílico, Mentol, L-Carnitina, Piridoxina, Metronidazol, Mononitrato de Isossorbida, Guaifenesina, Clavulanato, Migitol, Zalcitabina, Isoprenalina, Aciclovir, Metocarbamol, Tramadol, Venlafaxina, Atropina, Clofedanol, alfa-Hidroxi-alprazolam, alfa-Hidroxi-triazolam, Lorazepam, Oxazepam, Temazepam, Etil glucuronido, Etilmorfina, Morfina, Morfina-3-glucuronido, Buprenorfina, Codeína, Di-Hidrocodeína, p-Hidroxipropoxifeno, O-Desmetiltramadol, Di-hidroquinidina, Quinidina. Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que a molécula de analito compreende mais de um grupo hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em Vitamina C, Glucosamina, Manitol, Tetra-hidrobiopterina, Citarabina, Azacitidina, Ribavirina, Floxuridina, Gemcitadina, Estreptozocina, Adenosina, Vibarabina, Cladribina, Estriol, Trifluridina,

Clofarabina, Nadolol, Zanamivir, Lactulose, Monofosfato de adenosina, Idoxuridina, Regadenoson, Lincomicina, Clindamicina, Canagliforcina, Tobramicina, Netilmicina, Canamicina, Ticagrelor, Epirrubicina, Doxorrubicina, Arbecacina, Esteptomicina, Ouabaína, Amicacina, Neomicina, Framicetina, Paromomicina, Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina, Vindesina, Digitoxina, Digoxina, Metrizamida, Acetildigitoxina, Deslanoside, Fludarabina, Clofarabina, Gemcitabina, Citarabina, Capecitabina, Vindicadina, Trifarabina, Idoxuridina e Plicamicina.

[000145] Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos tiol (incluindo, mas não se limitando a grupos alquil-tiol e tiol-arila) como grupo funcional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido Tiomandélico, DL-Captopril, DL-Tiorfano, N-Acetilcisteína, D-Penicilamina, Glutationa, L-Cisteína, Zefenoprilato, Tiopronina, Dimercaprol, Succímero.

[000146] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dissulfeto como grupo funcional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em Dissulfeto de Glutationa, Dipiritiona, Sulfeto de Selênio, Dissulfiram, Ácido Lipóico, L-Cistina, Fursultiamina, Octreotida, Desmopressina, Vapreotide, Terlipressina, Linaclotide, Peginesatide.

[000147] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos epóxido como grupo funcional. Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos epóxidos é

selecionada a partir do grupo que consiste em Carbamazepina 10,11 epóxido, Carfilzomib, Furosemida epóxido e Fosfomicina, Sevelamer, Cerulenina, Escopolamina, Tiotrópico, Metil-escopolamina brometo, Eplerenona, Mupirocina, Natamicina, Carfilzomib, Troleandomicina.

[000148] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos fenol como grupo funcional. Em modalidades particulares do quarto aspecto da presente invenção, moléculas de analito compreendendo um ou mais grupos fenol são esteróides ou compostos semelhantes a esteróides. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos fenol é um esteróide ou um composto semelhante a esteróide tendo um anel A que é  $sp^2$  hibridizado e um grupo OH na posição 3 do anel A. Em modalidades particulares do quarto aspecto da presente invenção, o esteróide ou molécula de analito semelhante a esteróide é selecionada a partir do grupo que consiste em estrogênio, compostos semelhantes a estrogênio, estrona (E1), estradiol (E2), 17a-estradiol, 17p- estradiol, estriol (E3), 16-epiestriol, 17-epiestriol e 16, 17-epiestriol e/ou seus metabólitos. Nas modalidades, os metabólitos são selecionados a partir do grupo que consiste em estriol, 16-epiestriol (16-epiE3), 17-epiestriol (17-epiE3), 16,17-epiestriol (16,17-epiE3), 16-cetoestradiol (16-cetoE2), 16a-hidroxiestrona (16a-OHE1), 2-metoxiestrona (2-MeOE1), 4-metoxiestrona (4-MeOE1), 2-hidroxiestrona-3-éter metílico (3-MeOE1), 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), 4-metoxiestradiol (4-MeOE2), 2-hidroxiestrona (20HE1), 4-hidroxiestrona (4-OHE1), 2-hidroxiestradiol (2-OHE2), estrona (E1), sulfato de estrona (E1s), 17a-estradiol (E2a), 17p-estradiol (E2b), sulfato de estradiol (E2s), equilina (EQ), 17a-di-hidroequilina (EQa), 17p-di-hidroequilina (EQb), Eqilenina (EN), 17-di-hidroequilenina (ENa) 17 $\beta$ - di-hidroequilenina (ENb), A8,9-desidroestrona (dE1), A8,9-desidroestrona sulfato (dE1s),  $\Delta$ 9-Tetra-hidrocanabinol, ácido micofenólico.

[000149] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo amina como grupo funcional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo amina é uma alquil-amina ou um grupo aril-amina. Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o analito compreendendo um ou mais grupos amina é selecionado a partir do grupo que consiste em proteínas e peptídeos. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um grupo amina é selecionada a partir do grupo que consiste em 3,4-metilendioxianfetamina, 3,4-metilendoxi-N-etilanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina, anfetamina, metanfetamina, N-metil-1,3-benzodioxolilbutanamina, 7-Aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, 3,4-Dimetilmecatinona, 3-Fluorometcatinona, 4-Metoximetcatinona, 4-Metiletcatinona, 4-Metilmecatinona, Anfepramona, Butilona, Metilmetona, Ethcathinone, Flefedrona, Metcatinona, Metilona, Methylendioxypyrovaleron, Benzoilecgonina, Dehydronorketamine, Cetamina, Norcetamina, Metadona, Normetadona, 6-acetilmorfina, Diacetilmorfina, Morfina, Norhydrocodone, Oxicodona, Oximorfona, Fenciclidina, Norpropoxyphene, Amitriptilina, Clomipramina, Dothiepin, doxepina, Imipramina, Nortriptilina, Trimipramina, Fentanila, Glicilxilidida, Lidocaína, Monoetilglicilxilidida, N-Acetil Procainamida, Procainamida, Pregabalina, 2-Metilamino-1-(3, 4-metilendioxifenil) butano, 2-Amino-1-(3,4-metilendioxifenil) butano, Normeperidina, O-Destramadol, Tramadol, Lidocaína, N-Acetil Procainamida, Procainamida, Gabapentina, Lamotrigina, Teofilina, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Vancomicina, Metotrexat, Gabapentina, Sisomicina e 5-Metilcitosina.

[000150] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é um carboidrato ou substância com uma fração de carboidrato, por exemplo, uma glicoproteína ou um nucleosídeo. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é

um monossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em ribose, desoxirribose, arabinose, ribulose, glicose, manose, galactose, fucose, frutose, N-acetilglucosamina, N- acetilgalactosamina, ácido neuramínico, ácido N-acetilneuromínico, etc. Em modalidades, a molécula de analito é um oligossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em um dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, polissacarídeo. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o dissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em sacarose, maltose e lactose. Nas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é uma substância que compreende a fração mono-, di-, tri-, tetra-, oligo- ou polissacarídeo descrita acima.

[000151] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo azida como grupo funcional que é selecionado do grupo que consiste em alquila ou arila azida. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos azida é selecionada a partir do grupo que consiste em Zidovudina e Azidocilina.

[000152] Essas moléculas de analito podem estar presentes em amostras biológicas ou clínicas, como líquidos corporais, por exemplo, sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal, etc., tecidos ou extratos celulares, etc. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a(s) molécula(s) de analito estão presentes em uma amostra biológica ou clínica selecionada do grupo que consiste em sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal e uma mancha de sangue seco. Em algumas modalidades do quarto aspecto da presente invenção, as moléculas de analito podem estar presentes em uma amostra que é uma amostra purificada ou parcialmente purificada, por exemplo, uma mistura ou extrato de proteína purificada ou parcialmente purificada.

[000153] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carbonila, unidade reativa de dieno, unidade reativa de hidroxila, unidade reativa de amino, uma unidade reativa de imina, uma unidade reativa de tiol, uma unidade reativa de diol, uma unidade reativa de fenol, unidade reativa de epóxido, uma unidade reativa de dissulfeto e uma unidade reativa de azido.

[000154] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de carbonila, que é capaz de reagir com qualquer tipo de molécula possuindo um grupo carbonila. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carboxila, unidade reativa de ceto, unidade reativa de aldeído, unidade reativa de anidrido, unidade reativa de éster carbonílico e unidade reativa de imida. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila pode ter um átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito  $\alpha$  através de um átomo O ou N adjacente NH<sub>2</sub>-N/O ou uma molécula de ditiol. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,

(ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>2</sup>-C(O)-,

em que R<sup>2</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por

exemplo, com halo, hidroxila e/ou C<sub>1-3</sub>alcoxi,

- (iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-O-, e
- (iv) uma unidade ditiol, particularmente uma unidade 1,2-ditiol ou 1,3-ditiol.

[000155] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que a unidade reativa de carbonila é uma unidade reativa de carboxila, as unidades reativas de carboxila reagem com grupos carboxila em uma molécula de analito. Na modalidade do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa carboxila é selecionada a partir do grupo que consistem em uma unidade de diazo, um haleto de alquila, amina, e unidade de hidrazina.

[000156] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dieno, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo dieno. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dieno é selecionada a partir do grupo que consiste em reagentes do tipo Cookson, por exemplo, 1,2,4-triazolin-3,5-dionas, que são capazes de atuar como dienófilos.

[000157] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de hidroxila, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo hidroxila. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, as unidades reativas de hidroxila são selecionadas a partir do grupo que consiste em cloretos de sulfonila, ésteres carboxílicos ativados (NHS ou imidazolida) e fluoro aromatos/heteroaromatos capazes de substituição nucleofílica do flúor (T. Higashi J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Sep;162:57-69). Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de diol que reage com um grupo diol em uma molécula de analito. Em modalidades do quarto aspecto da

presente invenção, em que a unidade reativa é uma unidade reativa de 1,2 diol, a unidade reativa de 1,2 diol compreende ácido borônico. Em outras modalidades, os dióis podem ser oxidados nas respectivas cetonas ou aldeídos e, em seguida, reagir com unidades reativas X de cetona/aldeído.

[000158] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino reage com grupos amino em uma molécula de analito. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo éster ativo, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) ou sulfo éster de NHS, éster pentafluorofenílico, éster carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HO<sub>2</sub>T), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) e uma unidade de cloreto de sulfonila.

[000159] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol reage com um grupo tiol em uma molécula de analito. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo haloacetila, em particular selecionado a partir do grupo que consiste em unidade Br/I-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, unidade acrilamida/éster, unidade de imida insaturada, tais como unidade de metilsulfonil feniloxadiazol e cloreto de sulfonila.

[000160] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol reage com grupos fenol em uma molécula de analito. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade de éster ativa, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) ou éster de sulfo-NHS, éster pentafluorofenílico, éster de carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HO<sub>2</sub>T), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) e uma unidade de cloreto de sulfonila. Grupos fenol

presentes em uma molécula de analito podem ser reagidos com triazol diona por meio de uma reação (H. Ban et al J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (5), pp 1523–1525) ou por diazotização ou, alternativamente, por orto nitração seguida por redução a uma amina que pode então reagir com um reagente reativo de amina.

[000161] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de epóxido, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo epóxido. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é selecionada a partir do grupo que consiste em amino, tiol, átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito  $\alpha$  através de um átomo O ou N adjacente da molécula NH<sub>2</sub>-N/O. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é selecionada a partir do grupo:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,

(ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>2</sup>-C(O)-,

em que R<sup>2</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou C<sub>1-3</sub> alcoxi, e

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo uma unidade H<sub>2</sub>N-O-.

[000162] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dissulfeto, que é capaz

de reagir com um analito compreendendo um grupo dissulfeto. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em tiol. Em outras modalidades, o grupo dissulfeto pode ser reduzido ao respectivo grupo tiol e, em seguida, reagir com as unidades X reativas com tiol.

[000163] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de azido que reage com grupos azido em uma molécula de analito. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade reativa com azido reage com grupos azido através da cicloadição azida-alquino. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade azido-reativa é selecionada a partir do grupo que consiste em alquino (alquil ou aril), alquino linear ou alquino cíclico. A reação entre o azido e o alcino pode ocorrer com ou sem o uso de um catalisador. Em outras modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o grupo azido pode ser reduzido ao respectivo grupo amino e, em seguida, reagido com unidades reativas X de amino.

[000164] Os compostos de fórmula A compreendem uma unidade de perda neutra Y. A unidade de perda neutra Y é capaz de perder uma fração (uma entidade neutra) sem carga. A unidade de perda neutra Y é capaz de fragmentação, ou seja, sob condições de MS, por exemplo, quando submetida a dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo, em MS triplo quadrupolo, em que uma entidade neutra é liberada. A entidade neutra perdida é um único átomo ou uma pluralidade de átomos. Após a liberação da entidade neutra, o restante da unidade de perda neutra Y ainda permanece neutra. Normalmente, mas não necessariamente, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades particulares do quarto aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas.

[000165] Em modalidades do quarto aspecto da presente

invenção, a unidade de perda neutra Y libera pelo menos uma entidade neutra após ionização. A entidade neutra é uma entidade neutra de baixo peso molecular, em particular em uma faixa de 10-100 Da, em particular 20-80 Da, em particular 25-65 Da. Em particular, a entidade neutra tem um peso molecular de 100 Da ou menos, em particular de 80 Da ou menos, em particular de 70 Da ou menos, em particular de 50 Da ou menos, em particular de 30 Da ou menos.

[000166] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a entidade neutra é selecionada a partir do grupo que consiste em N<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>, SO, SO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>. Em modalidades particulares, a entidade neutra é N<sub>2</sub>.

[000167] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a perda da entidade neutra leva a uma redução da razão massa/carga (m/z) em -28 Da (no caso de perda de N<sub>2</sub> ou CO), -30 Da (no caso de perda de NO), -44 Da (no caso de perda de CO<sub>2</sub>), -46 Da (no caso de perda de NO<sub>2</sub>), -48 Da (no caso de perda de SO) ou -64 Da (no caso de perda de S<sub>2</sub> ou SO<sub>2</sub>).

[000168] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas. Em particular, a segunda entidade neutra liberada é diferente da primeira entidade neutra liberada. A liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente ou subsequentemente à liberação da primeira entidade neutra. Em particular, a liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente à liberação da primeira entidade neutra, ou seja, ambas as entidades neutras são liberadas ao mesmo tempo, ou seja, em um único evento de fragmentação.

[000169] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração

cíclica que é capaz de fragmentação. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração heterocíclica de 4, 5 ou 6 membros, particularmente uma fração heterocíclica de 4, 5, 6 membros com pelo menos 2 heteroátomos adjacentes uns aos outros, em particular dois átomos N adjacentes uns aos outros. Na modalidade do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em triazol, tetrazol, tetrazina, oxadiazol, fração tiadiazol ou um derivado hidrogenado dos mesmos. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,4,5-triazol, fração 3,4,5-triazol, uma fração 1,2,3,4-tetrazol, 2,3,4,5-tetrazol ou uma fração 2,3,5,6 tetrazol ou uma fração 1,2,4,5 tetrazina. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol ou 1,2,4-triazol, ou uma fração 1,2,3,4-tetrazol, ou uma fração 1,2,4,5 tetrazina.

[000170] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é permanentemente carregada, em particular sob condições neutras, em particular a um valor de pH de 6-8.

[000171] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é carregada positivamente ou negativamente, de preferência carregada positivamente.

[000172] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z compreende ou consiste em:

(i) pelo menos uma fração carregada positivamente;

ou

(ii) pelo menos uma fração carregada negativamente.

[000173] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada positivamente. Em

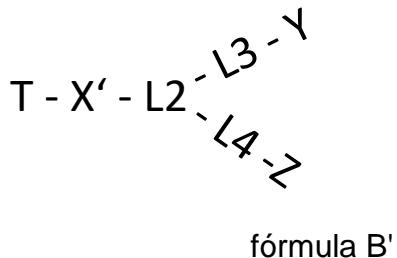
modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z, é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pKa de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pKa de 12 ou mais. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z é selecionada a partir do grupo que consiste em amônio primário, secundário, terciário ou quaternário, sulfônio, imidazólio, piridínio ou um fosfônio. Em modalidades particulares do quarto aspecto, a fração carregada positivamente é tri-metil-amônio, N,N-dimetil-piperidínio ou N-alquil-quinuclidínio.

[000174] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada negativamente. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pKb de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pKb de 12 ou mais. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é selecionada a partir do grupo que consiste em um fosfato, sulfato, sulfonato ou carboxilato.

[000175] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ligante ramificado L1 é um ligante trifuncional. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ligante L1 é substituído ou não substituído. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 não é protonável. Em modalidades do quarto aspecto, o ligante trifuncional L1 compreende 3 a 30 átomos de C, em particular 5-20 átomos de C, em particular 8-16 átomos de C. Em modalidades, o ligante trifuncional L1 compreende 1 ou mais heteroátomos, em particular N, O ou S. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 compreende pelo menos 4 heteroátomos, em particular 5, 6 ou 7 heteroátomos, em particular N e/ou O. Em modalidades do quarto aspecto da presente

invenção, o ligante trifuncional L1 compreende 5 heteroátomos, em particular 3 átomos de O e 2 átomos de N.

[000176] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de acordo com a fórmula B':



em que:

T, X', X, Y e Z, são conforme definidos em detalhes acima, no que diz respeito ao aduto de fórmula A',

L2, L3 e L4 são ramificações de ligante, cada um individualmente compreendendo C1-C10, em particular C1-C5, opcionalmente, cada um individualmente compreendendo um ou mais heteroátomos, opcionalmente cada um individualmente sendo substituído ou não substituído, e

em que as ramificações de ligante L2, L3 e L4, juntas, formam o ligante L1 ramificado, em particular o trifuncional, conforme definido acima.

[000177] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 são cada uma individualmente ligante linear.

[000178] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 têm o comprimento idêntico ou diferente. Em particular, a ramificação de ligante L2 é mais longa do que as ramificações de ligante L3 e L4, respectivamente. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L2 tem um comprimento de C3-C6. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L3 e L4 têm, cada uma, um comprimento

de C1-C3. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, independentemente do comprimento de cada uma das ramificações, individualmente cada ramificação de ligante L2, L3, L4 pode compreender um ou mais heteroátomos. Em modalidades particulares do quarto aspecto da presente invenção, todas as três ramificações de ligante compreendem pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o heteroátomo é N, S, P ou O, em particular N e/ou O.

[000179] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a ramificação linear L4 compreende uma unidade de estabilização. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z durante o evento de fragmentação. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z ao desestabilizar a carbocação potencialmente formada. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é separada por um átomo de C da unidade carregada Z. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização compreende pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é selecionada a partir do grupo que consiste em CO, ou seus análogos isoelétricos, como SO ou SO2.

[000180] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L2 compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que o ramo de ligação L2 compreende 7 átomos de C, ele compreende 3 heteroátomos, em particular um átomo de O e N. Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, em que o ramo de ligação L2 compreende 3, 4, 5 ou 6 átomos de C, ele compreende 2 heteroátomos, em particular um átomo de O e N, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O. Em modalidades do

quarto aspecto da presente invenção, em que o ramo de ligação L2 compreende 2 átomos de C, ele compreende 1 heteroátomo, em particular um átomo de O.

[000181] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ramo de ligação L3 compreende 2-10 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000182] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o ramo de ligação L4 compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 1 ou 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N ou 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000183] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade reativa de dieno X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros e a unidade carregada Z é uma unidade permanentemente carregada positivamente.

[000184] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazina X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000185] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazida X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um

grupo de amônio terciário.

[000186] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazina X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000187] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazida X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000188] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazina X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000189] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de uma unidade de hidrazone X com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000190] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de um reagente do tipo Cookson com uma molécula de

analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000191] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de um reagente do tipo Cookson com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000192] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de um reagente do tipo Cookson com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000193] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de H<sub>2</sub>N-NH- com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de amônio terciária.

[000194] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de H<sub>2</sub>N-NH- com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000195] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de H<sub>2</sub>N-NH- com uma molécula de analito T, a unidade de perda

neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

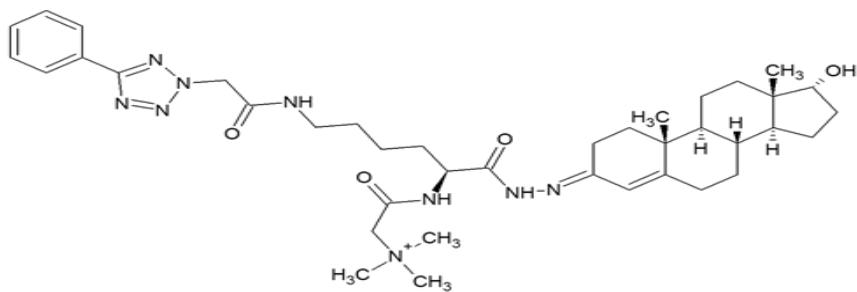
[000196] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de H<sub>2</sub>N-O-C- com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3 -triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade dimetil-piperidina ou quinuclidina.

[000197] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o aduto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de 1,2,4-triazolin-3,5-diona com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3 -triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma fração de dimetil-piperidina ou quinuclidina.

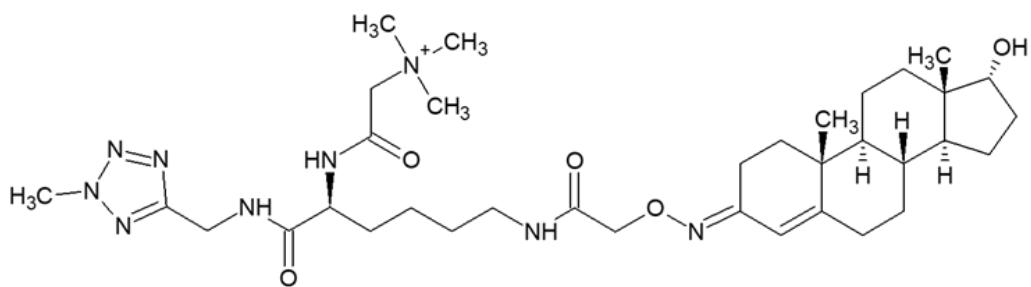
[000198] Em modalidades do quarto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A' ou fórmula B', em que X' resulta da reação de H<sub>2</sub>N-NH com uma molécula de analito T, a unidade de perda neutra Y é azido-benzeno, ou 1,2,5-trazaespiro[2.4]hept-1-eno ou metilsulfiniletano, e a unidade carregada Z é um espiro[2H-isoindol-2,1'-pirrolidínio], 1,3-di-hidro ou 5-Azoniaspiro[4.4]nonano.

[000199] Em modalidades, o aduto de fórmula B' é selecionado a partir do grupo que consiste em

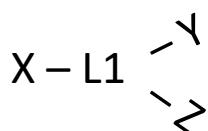
(i) Aduto 1:



(ii) Aduto 2:



[000200] Em um quinto aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de um composto de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração carregada permanentemente, em particular uma fração carregada permanentemente,

incluindo qualquer sal do mesmo,

ou de uma composição ou kit compreendendo pelo menos um composto de fórmula A,

caracterizado por ser para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito, em que a determinação de espectrometria de massa compreende particularmente uma determinação de espectrometria de massa em tandem, mais particularmente em um dispositivo triplo quadrupolo.

[000201] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o uso de um composto de fórmula A compreende o uso como um reagente de derivatização. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto de fórmula A é usado para aumentar a sensibilidade da

medição de MS. Em modalidades, o composto de fórmula A é usado para detectar o analito de interesse em um nível inferior de detecção, em particular em um nível inferior de quantificação.

[000202] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto de fórmula A de acordo com a presente invenção compreende uma unidade reativa X que é capaz de reagir com uma molécula de analito. A unidade reativa X é capaz de reagir com uma molécula de analito de tal modo que uma ligação covalente entre o composto de fórmula A e a molécula de analito seja formada. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X forma uma ligação covalente com o composto de fórmula A. Em particular, a ligação covalente é formada entre a unidade reativa X do composto de fórmula A e um grupo funcional presente na molécula do analito.

[000203] Dependendo dos grupos funcionais presentes na molécula de analito a ser determinada, o técnico no assunto selecionará uma unidade reativa X apropriada para o composto de fórmula A. É de conhecimento comum decidir qual unidade reativa X se qualificará para a ligação a um grupo funcional de um analito de interesse.

[000204] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo funcional selecionado do grupo que consiste em grupo carbonila, grupo dieno, grupo hidroxila, grupo amina, grupo imina, grupo tiol, grupo diol, grupo fenólico, grupo epóxido, grupo dissulfeto e grupo azida, cada um dos quais é capaz de formar uma ligação covalente com a unidade reativa X do composto de fórmula A. Além disso, também está contemplado no escopo da presente invenção que um grupo funcional está presente em uma molécula de analito seria primeiro convertido em outro grupo que está mais prontamente disponível para reação com a unidade X reativa de compostos de fórmula A.

[000205] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é selecionada a partir do grupo que consiste em esteróides, cetosteróides, secosteróides, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas incluindo metabólitos e cofatores de moléculas pequenas, bem como drogas terapêuticas, drogas de abuso, toxinas ou seus metabólitos.

[000206] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo carbonila como grupo funcional que é selecionado a partir do grupo que consiste em um grupo ácido carboxílico, grupo aldeído, grupo ceto, um aldeído mascarado, grupo ceto mascarado, grupo éster, grupo amida e grupo anidrido.

[000207] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo amida, o técnico no assunto está bem ciente de que o grupo amida, como tal, é um grupo estável, mas que pode ser hidrolisado para converter o grupo amida em um grupo de ácido carboxílico e um grupo amina. A hidrólise do grupo amida pode ser alcançada por meio da reação catalisada por ácido/base ou por processo enzimático, qualquer um dos quais é bem conhecido pelo técnico. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que o grupo carbonila é um grupo aldeído mascarado ou um grupo ceto mascarado, o respectivo grupo é um grupo hemiacetal ou grupo acetal, em particular um grupo hemiacetal cílico ou grupo acetal. Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo acetal, é convertido em um grupo aldeído ou ceto antes da reação com o composto de fórmula A.

[000208] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo ceto. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo ceto pode ser transferido para um grupo

imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa de compostos de fórmula A. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos ceto é um cetosteróide. Em modalidades particulares do quinto aspecto da presente invenção, o cetosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em testosterona, epitestosterona, dihidrotestosterona (DHT), desoximetiltestosterona (DMT), tetrahidrogestrinona (THG), aldosterona, estrona, 4-hidroxiestrona, 2- metoxiestrona, 2-hidroxiestrona, 16-cetoestradiol, 16 alfa-hidroxiestrona, 2-hidroxiestrona-3-metiléter, prednisona, prednisolona, pregnenolona, progesterona, DHEA (dehidroepiandrosterona), 17-OH pregnenolona, 17-OH progesterona, 17-OH progesterona, androsterona, epiandrosterona e delta 4 androstenediona) 11-desoxicortisol corticosterona, 21-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona, alopregnolona e aldosterona.

[000209] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo carboxila. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carboxila reage diretamente com o composto de fórmula A ou é convertido em um grupo éster ativado antes da reação com o composto de fórmula A. Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido  $\Delta$ 8-Tetrahidrocanabinol, Benzoilecgonina, ácido Salicílico, ácido 2-hidroxibenzóico, Gabapentina, Pregabalina, ácido Valpróico, Vancomicina, Metotrexato, ácido Micofenólico, Montelucaste, Repaglinida, Furosemida, Telmisartan, Gemfibrozil, Diclorofenaco, Ibuprofeno, Indometacina, Zomepirac, Isoxepac e Penicilina. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos carboxila é um aminoácido selecionado do grupo que consiste em arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, asparagina, histidina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano,

alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenialanina, valina, prolina e glicina.

[000210] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo aldeído. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo aldeído pode ser transferido para um grupo imina intermediário antes de reagir com a unidade reativa de compostos de fórmula A. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos aldeído são selecionados do grupo que consiste em Piridoxal, N-Acetil-D-glucosamina, Alcaftadina, Estreptomicina, Josamicina.

[000211] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo éster carbonila. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos éster é selecionada a partir do grupo que consiste em Cocaína, Heroína, Ritalina, Aceclofenaco, Aceticolina, Amcinonida, Amiloxato, Amilocaína, Anileridina, Aranidipina e Artesunato, Petidina.

[000212] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo carbonila é um grupo anidrido. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos anidrido é selecionada a partir do grupo que consiste em Cantaridina, Anidrido Succínico, Anidrido Trimelítico e Anidrido Maleico.

[000213] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dieno, em particular, grupos dieno conjugados, como grupo funcional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dieno é um secosteróide. Em modalidades, o secosteróide é selecionado a partir do grupo que consiste em Colecalciferol (Vitamina D3), Ergocalciferol (Vitamina D2), Calcidiol, Calcitriol, Taquisterol, Lumisterol e Tacalcitol. Em particular, o secosteróide é Vitamina D, em particular, Vitamina

D2 ou D3 ou derivados das mesmas. Em modalidades particulares, o secosteróide é selecionado do grupo que consiste em Vitamina D2, Vitamina D3, 25-Hidroxi Vitamina D2, 25-Hidroxi Vitamina D3, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D2, 3-Epi-25-Hidroxi Vitamina D3, 1,25-Di-hidroxi Vitamina D2, 1,25-Di-hidroxi Vitamina D3, 24,25-Di-hidroxi Vitamina D2 e 24,25-Di-hidroxi Vitamina D3, Vitamina A, Tretinoína, Isotretinoína, Alitretinoína, Natamicina, Sirolimus, Anfotericina B, Nistatina, Everolimo, Tensirolimo, Fidaxomicina.

[000214] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila como grupo funcional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um único grupo hidroxila ou dois grupos hidroxila. Em modalidades em que mais de um grupo hidroxila está presente, os dois grupos hidroxila podem ser posicionados adjacentes um ao outro (1,2 diol) ou podem ser separados por 1, 2 ou 3 átomos de C (1,3-diol, 1,4-diol, 1,5-diol, respectivamente). Em modalidades particulares do quinto aspecto, a molécula de analito compreende um grupo 1,2 diol. Em modalidades em que apenas um grupo hidroxila está presente, o referido analito é selecionado do grupo que consiste em álcool primário, álcool secundário e álcool terciário. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a molécula de analito compreende um ou mais grupos hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em álcool benzílico, Mentol, L-Carnitina, Piridoxina, Metronidazol, Mononitrato de Isossorbida, Guaifenesina, Clavulanato, Migitol, Zalcitabina, Isoprenalina, Aciclovir, Metocarbamol, Tramadol, Venlafaxina, Atropina, Clofedanol, alfa-Hidroxi-alprazolam, alfa-Hidroxi-triazolam, Lorazepam, Oxazepam, Temazepam, Etil glucuronido, Etilmorphina, Morfina, Morfina-3-glucuronido, Buprenorfina, Codeína, Di-Hidrocodeína, p-Hidroxipropoxifeno, O-Desmetiltramadol, Di-hidroquinidina, Quinidina. Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a molécula de

analito compreende mais de um grupo hidroxila, o analito é selecionado do grupo que consiste em Vitamina C, Glucosamina, Manitol, Tetra-hidrobiopterina, Citarabina, Azacitidina, Ribavirina, Floxuridina, Gemcitadina, Esteptozocina, Adenosina, Vibarabina, Cladribina, Estriol, Trifluridina, Clofarabina, Nadolol, Zanamivir, Lactulose, Monofosfato de adenosina, Idoxuridina, Regadenoson, Lincomicina, Clindamicina, Canagliforcina, Tobramicina, Netilmicina, Canamicina, Ticagrelor, Epirrubicina, Doxorrubicina, Arbecacina, Esteptomicina, Ouabaína, Amicacina, Neomicina, Framicetina, Paromomicina, Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina, Vindesina, Digitoxina, Digoxina, Metrizamida, Acetildigitoxina, Deslanoside, Fludarabina, Clofarabina, Gemcitabina, Citarabina, Capecitabina, Vindicadina, Trifarabina, Idoxuridina e Plicamicina.

[000215] Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos tiol (incluindo, mas não se limitando a grupos alquil-tiol e tiol-arila) como grupo funcional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em ácido Tiomandélico, DL-Captopril, DL-Tiorfano, N-Acetilcisteína, D-Penicilamina, Glutationa, L-Cisteína, Zefenoprilato, Tiopronina, Dimercaprol, Succímero.

[000216] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos dissulfeto como grupo funcional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em Dissulfeto de Glutationa, Dipiritiona, Sulfeto de Selênio, Dissulfiram, Ácido Lipóico, L-Cistina, Fursultiamina, Octreotida, Desmopressina, Vapreotide, Terlipressina, Linaclotide, Peginesatide.

[000217] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos epóxido como grupo funcional. Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos epóxidos é selecionada a partir do grupo que consiste em Carbamazepina 10,11 epóxido, Carfilzomib, Furosemida epóxido e Fosfomicina, Sevelamer, Cerulenina, Escopolamina, Tiotrópico, Metil-escopolamina brometo, Eplerenona, Mupirocina, Natamicina, Carfilzomib, Troleandomicina.

[000218] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um ou mais grupos fenol como grupo funcional. Em modalidades particulares do quinto aspecto da presente invenção, moléculas de analito compreendendo um ou mais grupos fenol são esteróides ou compostos semelhantes a esteróides. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos fenol é um esteróide ou um composto semelhante a esteróide tendo um anel A que é  $sp^2$  hibridizado e um grupo OH na posição 3 do anel A. Em modalidades particulares do quinto aspecto da presente invenção, o esteróide ou molécula de analito semelhante a esteróide é selecionada a partir do grupo que consiste em estrogênio, compostos semelhantes a estrogênio, estrona (E1), estradiol (E2), 17a-estradiol, 17p- estradiol, estriol (E3), 16-epiestriol, 17-epiestriol e 16, 17-epiestriol e/ou seus metabólitos. Nas modalidades, os metabólitos são selecionados a partir do grupo que consiste em estriol, 16-epiestriol (16-epiE3), 17-epiestriol (17-epiE3), 16,17-epiestriol (16,17-epiE3), 16-cetoestradiol (16-cetoE2), 16a-hidroxiestrona (16a-OHE1), 2-metoxiestrona (2-MeOE1), 4-metoxiestrona (4-MeOE1), 2-hidroxiestrona-3-éter metílico (3-MeOE1), 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), 4-metoxiestradiol (4-MeOE2), 2-hidroxiestrona (20HE1), 4-hidroxiestrona (4-OHE1), 2-hidroxiestradiol (2-OHE2), estrona (E1), sulfato de estrona (E1s), 17a-estradiol (E2a), 17p-estradiol

(E2b), sulfato de estradiol (E2s), equilina (EQ), 17a-di-hidroequilina (EQa), 17p-di-hidroequilina (EQb), Eqilenina (EN), 17-di-hidroequilenina (ENa) 17 $\beta$ -di-hidroequilenina (ENb), A8,9-desidroestrona (dEI), A8,9-desidroestrona sulfato (dEIs),  $\Delta$ 9-Tetra-hidrocanabinol, ácido micofenólico.

[000219] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo amina como grupo funcional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo amina é uma alquil-amina ou um grupo aril-amina. Nas modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o analito compreendendo um ou mais grupos amina é selecionado a partir do grupo que consiste em proteínas e peptídeos. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um grupo amina é selecionada a partir do grupo que consiste em 3,4-metilendioxianfetamina, 3,4-metilendoxi-N-etilanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina, anfetamina, metanfetamina, N-metil-1,3-benzodioxolilbutanamina, 7-Aminoclonazepam, 7-aminoflunitrazepam, 3,4-Dimetilmecatinona, 3-Fluorometcatinona, 4-Metoximetcatinona, 4-Metiletcatinona, 4-Metilmecatinona, Anfepramona, Butilona, Metilmetona, Ethcathinone, Flefedrona, Metcatinona, Metilona, Methylendioxypyrovaleron, Benzoilecgonina, Dehydronorketamine, Cetamina, Norcetamina, Metadona, Normetadona, 6-acetilmorfina, Diacetilmorfina, Morfina, Norhydrocodone, Oxicodona, Oximorfona, Fenciclidina, Norpropoxyphene, Amitriptilina, Clomipramina, Dothiepin, doxepina, Imipramina, Nortriptilina, Trimipramina, Fentanila, Glicilxilidida, Lidocaína, Monoetilglicilxilidida, N-Acetyl Procainamida, Procainamida, Pregabalina, 2-Metilamino-1-(3, 4-metilendioxifenil) butano, 2-Amino-1-(3,4-metilendioxifenil) butano, Normeperidina, O-Destramadol, Tramadol, Lidocaína, N-Acetyl Procainamida, Procainamida, Gabapentina, Lamotrigina, Teofilina, Amicacina, Gentamicina, Tobramicina, Vancomicina, Metotrexat, Gabapentina, Sisomicina e 5-Metilcitosina.

[000220] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é um carboidrato ou substância com uma fração de carboidrato, por exemplo, uma glicoproteína ou um nucleosídeo. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é um monossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em ribose, desoxirribose, arabinose, ribulose, glicose, manose, galactose, fucose, frutose, N-acetilglucosamina, N- acetilgalactosamina, ácido neuramínico, ácido N-acetilneuromínico, etc. Em modalidades, a molécula de analito é um oligossacarídeo, em particular selecionado do grupo que consiste em um dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, polissacarídeo. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o dissacarídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em sacarose, maltose e lactose. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito é uma substância que compreende a fração mono-, di-, tri-, tetra-, oligo- ou polissacarídeo descrita acima.

[000221] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreende um grupo azida como grupo funcional que é selecionado do grupo que consiste em alquila ou arila azida. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a molécula de analito compreendendo um ou mais grupos azida é selecionada a partir do grupo que consiste em Zidovudina e Azidocilina.

[000222] Essas moléculas de analito podem estar presentes em amostras biológicas ou clínicas, como líquidos corporais, por exemplo, sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal, etc., tecidos ou extratos celulares, etc. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a(s) molécula(s) de analito estão presentes em uma amostra biológica ou clínica selecionada do grupo que consiste em sangue, soro, plasma, urina, saliva, fluido espinhal e uma mancha de sangue seco. Em algumas modalidades do

quinto aspecto da presente invenção, as moléculas de analito podem estar presentes em uma amostra que é uma amostra purificada ou parcialmente purificada, por exemplo, uma mistura ou extrato de proteína purificada ou parcialmente purificada.

[000223] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carbonila, unidade reativa de dieno, unidade reativa de hidroxila, unidade reativa de amino, uma unidade reativa de imina, uma unidade reativa de tiol, uma unidade reativa de diol, uma unidade reativa de fenol, unidade reativa de epóxido, uma unidade reativa de dissulfeto e uma unidade reativa de azido.

[000224] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de carbonila, que é capaz de reagir com qualquer tipo de molécula possuindo um grupo carbonila. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carboxila, unidade reativa de ceto, unidade reativa de aldeído, unidade reativa de anidrido, unidade reativa de éster carbonílico e unidade reativa de imida. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila pode ter um átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito a através de um átomo O ou N adjacente NH<sub>2</sub>-N/O ou uma molécula de ditiol. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de carbonila é selecionada a partir do grupo:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,

(ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade

carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  ou  $\text{H}_2\text{N}-\text{NR}^2-\text{C}(\text{O})-$ ,

em que  $\text{R}^2$  é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou  $\text{C}_{1-4}$  alquila, particularmente  $\text{C}_1$  ou  $\text{C}_2$  alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou  $\text{C}_{1-3}$ alcoxi,

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo, uma unidade  $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-$ , e

(iv) uma unidade ditiol, particularmente uma unidade 1,2-ditiol ou 1,3-ditiol.

[000225] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a unidade reativa de carbonila é uma unidade reativa de carboxila, as unidades reativas de carboxila reagem com grupos carboxila em uma molécula de analito. Na modalidade do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa carboxila é selecionada a partir do grupo que consistem em uma unidade de diazo, um haleto de alquila, amina, e unidade de hidrazina.

[000226] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dieno, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo dieno. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dieno é selecionada a partir do grupo que consiste em reagentes do tipo Cookson, por exemplo, 1,2,4-triazolin-3,5-dionas, que são capazes de atuar como dienófilos.

[000227] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de hidroxila, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo hidroxila. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, as unidades reativas de hidroxila são selecionadas a partir do grupo que consiste em cloretos de sulfonila, ésteres carboxílicos ativados (NHS ou imidazolida) e fluoro aromatos/heteroaromatos

capazes de substituição nucleofílica do flúor (T. Higashi J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Sep;162:57-69). Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de diol que reage com um grupo diol em uma molécula de analito. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a unidade reativa é uma unidade reativa de 1,2 diol, a unidade reativa de 1,2 diol compreende ácido borônico. Em outras modalidades, os dióis podem ser oxidados nas respectivas cetonas ou aldeídos e, em seguida, reagir com unidades reativas X de cetona/aldeído.

[000228] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino reage com grupos amino em uma molécula de analito. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de amino é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo éster ativo, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) ou sulfo éster de NHS, éster pentafluorofenílico, éster carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HOBt), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) e uma unidade de cloreto de sulfonila.

[000229] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol reage com um grupo tiol em uma molécula de analito. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de tiol é selecionada a partir do grupo que consiste em grupo haloacetila, em particular selecionado a partir do grupo que consiste em unidade Br/I-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, unidade acrilamida/éster, unidade de imida insaturada, tais como unidade de metilsulfonil feniloxadiazol e cloreto de sulfonila.

[000230] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol reage com grupos fenol em uma molécula de analito. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de fenol é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade de

éster ativa, tal como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) ou éster de sulfo-NHS, éster pentafluorofenílico, éster de carbonilimidazol, ésteres de ácido quadrático, um éster de hidroxibenzotriazol (HOBt), éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) e uma unidade de cloreto de sulfonila. Grupos fenol presentes em uma molécula de analito podem ser reagidos com triazol diona por meio de uma reação (H. Ban et al J. Am. Chem. Soc., 2010, 132 (5), pp 1523–1525) ou por diazotização ou, alternativamente, por orto nitração seguida por redução a uma amina que pode então reagir com um reagente reativo de amina.

[000231] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de epóxido, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo epóxido. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é selecionada a partir do grupo que consiste em amino, tiol, átomo N supernucleofílico fortalecido pelo efeito  $\alpha$  através de um átomo O ou N adjacente da molécula NH<sub>2</sub>-N/O. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de epóxido é selecionada a partir do grupo:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-, ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>1</sup>-, em que R<sup>1</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou alcoxi C<sub>1-3</sub>,

(ii) uma unidade de hidrazida, em particular, uma unidade carbo-hidrazida ou uma sulfo-hidrazida, em particular, uma unidade H<sub>2</sub>N-NH-C(O)- ou H<sub>2</sub>N-NR<sup>2</sup>-C(O)-,

em que R<sup>2</sup> é arila, arila contendo 1 ou mais heteroátomos ou C<sub>1-4</sub>alquila, particularmente C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> alquila, opcionalmente substituído, por exemplo, com halo, hidroxila e/ou C<sub>1-3</sub> alcoxi, e

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo uma unidade  $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-$ .

[000232] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de dissulfeto, que é capaz de reagir com um analito compreendendo um grupo dissulfeto. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa de dissulfeto é selecionada a partir do grupo que consiste em tiol. Em outras modalidades, o grupo dissulfeto pode ser reduzido ao respectivo grupo tiol e, em seguida, reagir com as unidades X reativas com tiol.

[000233] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa X é uma unidade reativa de azido que reage com grupos azido em uma molécula de analito. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade reativa com azido reage com grupos azido através da cicloadição azida-alquino. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade azido-reativa é selecionada a partir do grupo que consiste em alquino (alquil ou aril), alquino linear ou alquino cíclico. A reação entre o azido e o alcino pode ocorrer com ou sem o uso de um catalisador. Em outras modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o grupo azido pode ser reduzido ao respectivo grupo amino e, em seguida, reagido com unidades reativas X de amino.

[000234] Os compostos de fórmula A compreendem uma unidade de perda neutra Y. A unidade de perda neutra Y é capaz de perder uma fração (uma entidade neutra) sem carga. A unidade de perda neutra Y é capaz de fragmentação, ou seja, sob condições de MS, por exemplo, quando submetida a dissociação induzida por colisão (CID), por exemplo, em MS triplo quadrupolo, em que uma entidade neutra é liberada. A entidade neutra perdida é um único átomo ou uma pluralidade de átomos. Após a liberação da entidade neutra, o restante da unidade de perda neutra Y ainda permanece neutra.

Normalmente, mas não necessariamente, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades particulares do quinto aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas.

[000235] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y libera pelo menos uma entidade neutra após ionização. A entidade neutra é uma entidade neutra de baixo peso molecular, em particular em uma faixa de 10-100 Da, em particular 20-80 Da, em particular 25-65 Da. Em particular, a entidade neutra tem um peso molecular de 100 Da ou menos, em particular de 80 Da ou menos, em particular de 70 Da ou menos, em particular de 50 Da ou menos, em particular de 30 Da ou menos.

[000236] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a entidade neutra é selecionada a partir do grupo que consiste em N<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>, SO, SO<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub>. Em modalidades particulares, a entidade neutra é N<sub>2</sub>.

[000237] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a perda da entidade neutra leva a uma redução da razão massa/carga (m/z) em -28 Da (no caso de perda de N<sub>2</sub> ou CO), -30 Da (no caso de perda de NO), -44 Da (no caso de perda de CO<sub>2</sub>), -46 Da (no caso de perda de NO<sub>2</sub>), -48 Da (no caso de perda de SO) ou -64 Da (no caso de perda de S<sub>2</sub> ou SO<sub>2</sub>).

[000238] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, uma entidade neutra é liberada. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, duas entidades neutras são liberadas. Em particular, a segunda entidade neutra liberada é diferente da primeira entidade neutra liberada. A liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente ou subsequentemente à liberação da primeira entidade neutra. Em particular, a liberação da segunda entidade neutra ocorre simultaneamente à liberação da

primeira entidade neutra, ou seja, ambas as entidades neutras são liberadas ao mesmo tempo, ou seja, em um único evento de fragmentação.

[000239] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração cíclica que é capaz de fragmentação. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração heterocíclica de 4, 5 ou 6 membros, particularmente uma fração heterocíclica de 4, 5, 6 membros com pelo menos 2 heteroátomos adjacentes uns aos outros, em particular dois átomos N adjacentes uns aos outros. Na modalidade do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em triazol, tetrazol, tetrazina, oxadiazol, fração tiadiazol ou um derivado hidrogenado dos mesmos. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,4,5-triazol, fração 3,4,5-triazol, uma fração 1,2,3,4-tetrazol, 2,3,4,5-tetrazol ou uma fração 2,3,5,6-tetrazol ou uma fração 1,2,4,5-tetrazina. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de perda neutra Y compreende ou consiste em uma fração 1,2,3-triazol ou 1,2,4-triazol, ou uma fração 1,2,3,4-tetrazol, ou uma fração 1,2,4,5-tetrazina.

[000240] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é permanentemente carregada, em particular sob condições neutras, em particular a um valor de pH de 6-8.

[000241] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é carregada positivamente ou negativamente, de preferência carregada positivamente.

[000242] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z compreende ou consiste em:

(i) pelo menos uma fração carregada positivamente;

ou

(ii) pelo menos uma fração carregada negativamente.

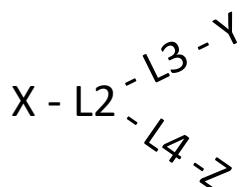
[000243] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada positivamente. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z, é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pKa de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pKa de 12 ou mais. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada positivamente Z é selecionada a partir do grupo que consiste em amônio primário, secundário, terciário ou quaternário, sulfônio, imidazólio, piridínio ou um fosfônio. Em modalidades particulares do quinto aspecto, a fração carregada positivamente é tri-metil-amônio, N,N-dimetil-piperidínio ou N-alquil-quinuclidínio.

[000244] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade carregada Z é uma unidade carregada negativamente. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é escolhida de uma maneira que o composto de fórmula A resultante tenha um pKb de 10 ou mais, mais particularmente, tenha um pKb de 12 ou mais. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade Z carregada negativamente é selecionada a partir do grupo que consiste em um fosfato, sulfato, sulfonato ou carboxilato.

[000245] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o ligante ramificado L1 é um ligante trifuncional. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o ligante L1 é substituído ou não substituído. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 não é protonável. Em modalidades do quinto aspecto, o ligante trifuncional L1 compreende 3 a 30 átomos de C, em particular 5-20 átomos de C, em particular 8-16 átomos de C. Em modalidades, o ligante trifuncional L1

compreende 1 ou mais heteroátomos, em particular N, O ou S. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 compreende pelo menos 4 heteroátomos, em particular 5, 6 ou 7 heteroátomos, em particular N e/ou O. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o ligante trifuncional L1 compreende 5 heteroátomos, em particular 3 átomos de O e 2 átomos de N.

[000246] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de acordo com a fórmula B:



fórmula B

em que:

X, Y e Z, são conforme definidos em detalhes acima, no que diz respeito ao composto de fórmula A,

L2, L3 e L4 são ramificações de ligante, cada um individualmente compreendendo C1-C10, em particular C1-C5, opcionalmente, cada um individualmente compreendendo um ou mais heteroátomos, e

em que as ramificações de ligante L2, L3 e L4, juntas, formam o ligante L1 ramificado, em particular o trifuncional, conforme definido acima.

[000247] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 são cada uma individualmente ligante linear.

[000248] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L2, L3 e L4 têm o comprimento idêntico ou diferente. Em particular, a ramificação de ligante L2 é mais longa do que as ramificações de ligante L3 e L4, respectivamente. Em modalidades do quinto

aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L2 tem um comprimento de C3-C6. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, as ramificações de ligante L3 e L4 têm, cada uma, um comprimento de C1-C3. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, independentemente do comprimento de cada uma das ramificações, individualmente cada ramificação de ligante L2, L3, L4 pode compreender um ou mais heteroátomos. Em modalidades particulares do quinto aspecto da presente invenção, todas as três ramificações de ligante compreendem pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o heteroátomo é N, S, P ou O, em particular N e/ou O.

[000249] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a ramificação linear L4 compreende uma unidade de estabilização. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z durante o evento de fragmentação. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização evita a perda da unidade carregada Z ao desestabilizar a carbocação potencialmente formada. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é separada por um átomo de C da unidade carregada Z. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização compreende pelo menos um heteroátomo. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a unidade de estabilização é selecionada a partir do grupo que consiste em CO, ou seus análogos isoelétricos, como SO ou SO2.

[000250] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L2 compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L2 compreende 7 átomos de C, ela compreende 3 heteroátomos, em particular um átomo de O e N. Em modalidades do quinto

aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L2 compreende 3, 4, 5 ou 6 átomos de C, ela compreende 2 heteroátomos, em particular um átomo de O e N, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O. Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, em que a ramificação de ligante L2 compreende 2 átomos de C, ela compreende 1 heteroátomo, em particular um átomo de O.

[000251] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L3 compreende 2-10 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000252] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, a ramificação de ligante L4 compreende 2-6 átomos de C e 1-3 heteroátomos, em particular 1 ou 2 heteroátomos, em particular 1 átomo de N ou 1 átomo de N e 1 átomo de O.

[000253] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade reativa de carbonila, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros e a unidade carregada Z é uma unidade permanentemente carregada positivamente.

[000254] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade reativa de dieno, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros e a unidade carregada Z é uma unidade permanentemente carregada positivamente.

[000255] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3

heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000256] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000257] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000258] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos, e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000259] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazina, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000260] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é uma unidade de hidrazida, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000261] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a

unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é um grupo de amônio terciário.

[000262] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000263] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é um reagente do tipo Cookson, a unidade de perda neutra Y é uma unidade heterocíclica de 5 membros compreendendo pelo menos 3 heteroátomos e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

[000264] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de amônio terciária.

[000265] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piperidina.

[000266] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de piridina.

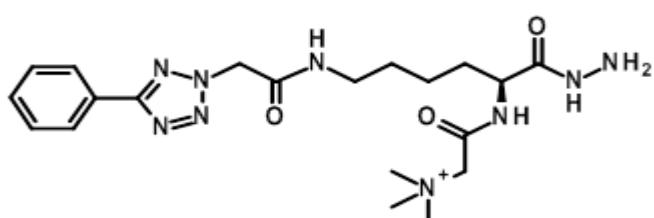
[000267] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é  $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-\text{C}-$ , a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma unidade de dimetil-piperidina ou quinuclidina.

[000268] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é 1,2,4-triazolin-3,5-diona, a unidade de perda neutra Y é 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, 1,2,3,4-tetrazol ou 1,2,4,5-tetrazina e a unidade carregada Z é uma fração dimetil-piperidina ou quinuclidina.

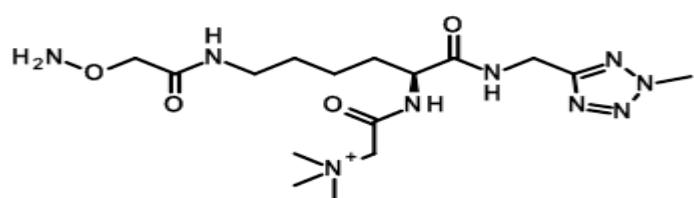
[000269] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto tem uma estrutura de fórmula A ou fórmula B, em que a unidade reativa X é  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-$ , a unidade de perda neutra Y é azido-benzeno, ou 1,2,5-trazaespiro[2.4]hept-1-eno ou metilsulfiniletano, e a unidade carregada Z é um espiro[2H-isoindol-2,1'-pirrolidínio], 1,3-di-hidro ou 5-Azoniaspiro[4.4]nonano.

[000270] Em modalidades do quinto aspecto da presente invenção, o composto de fórmula B é selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) Marca 1:

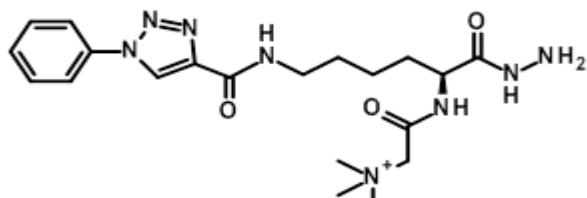


(ii) Marca 2:



e

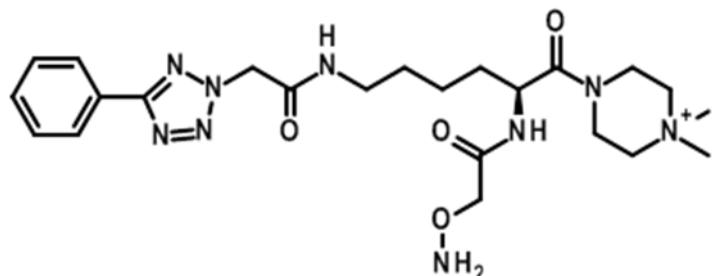
(iii) Marca 3:



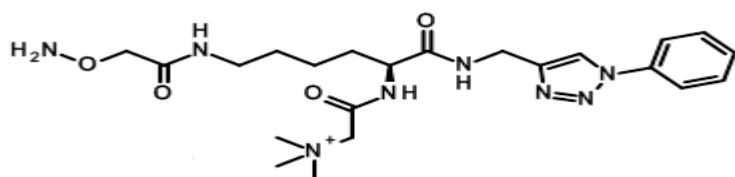
[000271] Outros exemplos do composto de fórmula A ou

fórmula B são os seguintes:

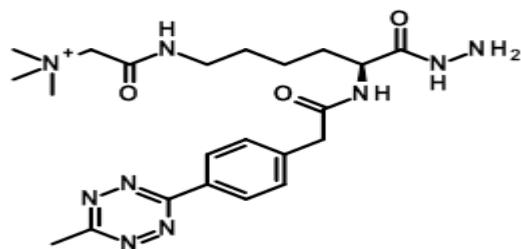
(iv) Marca 4:



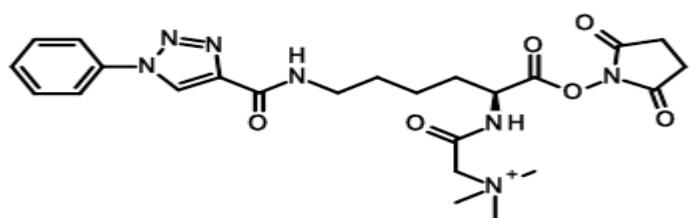
(v) Marca 5:



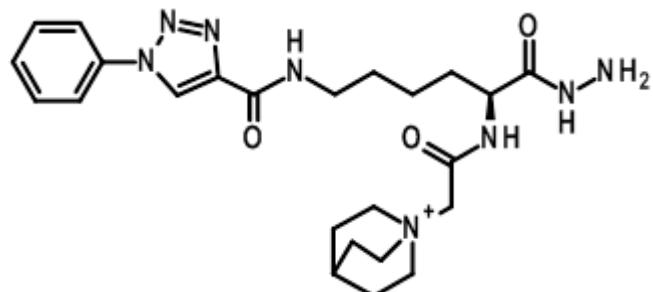
(vi) Marca 6:



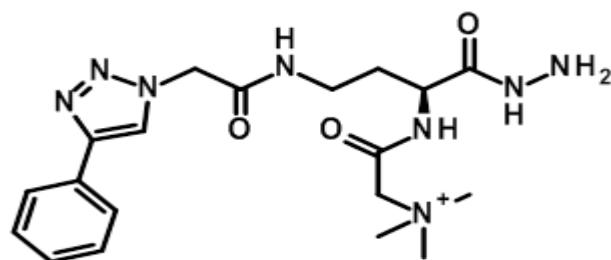
(vii) Marca 7:



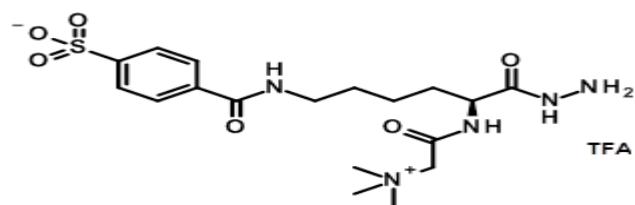
(viii) Marca 8



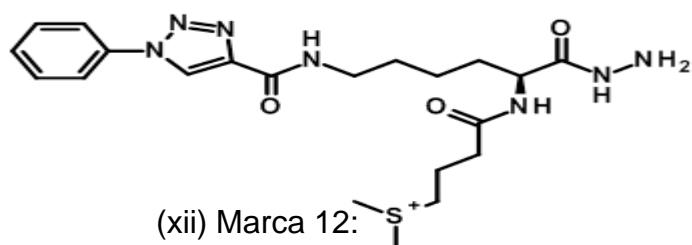
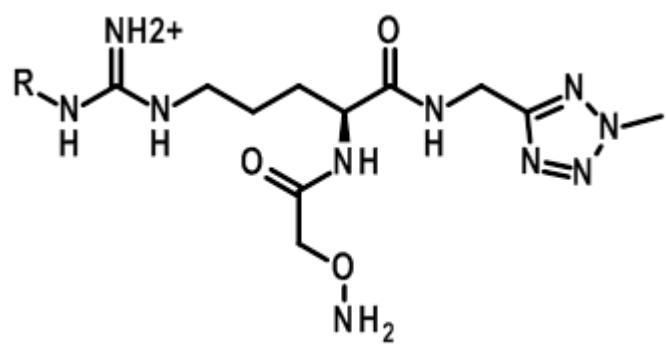
(ix) Marca 9:



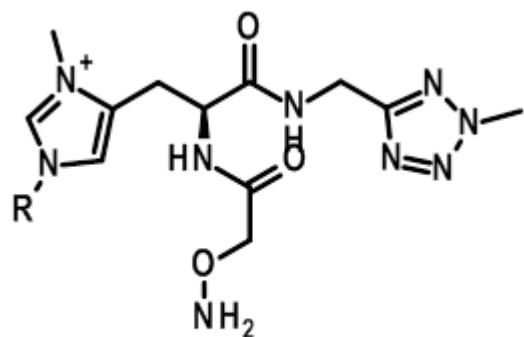
(x) Marca 10:



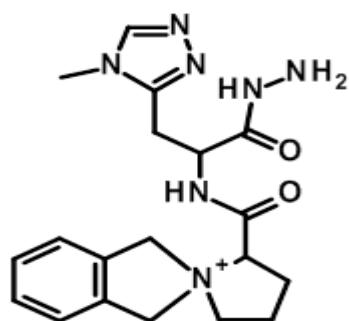
(xi) Marca 11

(xii) Marca 12:  $\text{--S}^+$ 

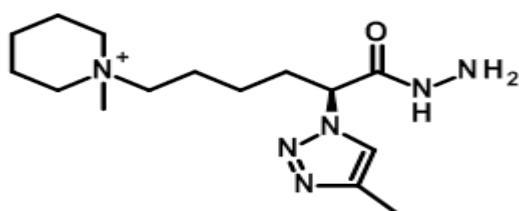
(xiii) Marca 13:

**R = H, alquila, arila**

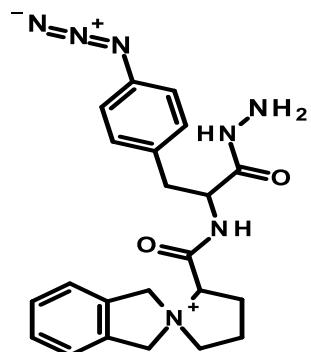
(xiv) Marca 14:



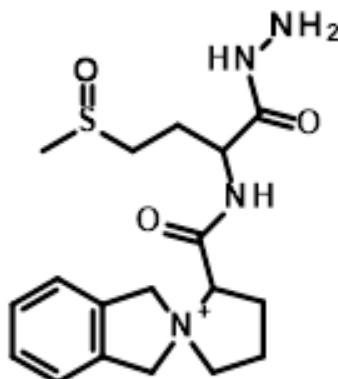
(xv) Marca 15:



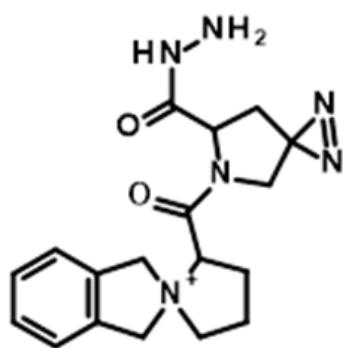
(xvi) Marca 16:



(xvii) Marca 17:



(xviii) Marca 18:



[000272] Em um sexto aspecto, a presente invenção refere-se a um método para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito compreendendo as etapas:

(a) reagir a molécula de analito com um composto de fórmula A como divulgado aqui, acima, no que diz respeito ao primeiro aspecto da presente invenção, em que um aduto covalente da molécula de analito e do composto de fórmula A é formado, e

(b) submeter o aduto da etapa (a) a uma análise de espectrometria de massa.

[000273] A etapa (a) pode ocorrer em diferentes estágios dentro do fluxo de trabalho de preparação de amostra antes da determinação de espectrometria de massa. As amostras que compreendem uma molécula de

analito podem ser pré-tratadas e/ou enriquecidas por vários métodos. O método de pré-tratamento depende do tipo de amostra, como sangue (fresco ou seco), plasma, soro, urina ou saliva, enquanto o método de enriquecimento depende do analito de interesse. É bem conhecido pelos técnicos no assunto qual amostra de pré-tratamento é adequada para cada tipo de amostra. É também bem conhecido pelos técnicos no assunto qual método de enriquecimento é adequado para cada analito de interesse.

[000274] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a etapa (a) do presente método para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito ocorre i) subsequentemente a uma etapa de pré-tratamento da amostra, ii) subsequente a um primeiro enriquecimento da amostra, ou iii) subsequente a um segundo enriquecimento da amostra.

[000275] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a amostra é uma amostra de sangue total, ela é atribuída a um de dois fluxos de trabalho de pré-tratamento (PT) de amostra pré-definida, ambos compreendendo a adição de um padrão interno (ISTD) e um reagente de hemólise (HR) seguido por um período de incubação pré-definido (Inc), em que a diferença entre os dois fluxos de trabalho é a ordem em que o padrão interno (ISTD) e um reagente de hemólise (HR) são adicionados. Nas modalidades, a água é adicionada como reagentes de hemólise, em particular em uma quantidade de 0,5:1 a 20:1 mL de água/mL de amostra, em particular em uma quantidade de 1:1 a 10:1 mL de água/mL de amostra, em particular em uma quantidade de 2:1 a 5:1 mL água/mL amostra.

[000276] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a amostra é uma amostra de urina, ela é atribuída a um dos outros dois fluxos de trabalho de PT de amostra pré-definidos, ambos compreendendo a adição de um padrão interno e um reagente enzimático

seguido por um período de incubação pré-definido, em que a diferença entre os dois fluxos de trabalho é a ordem em que o padrão interno e um reagente enzimático são adicionados. Um reagente enzimático é normalmente um reagente usado para clivagem de glucuronídeo ou clivagem de proteína ou qualquer pré-processamento de analito ou matriz. Em uma etapa adicional, um reagente de derivatização, tais como compostos da presente invenção, conforme divulgados aqui acima ou abaixo, é adicionado, seguido por um período de incubação.

[000277] Nas modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o reagente enzimático é selecionado a partir do grupo que consiste em glucuronidase, enzimas de exo ou endo desglicosilação (parcial) ou exo ou endo preoteases. Nas modalidades, a glucoronidase é adicionada em uma quantidade de 0,5 - 10 mg/ml, em particular em uma quantidade de 1 a 8 mg/ml, em particular em uma quantidade de 2 a 5 mg/ml.

[000278] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a amostra é plasma ou soro, ela é atribuída a outro fluxo de trabalho PT pré-definido, incluindo apenas a adição de um padrão interno (ISTD) seguido por um tempo de incubação pré-definido.

[000279] É bem conhecido para o técnico no assunto qual tempo e temperatura de incubação escolher para uma amostra de tratamento, reação química ou etapa do método considerado e como aqui denominado acima ou abaixo. Em particular, o técnico no assunto sabe que o tempo de incubação e a temperatura dependem um do outro, em que, por exemplo, uma temperatura elevada normalmente leva a um período de incubação mais curto, e vice-versa. Em modalidades do sexto aspecto da invenção, a temperatura de incubação está em uma faixa de 4 a 45 °C, em particular em uma faixa de 10-40 °C, em particular a 20-37 °C. Nas modalidades, o tempo de incubação está na faixa de 30 segundos a 120 minutos, em particular 30 segundos a 1 minuto,

30 segundos a 5 minutos, 30 segundos a 10 minutos, 1 minuto a 10 minutos, ou 1 minuto a 20 minutos, 10 minutos a 30 minutos, 30 minutos a 60 minutos ou 60 minutos a 120 minutos. Em modalidades particulares, o tempo de incubação é um múltiplo de 36 s.

[000280] Por conseguinte, as modalidades do presente método, etapa a) ocorre após qualquer um dos processos de pré-tratamento da amostra divulgados acima.

[000281] Na modalidade do sexto aspecto da presente invenção, em que a reação do composto de fórmula (A) e a molécula de analito na etapa a) ocorre antes de qualquer processo de enriquecimento, o composto de fórmula (A) é adicionado à amostra de interesse pré-tratada. Consequentemente, o aduto da molécula de analito e do composto de fórmula (I) é formado após o pré-tratamento e antes do primeiro processo de enriquecimento. O aduto é, portanto, submetido ao primeiro processo de enriquecimento e ao segundo processo de enriquecimento antes de ser submetido à análise de espectrometria de massa da etapa b).

[000282] A amostra pré-tratada pode ser ainda submetida a um fluxo de trabalho de enriquecimento de analito. O fluxo de trabalho de enriquecimento de analito pode incluir um ou mais métodos de enriquecimento. Os métodos de enriquecimento são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a métodos de enriquecimento químico, incluindo, mas não se limitando a precipitação química e métodos de enriquecimento usando fases sólidas, incluindo, mas não se limitando a métodos de extração de fase sólida, fluxos de trabalho de esfera e métodos cromatográficos (por exemplo, cromatografia gasosa ou líquida).

[000283] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, um primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento compreende a adição de uma fase sólida, em particular de esferas sólidas, carregando grupos

seletivos de analito para a amostra pré-tratada. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, um primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento compreende a adição de esferas magnéticas ou paramagnéticas carregando grupos seletivos de analito para a amostra pré-tratada. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a adição das esferas magnéticas compreende agitação ou mistura. Segue-se um período de incubação pré-definido para capturar o(s) analito(s) de interesse na esfera. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o fluxo de trabalho compreende uma etapa de lavagem (W1) após a incubação com as esferas magnéticas. Dependendo do(s) analito(s), uma ou mais etapas de lavagem adicionais (W2) são realizadas. Uma etapa de lavagem (W1, W2) compreende uma série de etapas incluindo separação de esfera magnética por uma unidade de manuseio de esfera magnética que compreende ímãs ou eletroímãs, aspiração de líquido, adição de um tampão de lavagem, ressuspensão das esferas magnéticas, outra etapa de separação de esfera magnética e outra aspiração do líquido. Além disso, as etapas de lavagem podem diferir em termos do tipo de solvente (água/orgânico/sal/pH), além do volume e número ou combinação de ciclos de lavagem. É bem conhecido pelo técnico no assunto como escolher os respectivos parâmetros. A última etapa de lavagem (W1, W2) é seguida pela adição de um reagente de eluição seguido pela ressuspensão das esferas magnéticas e um período de incubação pré-definido para liberar o(s) analito(s) de interesse das esferas magnéticas. As esferas magnéticas livres de ligação são então separadas e o sobrenadante contendo analito(s) derivatizado(s) de interesse é capturado.

[000284] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, um primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento compreende a adição de esferas magnéticas carregando grupos seletivos de matriz à amostra pré-tratada. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a adição

das esferas magnéticas compreende agitação ou mistura. Segue-se um período de incubação pré-definido para capturar a matriz na esfera. Aqui, o analito de interesse não se liga às esferas magnéticas, mas permanece no sobrenadante. Em seguida, as contas magnéticas são separadas e o sobrenadante contendo o(s) analito(s) enriquecido(s) de interesse é coletado.

[000285] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o sobrenadante é submetido a um segundo fluxo de trabalho de enriquecimento. Aqui, o sobrenadante é transferido para a estação LC ou é transferido para a estação LC após uma etapa de diluição por adição de um líquido de diluição. Também podem ser usados diferentes procedimentos/reagentes de eluição, alterando, por exemplo, o tipo de solventes (água/orgânico/sal/pH) e o volume. Os vários parâmetros são bem conhecidos do técnico no assunto e facilmente escolhidos.

[000286] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a etapa a) do presente método não ocorreu diretamente após o método de pré-tratamento, a etapa a) pode ocorrer após o primeiro fluxo de trabalho de enriquecimento usando esferas magnéticas, conforme descrito acima.

[000287] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que esferas magnéticas específicas de analito são usadas, os compostos de fórmula (A), conforme divulgados aqui acima ou abaixo, são adicionados à amostra de interesse após as etapas de lavagem (W1, W2) serem concluídas antes, juntamente com ou posteriormente com o reagente de eluição, que é seguido por um período de incubação (tempo e temperatura definidos).

[000288] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, as esferas magnéticas livres de ligação são então separadas e o sobrenadante contendo o aduto da etapa a) é coletado. Em modalidades do

sexto aspecto da presente invenção, o sobrenadante contendo o aduto da etapa a) é transferido para um segundo fluxo de trabalho de enriquecimento, em particular, diretamente transferido para uma estação LC ou após uma etapa de diluição por adição de um líquido de diluição.

[000289] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que esferas magnéticas específicas de matriz são usadas, os compostos de fórmula (A), conforme divulgados aqui acima ou abaixo, são adicionados à amostra de interesse antes ou após as esferas magnéticas serem separadas. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o sobrenadante contendo o aduto da etapa a) é transferido para um segundo fluxo de trabalho de enriquecimento, em particular, diretamente para uma estação LC ou após uma etapa de diluição por adição de um líquido de diluição.

[000290] Por conseguinte, nas modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a reação do composto de fórmula (A) e a molécula de analito na etapa a) ocorre subsequentemente a um primeiro processo de enriquecimento, o composto de fórmula (A) é adicionado à amostra de interesse após a conclusão do primeiro processo de enriquecimento, em particular um primeiro processo de enriquecimento usando esferas magnéticas. Por conseguinte, a amostra é primeiro pré-tratada conforme descrito acima, é então submetida a um primeiro processo de enriquecimento, em particular usando esferas magnéticas, transportando grupos seletivos de analito como descrito acima, e antes de, simultaneamente com ou subsequentemente à eluição das esferas, é adicionado o composto de fórmula (A). Consequentemente, o aduto da molécula de analito e do composto de fórmula (A) é formado após o primeiro processo de enriquecimento e antes do segundo processo de enriquecimento. O aduto é, portanto, submetido ao segundo processo de enriquecimento antes de ser submetido à análise de

espectrometria de massa da etapa b).

[000291] Em outra modalidade do sexto aspecto da presente invenção, a etapa (a) do presente método ocorre após um segundo fluxo de trabalho de enriquecimento de analito. No segundo fluxo de trabalho de enriquecimento, a separação cromatográfica é usada para enriquecer ainda mais o analito de interesse na amostra. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a separação cromatográfica é cromatografia gasosa ou líquida. Estas técnicas são geralmente conhecidas do técnico no assunto. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a cromatografia líquida é selecionada a partir do grupo que consiste em HPLC, LC rápido, micro-LC, injeção de fluxo, e captura e eluição.

[000292] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, a etapa a) do presente método ocorre simultaneamente ou após a separação cromatográfica. Na modalidade do sexto aspecto da presente invenção, o composto de fórmula (A) é adicionado à coluna junto com o tampão de eluição. Em modalidades alternativas, o composto de fórmula (A) é adicionado após a coluna.

[000293] Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o primeiro processo de enriquecimento inclui o uso de esferas magnéticas seletivas de analito. Em modalidades do sexto aspecto da presente invenção, o segundo processo de enriquecimento inclui o uso de separação cromatográfica, em particular usando cromatografia líquida.

[000294] Em modalidades, a etapa de análise de espectrometria de massa (b) compreende:

(i) submeter um íon do aduto a um primeiro estágio de análise de espectrometria de massa, em que o íon pai do aduto é caracterizado de acordo com sua razão massa/carga (m/z),

(ii) causar a fragmentação do íon pai aduto, através da qual

uma primeira entidade neutra, é liberada e um íon filho do aduto é gerado, em que o íon filho do aduto difere em sua razão m/z a partir do íon pai aduto, e

(iii) submeter o íon filho do aduto a um segundo estágio de análise de espectrometria de massa, em que o íon filho do aduto é caracterizado de acordo com sua razão m/z, e/ou

em que (ii) pode ainda compreender a fragmentação alternativa do aduto, através da qual uma segunda entidade neutra diferente da primeira entidade neutra é liberada e um segundo íon filho do aduto é gerado, e

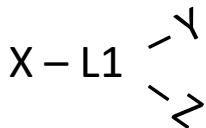
em que (iii) pode compreender ainda submeter o primeiro e o segundo íons filhos do aduto a um segundo estágio de análise espectrométrica de massa, em que o primeiro e o segundo íons filhos do aduto são caracterizados de acordo com suas razões m/z.

[000295] Por conseguinte, nas modalidades do sexto aspecto da presente invenção, em que a reação do composto de fórmula (A) e a molécula de analito na etapa a) ocorre subsequentemente a um segundo processo de enriquecimento, o composto de fórmula (A) é adicionado à amostra de interesse após a conclusão do segundo processo de enriquecimento por cromatografia, em particular cromatografia líquida. Por conseguinte, neste caso, a amostra é primeiro pré-tratada conforme descrito neste documento acima, é então submetida a um primeiro processo de enriquecimento, em particular usando esfera magnética, como descrito acima, seguido por separação cromatográfica, em particular usando cromatografia líquida e, após a separação cromatográfica, o composto de fórmula (A) é adicionado. Consequentemente, o aduto da molécula de analito e do composto de fórmula (A) é formado após o segundo processo de enriquecimento. O aduto, portanto, não é submetido a um processo de enriquecimento antes de ser submetido à análise de espectrometria de massa da etapa b).

[000296] Em outras modalidades, a presente invenção refere-

se aos seguintes aspectos:

- 1) Composto, caracterizado por ser de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa, que é particularmente capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração permanentemente carregada, em particular compreendendo uma fração permanentemente carregada, e

incluindo qualquer sal do mesmo;

2) Composto do aspecto 1, em que a unidade reativa X é selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carbonila, unidade reativa de dieno, unidade reativa de hidroxila, unidade reativa de amino, uma unidade reativa de imina, uma unidade reativa de tiol, uma unidade reativa de diol, uma unidade reativa de fenol, unidade reativa de epóxido, uma unidade reativa de dissulfeto e uma unidade reativa de azida;

3) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que a unidade reativa X é um grupo reativo a carbonila, em particular em que X é selecionado a partir do grupo que consiste em:

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade  $H_2N-NH-$ , ou  $H_2N-NR1-$ , em que R1 é arila ou alquila C1-4, particularmente alquila C1 ou C2, opcionalmente substituída,

(ii) uma unidade hidrazida, em particular uma carbo-hidrazida ou sulfo-hidrazida, em particular uma unidade  $H_2N-NH-C(O)-$  ou  $H_2N-NR2-$

C(O)-, em que R2 é arila ou alquila C1-4, particularmente alquila C1 ou C2, opcionalmente substituída,

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo, uma unidade H2N-O-, e

(iv) uma unidade ditiol, particularmente uma unidade 1,2-ditiol ou 1,3-ditiol;

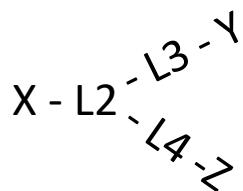
4) Composto do aspecto 1 ou 2, em que a unidade reativa X é um grupo reativo a tiol ou é um grupo reativo a amino, tal como um grupo éster ativo, por exemplo, éster de N-hidroxissuccinimida (NHS) ou sulfo éster de NHS, um éster de hidroxibenzotriazol (HOBr) ou grupo éster de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt);

5) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que a unidade de perda neutra Y libera uma entidade neutra após ionização;

6) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que a unidade carregada Z é permanentemente carregada;

7) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que a ramificação, em particular o ligante trifuncional L1, compreende 1 a 30 átomos de C, opcionalmente compreendendo 1 ou mais heteroátomos;

8) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que o composto tem uma fórmula de acordo com a fórmula B:



fórmula B

em que:

X, Y e Z são conforme definidos em qualquer um dos aspectos anteriores,

L2, L3 e L4 são ramificações lineares, cada uma individualmente

compreendendo C1-C10, opcionalmente cada uma individualmente compreendendo um ou mais heteroátomos,

em que as ramificações lineares L2, L3 e L4, juntas, formam a ramificação, em particular o ligante trifuncional L1, conforme definido em qualquer um dos aspectos anteriores;

9) Composto de qualquer um dos aspectos anteriores, em que a unidade reativa X é um grupo reativo a carbonila, a unidade de perda neutra Y é uma fração heterocíclica de 5 membros, a unidade carregada Z compreende uma fração permanentemente carregada positivamente;

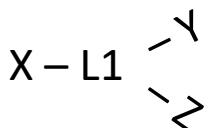
10) Composto de qualquer dos aspectos anteriores, em que a unidade reativa X é H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y é triazol ou tetrazol, e a unidade carregada Z compreende um grupo de amônio terciário;

11) Composição que compreende o composto de qualquer um dos aspectos 1-10;

12) Kit compreendendo o composto de qualquer um dos aspectos 1-10 ou a composição do aspecto 11;

13) Aduto covalente, compreendendo uma molécula de analito e o composto de qualquer um dos aspectos 1-10 covalentemente ligados um ao outro, em particular em que o aduto covalente é formado por reação química da molécula de analito e do composto de qualquer um dos aspectos 1-10;

14) Uso de um composto de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa, que particularmente capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,  
Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma  
fração permanentemente carregada, em particular compreendendo uma  
fração permanentemente carregada,

incluindo qualquer sal do mesmo,

ou de uma composição ou kit compreendendo pelo menos um  
composto de fórmula A,

caracterizado por ser para a determinação de espectrometria  
de massa de uma molécula de analito, em que a determinação de  
espectrometria de massa compreende particularmente uma determinação de  
espectrometria de massa em tandem, mais particularmente em um  
dispositivo triplo quadrupolo;

15) Método para a determinação de espectrometria de  
massa de uma molécula de analito, caracterizado por compreender as  
etapas:

(a) reagir a molécula de analito com um composto de  
fórmula A, conforme definido em qualquer um dos aspectos 1-10, em que  
um aduto covalente da molécula de analito e do composto de fórmula A é  
formado, e

(b) submeter o aduto da etapa (a) a uma análise de  
espectrometria de massa,

de preferência em que a etapa de análise de espectrometria de  
massa (b) compreende:

(i) submeter um íon do aduto a um primeiro estágio de  
análise de espectrometria de massa, em que o íon do aduto é caracterizado  
de acordo com sua razão massa/carga (m/z),

(ii) causar a fragmentação do íon aduto, através da qual

uma primeira entidade neutra, particularmente uma entidade neutra de baixo peso molecular, é liberada e um íon filho do aduto é gerado, em que o íon filho do aduto difere em sua razão m/z a partir do íon aduto, e

(iii) submeter o íon filho do aduto a um segundo estágio de análise de espectrometria de massa, em que o íon filho do aduto é caracterizado de acordo com sua razão m/z, e/ou

em que (ii) pode ainda compreender a fragmentação alternativa do aduto, através da qual uma segunda entidade neutra diferente da primeira entidade neutra é liberada e um segundo íon filho do aduto é gerado, e

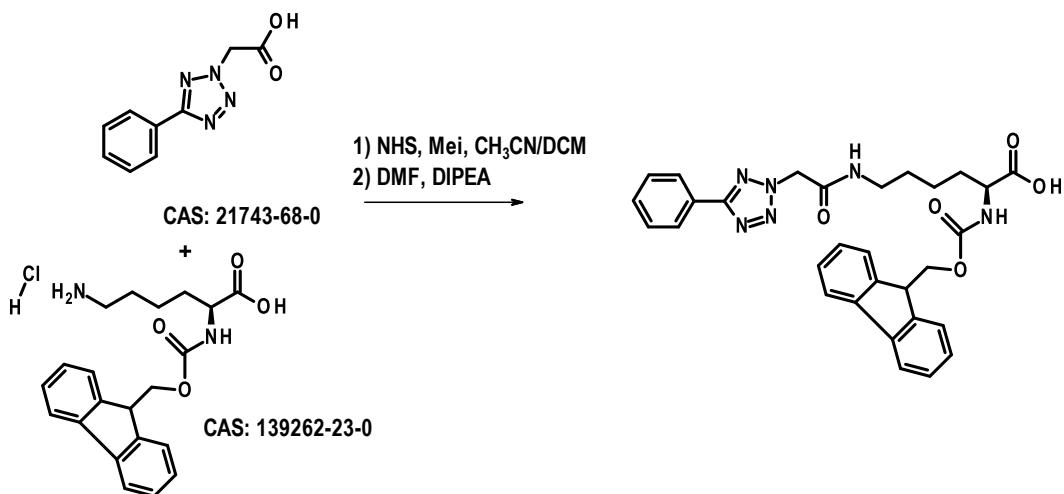
em que (iii) pode compreender ainda submeter o primeiro e o segundo íons filhos do aduto a um segundo estágio de análise espectrométrica de massa, em que o primeiro e o segundo íons filhos do aduto são caracterizados de acordo com suas razões m/z.

### EXEMPLOS

[000297] Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar, mas não para limitar a invenção presentemente reivindicada.

#### EXEMPLO 1: SÍNTSE DA MARCA 1

[000298] 1. Etapa: Síntese de ácido rac-(2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-6-[[2-(5-feniltetrazol-2-il)acetil]amino]hexanoíco:



[000299] Em um flash de 50 mL, ácido (5-fenil-tetrazol-2-il)-acético (200 mg, 0,98 mmol) foi dissolvido em CH<sub>3</sub>CN/DCM (20/10 mL) e o NHS (136 mg, 1,18 mmol), isocianeto de 2-morfolinoetil (150 mg, 1,08 mmol) foram adicionados. A reação foi deixada reagir à temperatura ambiente durante a noite. Depois disso, o solvente foi removido a vácuo e óleo incolor em bruto foi dissolvido em DMF seco (5 mL), DIPEA (253 mg, 1,96 mmol) e o cloridrato de Fmoc-Lys-OH (435 mg, 1,08 mmol) foram adicionados. A reação foi deixada reagir à temperatura ambiente por 6h. Assim, o solvente foi removido e o produto foi purificado por HPLC prep para dar 414 mg, rendimento de 76%, do produto desejado como um sólido branco.

[000300] Coluna C-18 do método de HPLC:

0 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 50% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 30% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

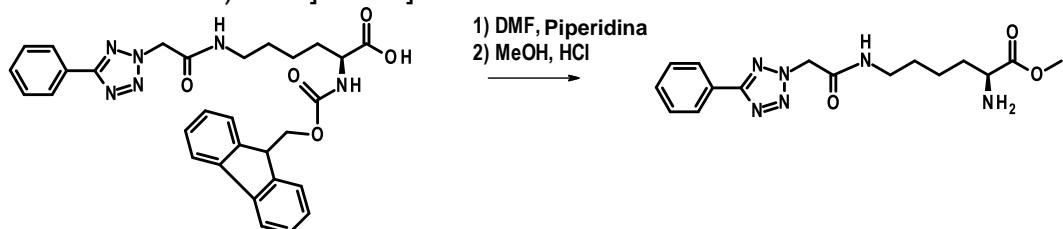
60-90 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,30 - 1,53 (m, 4 H) 1,54 - 1,80 (m, 2 H) 3,10 (m, 2 H) 3,87 - 4,06 (m, 1 H) 4,17 - 4,33 (m, 3 H) 5,47 (s, 3 H) 7,28 - 7,35 (m, 2 H) 7,35 - 7,42 (m, 2 H) 7,49 - 7,58 (m, 3 H) 7,61 (m, 1 H, NH) 7,70 (d, *J* = 7,53 Hz, 2 H) 7,86 (d, *J* = 7,53 Hz, 2 H) 8,02 - 8,08 (m, 2 H) 8,46 (m, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23,50 (1 C) 28,83 (1 C) 30,83 (1 C) 39,18 (1 C) 47,10 (1 C) 54,18 (1 C) 55,22 (1 C) 66,03 (1 C) 120,54 (2 C) 125,72 (2 C) 126,77 (2 C) 127,29 (2 C) 127,50 (2 C) 128,07 (2 C) 129,71 (2 C) 131,01 (1 C) 141,16 (1 C) 144,24 (2 C) 144,28 (2 C) 156,62 (1 C) 164,37 (1 C) 164,55 (1 C) 174,40 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculado 555,2356 encontrado 555,29.

[000301] 2. Etapa: Síntese de metil rac-(2S)-2-amino-6-[[2-(5-feniltetrazol-2-il)acetil]amino]hexanoato:



[000302] Em flash de 50 mL, ácido carboxílico (200 mg, 0,36 mmol) foi dissolvido em 4 mL de DMF (solução limpa) e 1 mL de piperidina foi adicionado (imediatamente um precipitado branco começou a se formar). Após 30 min de agitação à temperatura ambiente, a reação estava encerrada. Depois disso, o solvente foi evaporado a vácuo e o produto foi purificado por precipitação com AcOEt (20 mL). O sólido foi recuperado por filtração e lavado com AcOEt frio (2\*10 mL). O sólido branco P1 (higroscópico) foi seco sob vácuo para dar 94 mg de produto.

[000303] O produto foi dissolvido em MeOH (20 mL) e a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mL, 1 N) foi adicionado à temperatura ambiente e a solução foi deixada reagir por 4 dias à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado e o óleo foi purificado por HPLC-prep. para dar 62 mg, rendimento de 48% do produto desejado como um sólido branco, sal de TFA.

[000304] Coluna C-18 do Método de HPLC:

0 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 50% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 50% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

60-70 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,18 - 1,33 (m, 2 H) 1,34 - 1,52 (m, 2 H) 1,56 - 1,90 (m, 2 H) 2,95 - 3,14 (m, 2 H) 3,64 (s, 3 H) 3,83 (dd, *J* =

8,85, 5,08 Hz, 1 H) 5,46 (s, 2 H) 7,46 - 7,62 (m, 3 H) 7,84 - 8,10 (m, 2 H) 8,44 (m, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 22,26 (1 C) 28,72 (1 C) 30,40 (1 C) 38,97 (1 C) 52,69 (1 C) 55,20 (1 C) 57,34 (1 C) 126,77 (2 C) 127,29 (1 C) 129,73 (2 C) 131,02 (1 C) 164,41 (1 C) 164,54 (1 C) 171,50 (1C); e

HPLC-MS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculado 347,18317 encontrado 347,33.

[000305] 3. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-metoxicarbonil-5-[[2-(5-feniltetrazol-2-il)acetil]amino]pentil]amino]etil]amônio:



[000306] Para uma solução de R1 (62 mg, 0,14 mmol) em DMF seco (10 mL) e Ar, betaína (47 mg, 0,41 mmol), EDC.HCl (78, 0,41 mmol), DIPEA (174 mg, 1,35 mmol) e NHS (47 mg, 0,41 mmol) foram adicionados. A solução/suspensão (R2 não é completamente solúvel) foi deixada reagir à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado e óleo bruto incolor foi purificado por HPLC prep para dar 24 mg, 30% de rendimento, do produto desejado como óleo incolor, sal de TFA.

[000307] Coluna C-18 do Método de HPLC:

0 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 70% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 30% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

60-90 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

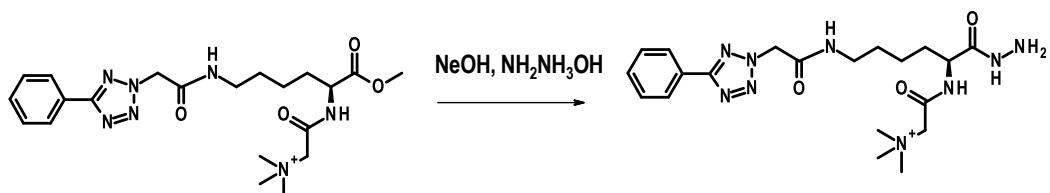
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,26 - 1,37 (m, 2 H) 1,37 -

1,55 (m, 2 H) 1,57-1,79 (m, 2H) 3,08 - 3,11 (m, 2 H) 3,18 (s, 9 H) 3,62 (s, 3 H) 4,13 (s, 2H) 4,18 - 4,46 (m, 1 H) 5,47 (s, 2 H) 7,46 - 7,62 (m, 3 H) 7,99 - 8,24 (m, 2 H) 8,53 (m, 1 H, NH) 8,76 - 9,02 (m, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 22,96 (1 C) 28,96 (1 C) 30,65 (1 C) 39,07 (1 C) 52,55 (1 C) 53,07 (1 C) 53,81 (3 C) 55,50 (1 C) 64,34 (1 C) 126,80 (2 C) 127,4 (1C) 130,11 (2 C) 131,02 (1 C) 132,27 (1 C) 164,06 (1 C) 164,54 (1 C) 172,52 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 431,24068 encontrado 431,34.

[000308] 4. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-(hidrazinocarbonil)-5-[[2-(5-feniltetrazol-2-il)acetil]amino]pentil]amino]etil]amônio:



[000309] Em um flash de 25 mL, o éster (17 mg, 0,030 mmol) foi dissolvido em MeOH (5 mL) e a hidrazina (15 mg, 0,30 mmol) foi adicionada. A reação foi deixada reagir a 50 °C por 2h. Depois disso, o solvente foi removido por vácuo (bomba de alto vácuo para remover o excesso de hidrazina) e o óleo incolor em bruto foi purificado por HPLC prep para dar 20 mg, rendimento de 65%, do produto desejado como um sólido branco, sal de TFA.

[000310] Coluna C-18 do método de HPLC:

0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 70% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 30% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

60-90 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

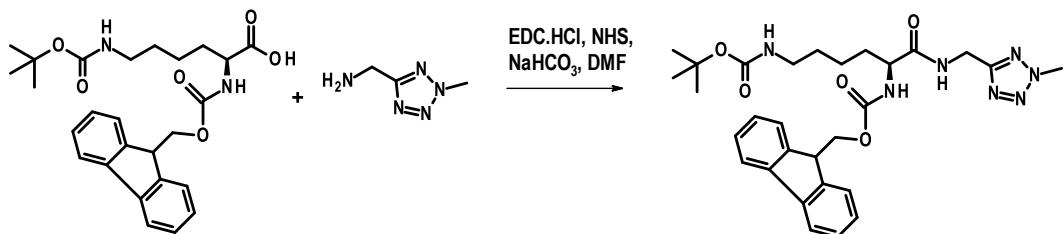
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,20 - 1,38 (m, 2 H) 1,40 - 1,53 (m, 2 H) 1,54-1,76 (m, 2H) 3,03 - 3,14 (m, 2 H) 3,21 (s, 9 H) 4,06-4,17 (m, 2H) 4,24 - 4,34 (m, 1 H) 5,49 (s, 2 H) 7,50 - 7,74 (m, 3 H) 8,02 - 8,13 (m, 2 H) 8,43-8,53 (m, 1 H, NH) 8,79- 8,90 (m, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23,06 (1 C) 28,95 (1 C) 31,85 (1 C) 39,23 (1 C) 51,65 (1 C) 53,86 (1 C) 55,30 (1 C) 64,31 (1 C) 126,86 (2 C) 127,4 (1C) 129,86 (2 C) 131,19 (1 C) 132,85 (1 C) 163,3 (1 C), 164,8 (1 C) 169,48 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 446,2628 encontrado 446,39.

### EXEMPLO 2: SÍNTESE DA MARCA 2

[000311] 1. Etapa: Síntese de 9H-fluoren-9-ilmetil N-[rac-(1S)-5-(terc-butoxicarbonilamino)-1-[(2-metiltetrazol-5-il)metilcarbamoil]pentil]carbamato:



[000312] Uma mistura de Fmoc-Lys(Boc)-OH (505 mg, 1,079 mmol), *N*-hidroxissuccinimida (163 mg, 1,417 mmol), EDC·HCl (268 mg, 1,400 mmol) e bicarbonato de sódio (296 mg, 3,521 mmol) foi dissolvido em 10 mL de DMF e agitado à temperatura ambiente. Após 2 h, tetrazol (184 mg, 1,221 mmol) foi adicionado e a agitação foi continuada por um período adicional de 2 h à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi extraído três vezes com EtOAc. A fase orgânica combinada foi seca sobre sulfato de sódio e subsequente cromatografia em coluna flash em sílica gel (*n*-hexano:EtOAc; 1:2 a 1:3) para dar o produto desejado 454 mg, 75% de rendimento, como um sólido esbranquiçado.

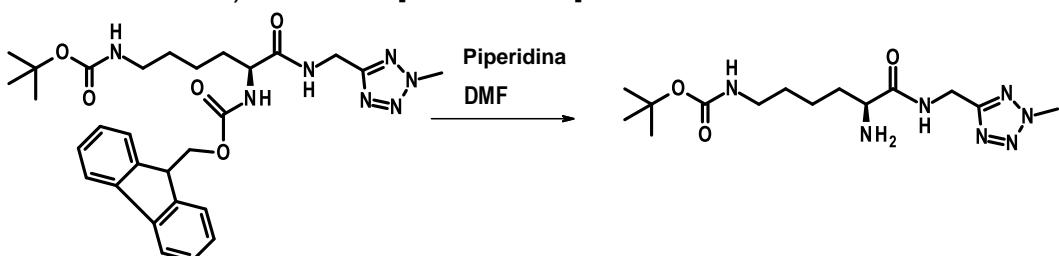
[000313] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CLOROFÓRMIO-*d*) δ ppm 1,18 -

1,58 (m, 13 H) 1,59 - 1,96 (m, 2 H) 3,00 - 3,20 (m, 2 H) 4,15 - 4,30 (m, 5 H) 4,32 - 4,53 (m, 2 H) 4,53 - 4,81 (m, 2 H) 5,43 - 5,63 (m, 1 H, NH) 6,79 - 7,04 (m, 1 H, NH) 7,25 - 7,32 (m, 2 H) 7,38 (m, 2 H) 7,49 - 7,65 (m, 2 H) 7,74 (m, 2 H).

[000314]  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CLOROFÓRMIO-*d*)  $\delta$  ppm 22,41 (1 C) 28,40 (3 C) 29,56 (1 C) 31,86 (1 C) 32,12 (1 C) 34,90 (1 C) 39,40 (1 C) 39,80 (1 C) 47,13 (1 C) 54,75 (1 C) 67,07 (1 C) 77,20 (1 C) 119,96 (2 C) 125,04 (2 C) 127,07 (2 C) 127,72 (2 C) 141,27 (1 C) 143,69 (1 C) 143,75 (1 C) 156,22 (1 C) 163,40 (1 C) 171,90 (1 C).

[000315] HPLC-MS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculado 564,29344 encontrado 564,42.

[000316] 2. Etapa: Síntese de terc-butil N-[rac-(5S)-5-amino-6-[(2-metiltetrazol-5-il)metilamino]-6-oxo-hexil]carbamato:



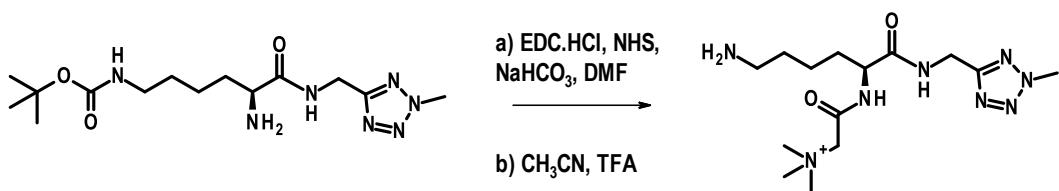
[000317] A uma solução de Fmoc-lisina-tetrazol (37 mg, 0,066 mmol) em 2 mL de DMF foi adicionada piperidina (47 mg, 0,552 mmol). Após a mistura reacional ter sido agitada durante 1,5 h à temperatura ambiente, o solvente remanescente foi removido sob pressão reduzida. A purificação com cromatografia flash em sílica gel (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 8:1) para dar 22 mg, rendimento de 98%, do produto desejado, como um óleo incolor.

[000318]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CLOROFÓRMIO-*d*)  $\delta$  ppm 1,36 - 1,62 (m, 14 H) 1,75 - 2,03 (m, 1 H) 3,00 - 3,20 (m, 2 H) 3,44 (m, 1 H) 4,32 (s, 3 H) 4,44 - 4,64 (m, 1 H, NH) 4,71 (m, 2 H) 7,86 - 8,13 (m, 1 H, NH).

[000319]  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CLOROFÓRMIO-*d*)  $\delta$  ppm 22,78 (1 C) 28,40 (3 C) 29,86 (1 C) 34,39 (1 C) 34,52 (1 C) 39,45 (1 C) 40,14 (1 C) 54,91 (1 C) 77,19 (1 C) 156,05 (1 C) 163,84 (1 C) 175,03 (1 C).

[000320] HPLC-MS (m/z) [M+H]+ calculado 342,22536  
encontrado 342,48.

[000321] 3. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-5-amino-1-[(2-metiltetrazol-5-il)metilcarbamoi]pentil]amino]etil]amônio:



[000322] Uma mistura de lisina-tetrazol (78 mg, 0,229 mmol), N-hidroxissuccinimida (45 mg, 0,392 mmol), EDC·HCl (84 mg, 0,441 mmol), bicarbonato de sódio (117 mg, 1,392 mmol) e betáina (46 mg, 0,391 mmol) foi dissolvida em 2 mL de DMF e agitada à temperatura ambiente durante 42 h. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por HPLC preparativa para dar 36 mg, rendimento de 28%, do produto desejado como um óleo incolor, sal de TFA.

[000323] Coluna C-18 do método de HPLC:

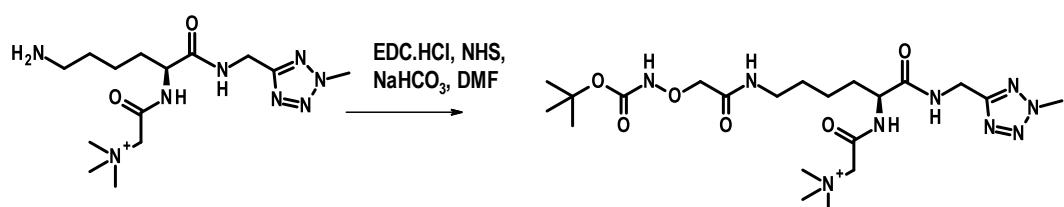
0 min: 100% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 0% CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
0-1 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
1-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
10-60 min: 50% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 50% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
60-70 min: 0% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 100% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,21 - 1,38 (m, 2 H) 1,24 - 1,38 (m, 3 H) 1,42 - 1,60 (m, 1 H) 1,60 - 1,79 (m, 1 H) 2,64 - 2,78 (m, 2 H) 3,18 (s, 9 H) 3,99 - 4,18 (m, 2 H) 4,23 - 4,36 (m, 4 H) 4,41 - 4,57 (m, 2 H) 7,69 - 7,85 (m, 1 H, NH) 8,69 - 8,90 (m, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 22,56 (1 C) 27,01 (1 C) 31,72 (1 C) 34,23 (1 C) 39,06 (1 C) 39,83 (1 C) 52,80 (1 C) 53,79 (3 C) 64,47 (1 C) 163,60 (1 C) 164,16 (1 C) 171,27 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 341,24080 encontrado 341,47.

[000324] 4. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-5-[[2-(terc-butoxicarbonilamino)oxiacetil]amino]-1-[(2-metiltetrazol-5-il)metilcarbamoil]pentil]amino]etil]amônio:



[000325] Uma mistura de lisina-betaína-tetrazol (13,2 mg, 0,029 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (5 mg, 0,045 mmol), EDC·HCl (9,7 mg, 0,051 mmol), bicarbonato de sódio (8,8 mg, 0,105 mmol) e ácido carboxílico (6,1 mg, 0,032 mmol) foi dissolvido em 0,5 mL de DMF e agitado à temperatura ambiente durante 4 h. A remoção do solvente foi seguida por purificação subsequente via HPLC preparativa para dar 9,4 mg, 52% de rendimento, do produto desejado como um óleo incolor, sal de TFA.

[000326] Coluna C-18 do método de HPLC:

0 min: 100% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 0% CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

0-1 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

1-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 50% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 50% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

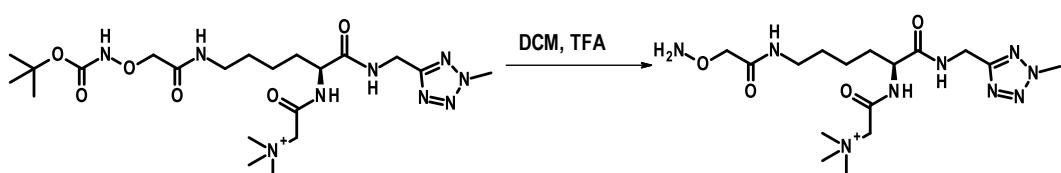
60-70 min: 0% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 100% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,17 - 1,32 (m, 3 H) 1,33 - 1,46 (m, 10 H) 1,47 - 1,59 (m, 1 H) 1,59-1,71 (m, 1H) 3,01 -3,11 (m, 2 H) 3,12-

3,23 (m, 9 H) 4,05-4,18 (m, 2 H) 4,23 (s, 1H) 4,33 (s, 3 H) 4,33-4,48 (m, 2 H) 7,93 - 8,06 (m, 1 H, NH) 8,61 - 8,83 (m, 1 H, NH) 10,08 (s, 1 H, NH) 10,29 (br s, 1 H, NH); e

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 514,30961 encontrado 514,57.

[000327] 5. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-5-[(2-aminooxiacetil)amino]-1-[(2-metiltetrazol-5-il)metilcarbamoil]pentil]amino]etil]amônio:



[000328] A uma solução de boc-lisina-betaína-tetrazol (9,4 mg, 0,015 mmol) em 0,7 mL de DCM foi adicionada uma gota de ácido trifluoroacético. Após agitação da solução à temperatura ambiente por 24 h, o solvente foi removido sob pressão reduzida para dar 7,6 mg, 80% de rendimento, do produto desejado como um óleo incolor, sal de TFA.

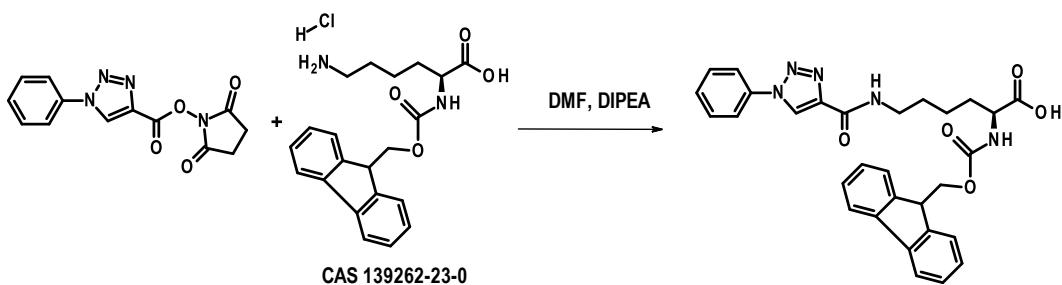
[000329]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, ÓXIDO DE DEUTERIO)  $\delta$  ppm 1,20 - 1,32 (m, 2 H) 1,35 - 1,48 (m, 2 H) 1,57 - 1,75 (m, 2 H) 3,13 (m, 2 H) 3,19 (s, 9 H) 4,04 (s, 2 H) 4,22 - 4,26 (m, 4 H) 4,49 - 4,61 (m, 4 H).

[000330]  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, ÓXIDO DE DEUTERIO)  $\delta$  ppm 22,32 (1 C) 27,82 (1 C) 30,47 (1 C) 34,37 (1 C) 38,88 (1 C) 39,61 (1 C) 54,15 (1 C) 54,34 (3 C) 64,73 (1 C) 71,83 (1 C) 163,20 (1 C) 164,26 (1 C) 168,56 (1 C) 173,82 (1 C).

[000331] HPLC-MS (m/z) [M-NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup> calculado 399,24628 encontrado 399,54.

### EXEMPLO 3: SÍNTSE DA MARCA 3

[000332] 1. Etapa: Síntese de ácido (2S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-6-[(1-feniltriazol-4-carbonil)amino]hexanóico:



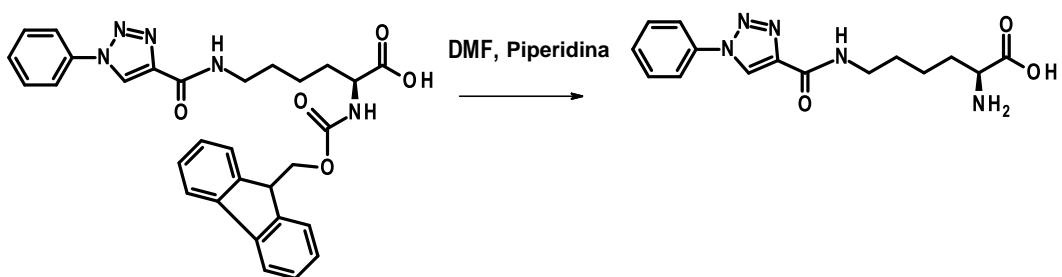
[000333] O éster de N-hidroxisuccinimida bruto (815 mg, foi considerado como 2,18 mmol) e 882 mg de FmocLysOH\*HCl (882 mg, 2,18 mmol) foram dissolvidos em 8 mL de DMF. N-metil morfolina (480  $\mu$ L, 441 mg, 4,36 mmol) foi adicionado e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 18 h. A mistura de reação foi então concentrada em vácuo até 1 mL e 1 mL de AcOH seguido de 100 mL de NH4Cl saturado foram adicionados. A fase aquosa obtida foi extraída três vezes com 15 mL de EtOAc. As fases orgânicas recolhidas foram secas sobre Na2SO4 e concentradas para dar 1,5 g de produto bruto. Cromatografia em gel de sílica (CHCl3:MeOH = 9: 1) 1,17 g, quantitativo, do produto desejado como um sólido branco.

[000334]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1,26 - 1,40 (m, 2 H) 1,49 - 1,68 (m, 3 H) 1,69 - 1,82 (m, 1 H) 3,27 (br d,  $J$  = 6,65 Hz, 1 H) 3,82 (br d,  $J$  = 4,77 Hz, 1 H) 4,16 - 4,41 (m, 2 H) 7,20 - 7,70 (m, 9 H) 7,86 (d,  $J$  = 7,4 Hz, 2 H) 7,94 - 7,96 (m, 3H) 8,46 - 8,81 (m, 1 H) 9,25 (s, 1 H).

[000335]  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 21,54 (1 C) 29,09 (1 C) 30,75 (1 C) 35,77 (1 C) 46,73 (1 C) 54,90 (1 C) 65,30 (1 C) 120,04 (2 C) 120,37 (2 C) 124,48 (2 C) 125,22 (1 C) 127,02 (2 C) 127,54 (1 C) 129,05 (1 C) 129,87 (2 C) 136,31 (1 C) 140,69 (2 C) 143,88 (2 C) 143,94 (2 C) 155,67 (1 C) 159,25 (1 C) 162,29 (1 C).

[000336] HPLC-MS (m/z) [M+H]+ calculado 540,22469 encontrado 540,3

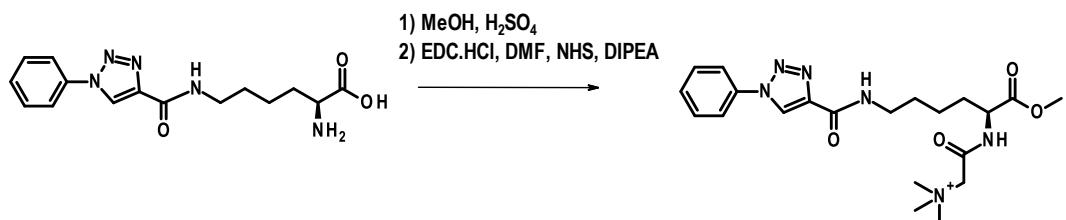
[000337] 2. Etapa: Síntese de ácido rac-(2S)-2-amino-6-[(1-feniltriazol-4-carbonil)amino]hexanoíco:



[000338] O ácido carboxílico (1,17 g, 2,18 mmol) foi dissolvido em 12 mL de DMF. 2,4 mL de piperidina foram adicionados e a mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente por 1 h. O solvente foi completamente removido em vácuo e 3 mL de EtOAc e 15 mL de n-hexano foram adicionados ao resíduo seco obtido. A suspensão foi agitada durante 15 min e depois filtrada. O filtrado foi lavado com 100 mL de n-Hexano/EtOAc (10:1). O sólido branco obtido foi removido do filtro e adicionalmente seco em vácuo para dar 556 mg, 80% de rendimento, de aminoácido bruto.

[000339] HPLC-MS (m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculado 318,15661 encontrado 318,2.

[000340] 3. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato:trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-metoxicarbonil-5-[(1-feniltriazol-4-carbonil)amino]pentil]amino]etil]amônio:



[000341] Para uma solução de amino ácido (400 mg, 0,90 mmol) em MeOH (20 mL) a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mL, 1 N) foi adicionado à temperatura ambiente e a solução foi deixada a reagir por 24 h à temperatura ambiente. A solução foi aquecida a 50 °C e deixada a reagir por 24h. O solvente foi evaporado e o óleo foi purificado por HPLC-prep. para dar 424 mg do produto desejado como um sólido branco, sal de TFA.

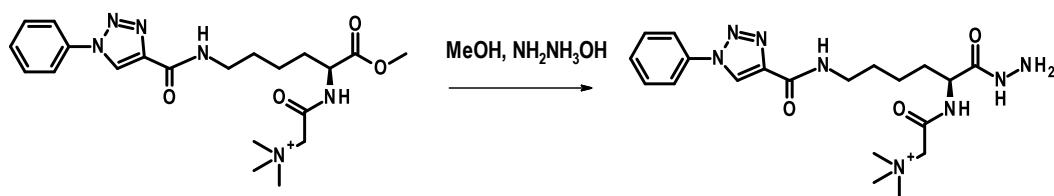
[000342] A uma solução de P1 (400 mg, 0,90 mmol) em DMF seco e Ar, betaína (316 mg, 2,70 mmol), EDC.HCl (518, 2,70 mmol), DIPEA (696 mg, 5,39 mmol) e NHS (310 mg, 2,70 mmol) foram adicionados. A solução/suspensão (a betaína não é completamente solúvel) foi deixada reagir à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi evaporado e o óleo bruto incolor foi purificado por HPLC prep. para dar 223,8 mg, 33% de rendimento, do produto desejado como óleo incolor, sal de TFA.

[000343] Coluna C-18 do método de HPLC:

0 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
 0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
 10-60 min: 70% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 30% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
 60-90 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,35 (m, 2 H) 1,45 - 1,59 (m, 2 H) 1,59 - 1,96 (m, 2 H) 3,19 (s, 9 H) 3,26 (m, 2 H) 3,63 (s, 3 H) 4,16 (s, 2 H) 4,28 (m, 1 H) 7,47 - 7,66 (m, 3 H) 8,65 (m, 1 H, NH) 9,04 (m, 1 H, NH) 9,23 (s, 1 H);  
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23,07 (1 C) 29,08 (1 C) 30,68 (1 C) 38,60 (1 C) 52,50 (1 C) 52,56 (1 C) 53,74 (3 C) 64,10 (1 C) 120,84 (2 C) 124,95 (1 C) 129,55 (1 C) 130,34 (2 C) 136,75 (1 C) 144,28 (1 C) 159,78 (1 C) 164,04 (1 C) 172,27 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M]<sup>+</sup> calculado 431,24068 encontrado 431,34.

[000344] 4. Etapa: Síntese de 2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-trifluoroacético;trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-(hidrazinocarbonil)-5-[(1-feniltriazol-4-carbonil)amino]pentil]amino]etil]amônio:



[000345] Em um flash de 25 mL, o éster (200 mg, 0,37 mmol)

foi dissolvido em MeOH (5 mL) e o monohidrato de hidrazina (184 mg, 3,68 mmol) foi adicionado. A reação foi deixada reagir a 50 °C por 2h. Depois disso, o solvente foi removido por vácuo (bomba de alto vácuo para remover o excesso de hidrazina) e o óleo incolor em bruto foi purificado por HPLC prep para dar 178,0 mg, 73% de rendimento, do produto desejado como um sólido branco, sal de TFA.

[000346] Coluna C-18 do Método de HPLC:

0 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

0-10 min: 98% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA, 2% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

10-60 min: 70% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 30% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

60-90 min: 20% de H<sub>2</sub>O 0,1% de TFA; 80% de CH<sub>3</sub>CN 0,1% de TFA;

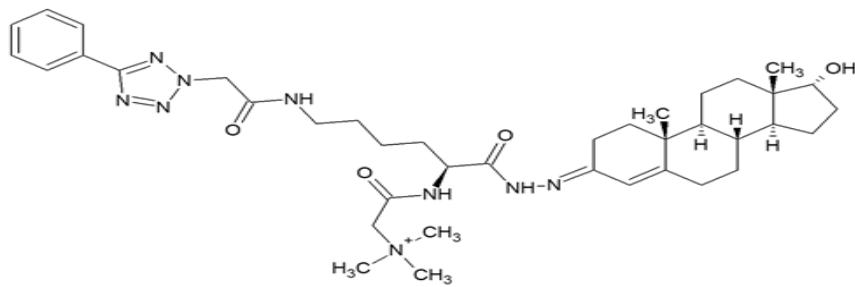
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 1,19 - 1,44 (m, 2 H) 1,47 - 1,75 (m, 4 H) 3,16 - 3,28 (m, 11 H) 4,03 - 4,22 (m, 2 H) 4,23 - 4,37 (m, 1 H) 7,47 - 7,63 (m, 3 H) 7,93 (s, 2 H) 8,65 (m, 1 H, NH) 8,98 (m, 1 H, NH) 9,23 (s, 1 H) 11,04 (s largo, 1 H, NH);

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 23,04 (1 C) 29,18 (1 C) 31,56 (1 C) 38,70 (1 C) 51,70 (1 C) 53,76 (3 C) 64,51 (1 C) 120,86 (2 C) 124,96 (1 C) 129,59 (1 C) 130,36 (2 C) 136,73 (1 C) 144,27 (1 C) 159,77 (1 C) 164,01 (1 C) 170,77 (1 C); e

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 431,2519 encontrado 431,37.

#### EXEMPLO 4: PREPARAÇÃO DO DERIVADO DE MARCA 1-TESTOSTERONA E SUA

##### ANÁLISE VIA MS



[000347] A testosterona foi dissolvida em metanol de grau MS até uma concentração final de 1 mg/mL. Marca 1 (trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-(hidrazinocarbonil)-5-[[2-(5-feniltetrazol-2-  
il)acetil]amino]pentil]amino]etil]amônio;2,2,2-trifluoroacetato;ácido 2,2,2-  
trifluoroacético) foi dissolvido em metanol de grau MS até uma concentração final de 30 mg/mL. 10 µL de testosterona foram derivatizados com 10 µL de Marca 1 em 70 µL de metanol grau MS e 10 µL de ácido acético glacial. A reação de derivatização foi incubada em um Eppendorf Thermomixer a 45 °C e 1200 rpm por 2 horas. Rendimento = 85 %, calculado por análise LC-MS com base na área de Testosterona não marcada.

[000348] 10 µL da reação de derivatização diluída (1:1000 em 80% de metanol) foi analisada por varredura completa de LC-MS no modo de íon positivo nas energias de colisão de 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50 e 60 V, respectivamente.

[000349] Para análise de LC/MS, as amostras foram analisadas em um sistema Xevo G2-XS-QTof LC-MS (Waters) conectado a um HPLC Waters Acquity H UPLC® Class. A separação cromatográfica foi realizada a 45 °C usando uma coluna C18 (Acquity UPLC HSS T3 1,8 µm, coluna 2,1 x 50 mm, Waters) com 2 mM NH4Ac, 0,1% de ácido fórmico em água (A) ou em metanol (B) como fase móvel, com fluxo de 450 µL/min. Foi usado um gradiente de etapa de 0 – 2 min 25% B, 2 – 6 min 25 – 99.9% B, 6 – 8 min 99.9% B e 8 – 10 min 25% B. As condições de fonte ESI otimizadas foram as seguintes: temperatura de dessolvatação 650 °C, temperatura da fonte 150 °C, fluxo de gás de cone 150L/Hr, fluxo de gás de dessolvatação 800L/Hr, fluxo de gás de colisão 0,18 mL/min, deslocamento de fonte 80 V e capilar 3,5 V. A faixa de massa do TOF-MS foi de 50 – 1200 Da, formato de dados centróide, tempo de varredura de 0,2 seg, sensibilidade do modo analisador, faixa dinâmica normal, baixa resolução de massa 15, alta resolução

de massa 10. Os dados foram adquiridos pelo software MassLynx (versão 4.1, SCN 949) e avaliados com TargetLynx (versão 4.1, SCN 909).

[000350] Na fase gasosa, o derivado de Marca 1-Testosterona sofre uma perda neutra de N2 ( $\Delta$  28 Da) do grupo tetrazol, a carga positiva permanece intacta no grupo trimetilamino carregado positivamente no íon produto, conforme representado na Figura 1A.

[000351] A Tabela 1 mostra os valores de m/z calculados e medidos para o íon precursor e o íon produto do derivado Marca 1-Testosterona.

**TABELA 1: M/Z DE ÍON PRECURSOR E ÍON PRODUTO DO DERIVADO DE MARCA 1-**

**TESTOSTERONA CALCULADO E MEDIDO**

	<b>calculado</b>	<b>medido</b>
<b>Íon precursor [m/z]</b>	716,46	716,43
<b>Íon produto [m/z]</b>	688,45	688,43
<b>Perda neutra [Da]</b>	28,01	28,00

[000352] O derivado de Marca 1-Testosterona foi analisado em diferentes energias de colisão por varredura completa no modo de íon positivo. As áreas de pico correspondentes do íon precursor e do íon produto são mostradas na Figura 1B.

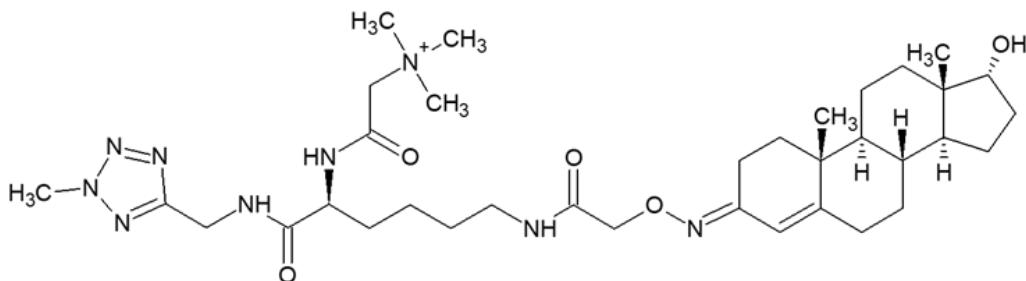
[000353] A intensidade máxima do íon produto é obtida em uma energia de colisão de 30 V. O espectro de MS correspondente é mostrado na Figura 1C, com o íon produto m/z 688,4276 o pico mais intenso.

[000354] Comparando a área máxima do pico do íon produto do derivado 1 com testosterona  $^{13}\text{C}_3$  não marcada e testosterona marcada com reagente A de Rahimoff et al. (2017) J. Am. Chem. Soc. 139(30), p. 10359–10364 nas mesmas concentrações de analito (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ), um aumento nas intensidades do íon produto de 15 vezes e 5 vezes, respectivamente, é

observado (Figura 2A). Além disso, a Marca 1 gera um íon precursor de testosterona mais intenso do que o reagente A de Rahimoff et al. (2017), reagente Amplifex Keto e reagente Girard P nas mesmas concentrações de analito (0,1 µg/mL, Figura 2B). O aumento na intensidade do íon precursor é 4 vezes em comparação com a testosterona não marcada e o reagente A de Rahimoff et al. (2017), bem como 2 vezes mais intenso do que a testosterona marcada com reagente Amplifex Keto

**EXEMPLO 5: PREPARAÇÃO DO DERIVADO DE MARCA 2-TESTOSTERONA E SUA**

**ANÁLISE VIA MS**



[000355] A testosterona foi dissolvida em metanol de grau MS até uma concentração final de 1 mg/mL. Marca 2 (trimetil-[2-oxo-2-[[rac-(1S)-1-(hidrazinocarbonil)-5-[[2-(5-metiltetrazol-2-il)acetil]amino]pentil]amino]etil]amônio;2,2,2-trifluoroacetato;ácido trifluoroacético) foi dissolvido em metanol de grau MS até uma concentração final de 100 mg/mL. 10 µL de Testosterona foram derivatizados com 10 µL de Marca 2 em 70 µL de metanol de grau MS e 10 µL de ácido acético glacial. A reação de derivatização foi incubada em um Eppendorf Thermomixer a 45 °C e 1200 rpm por 2 horas. Rendimento = 100 %, calculado por análise LC-MS com base na área de Testosterona não marcada.

[000356] 10 µL da reação de derivatização diluída (1:1000 em 80% de metanol) foi analisada por varredura completa de LC-MS no modo de íon positivo nas energias de colisão de 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50 e 60 V, respectivamente.

[000357] A análise de LC/MS foi realizada conforme descrito acima para o Exemplo 4.

[000358] Na fase gasosa, o derivado Marca 2-Testosterona sofre uma perda neutra de N<sub>2</sub> (Δ 28 Da) do grupo tetrazol, a carga positiva permanece intacta no grupo trimetilamino carregado positivamente no fragmento do produto, conforme representado na Figura 3A.

[000359] A Tabela 2 mostra os valores de m/z calculados e medidos para o íon precursor e o íon produto do derivado de Marca 2-Testosterona.

**TABELA 2: M/Z DE ÍON PRECURSOR E ÍON PRODUTO DO DERIVADO DE MARCA 2-**

**TESTOSTERONA CALCULADO E MEDIDO.**

	<b>calculado</b>	<b>medido</b>
<b>Íon precursor [m/z]</b>	684,46	684,46
<b>Íon produto [m/z]</b>	656,45	656,44
<b>Perda neutra [Da]</b>	28,01	28,02

[000360] O derivado foi analisado em diferentes energias de colisão por varredura completa no modo de íon positivo. As áreas de pico correspondentes do íon precursor e do íon produto são mostradas na Figura 3B. A intensidade máxima do íon produto é obtida a uma energia de colisão de 35 V. O espectro de MS correspondente é mostrado na Figura 3C, com o íon precursor m/z 684,4455 e o íon produto m/z 656,4455.

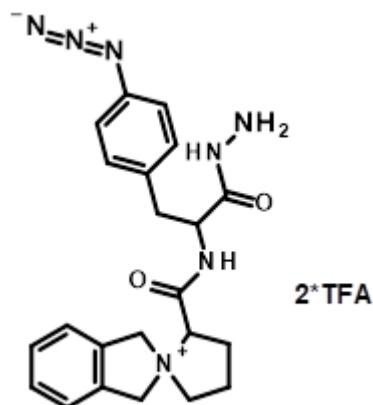
**EXEMPLO 6: SÍNTESE DA MARCA 16, 17 E 18**

**PROTOCOLO PARA SÍNTESE DE FASE SÓLIDA**

[000361] A resina (250 µmol) foi deixada inchar em DMF (10 min) e, em seguida, tratada com uma mistura de hidrato de hidrazina (10 eq) e DIPEA (20 eq) em 30 mL de DMF. Após 1 h, a solução foi removida e a resina incubada com uma solução de 10% em volume de DIPEA em metanol. Após 30

min, a resina foi lavada (3 x metanol, 3 x DCM, 3 x DMF). Em seguida, o bloco de construção de aminoácido protegido por Fmoc correspondente (3 eq, 0,2 M em DMF) foi acoplado na presença de PyBOP (6 eq) e DIPEA (9 eq). Após 90 minutos a resina foi lavada (3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF) e os grupos hidrazida remanescentes foram acetilados com DMF/Ac<sub>2</sub>O/lutidina (89/5/6, 10 min). A resina foi lavada (5 x DMF) e o grupo Fmoc N-terminal foi removido por adição de piperidina a 20% em DMF (2 x 10 min). A resina foi lavada (5 x DMF) e Fmoc-Pro-OH (3 eq, 0,2 M em DMF) foi acoplado na presença de PyBOP (6 eq) e DIPEA (9 eq). Após 90 min, a resina foi lavada (3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF) e os grupos amino remanescentes foram acetilados com DMF/Ac<sub>2</sub>O/lutidina (89/5/6, 10 min). A resina foi lavada (5 x DMF) e o grupo Fmoc N-terminal foi removido por adição de piperidina a 20% em DMF (2 x 10 min). A resina foi lavada (5 x DMF) e o N-terminal foi quaternizado por tratamento da resina com α, α'-dibromo-o-xileno (3eq, c = 0,4 M em DMF) na presença de DIPEA (5 eq) por 16 h. Em seguida, a resina foi lavada (5 x DMF, 3 x DCM) e seca in vacuo. O dipeptídeo foi clivado da resina por tratamento da resina com TFA/TIS/água (5 mL, 95/2,5/2,5) durante 2 h. A solução de TFA foi recolhida, concentrada in vacuo e foi adicionado um volume de 8 vezes de éter dietílico para conseguir a precipitação do peptídeo. O sobrenadante foi removido e o produto em bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa (coluna: Triart C18 20 x 250 mm) usando uma mistura binária de A (0,1% de TFA em água) e B (0,1% de TFA em 20% de acetonitrila aq.) a uma taxa de fluxo de 20 ml/min.

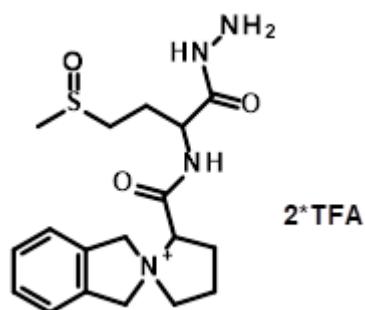
[000362] Síntese de N-[1-[(4-azidofenil)metil]-2-hidrazino-2-oxo-etyl]espiro[1,3-dihidroisoindol-2-oxo-2,1'-azolidin-1-oxo]-2'-carboxamida;2,2,2-trifluoroacetato:



10,9 mg / 20,5 µmol; e

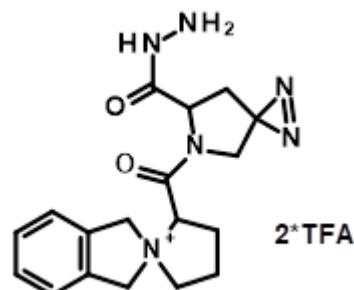
HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 420,2 encontrado 420,2.

[000363] Síntese de N-[1-(hidrazinocarbonil)-3-metilsulfinilpropil]espiro[1,3-di-hidroisoindol-2-íodo-2,1'-azolidin-1-íodo]-2'-carboxamida;2,2,2-trifluoroacetato:



18,6 mg / 37,7 µmol;

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 379,5 encontrado 379,2.



5,14 mg / 11,0 µmol

HPLC-MS (m/z) [M]+ calculado 355,5 encontrado 355,2.

**EXEMPLO 7: DERIVATIZAÇÃO DA TESTOSTERONA USANDO AS MARCAS 16, 17 E 18**

[000364] Uma solução (S1) de 500ng/ml de Testosterona foi preparada em Metanol. Uma solução (S2) em comparação com a solução (S1) contendo um excesso de qualquer um dos reagentes de derivatização Marca 16, Marca 17 ou Marca 18, diluído em metanol (razão molar >1000) foi adicionada e a solução foi acidificada com ácido glacial (20% v/v). As soluções S1 e S2 foram misturadas resultando na solução S3, e mantida por 2h a 65 °C seguido por 12h em temperatura ambiente. Após 12h, a solução S3 foi diluída com Metanol para dar cinco níveis independentes de concentração com base na massa molecular de Testosterona de Testosterona 1eq; Testosterona 1/20eq; Testosterona 1/40eq; Testosterona 1/100eq e Testosterona 1/200eq. A 1eq é escolhida para estar ainda em uma faixa linear do detector e a Testosterona 1/200Eq abaixo do limite de detecção do instrumento usado. Como exemplo, as seguintes concentrações foram usadas para um sistema Waters Quattro Micro (100ng/ml; 5ng/ml; 2,5ng/ml; 1ng/ml; 500pg/ml). Uma solução em branco de 0ng/ml foi preparada usando a solução S2.

[000365] Após a derivatização da molécula de analito, podem derivar isômeros, que frequentemente resultam em picos múltiplos. O comportamento cromatográfico desses isômeros precisa ser tratado de forma a quantificar de forma relativa suas propriedades. A Figura 5 exemplificada descreve a distribuição do sinal ao longo do tempo aplicando um determinado método cromatográfico em 5% da altura absoluta do pico. O parâmetro de "separação" ("splitting") descreve a capacidade do sistema cromatográfico de separar os isômeros resultantes da reação de derivatização da molécula de analito. O tempo de retenção medido no baricentro do pico dos isômeros pode descrever a polaridade do derivado resultante se o material cromatográfico de fase reversa for usado para a separação. As áreas A1 e A2 são medidas em

contagens\*min de Sinal e relatadas como sua razão para os isômeros de derivação resultantes, respectivamente. Se a razão dos Picos A1 e A2 for 50/50, os isômeros resultantes foram produzidos em quantidades iguais. Se a marca pode afetar esta proporção de modo a ser diferente de 50/50, um isômero é predominantemente produzido. As intensidades do sinal são, portanto, distribuídas desigualmente e, por isso, intensificarão a altura do sinal contra o ruído de fundo não afetado.

[000366] Para cada substância de marcação, o respectivo derivado de testosterona foi medido por espectrometria de massa de ionização por eletrospray após a separação por cromatografia líquida e diferentes varreduras de fragmentação com energias de colisão de 15 V, 20 V, 25 V, 30 V, 35 V e 40 V foram realizadas. O sinal de massa do pico de íon molecular e do pico de íon do fragmento mais abundante (perda neutra) foi usado para otimização da fragmentação. A energia de fragmentação é um dos parâmetros de ajuste mais importantes quando se trata de ganho de sinal para moléculas carregadas com unidade de perda neutra. A energia de fragmentação é crítica porque a molécula precisa ser desclivada durante a fonte e outras condições do caminho do íon. A clivagem do fragmento de perda neutra deve ocorrer apenas na célula de colisão (e ou dispositivos relacionados) para formar um determinado fragmento de interesse. Se a energia de colisão precisa ser muito alta para a clivagem do fragmento de perda neutra, também outros caminhos de fragmentação indesejados podem ocorrer, o que resulta em uma perda de intensidade do sinal para o caminho de fragmentação de perda neutra. Portanto, a energia de colisão não deve ser muito pequena nem muito grande para obter um comportamento de fragmentação ideal. O máximo em contagens de área pela respectiva energia de colisão foi usado para outras abordagens de quantificação de limite de detecção. Para cada substância marcadora, o respectivo derivado de testosterona foi ajustado em um espetrômetro de

massa triplo quadrupolo, injetando-o via cromatografia líquida no espectrômetro de massa. O parâmetro de ajuste foi a energia de colisão que resultou no sinal mais alto do respectivo pico cromatográfico de cinco experimentos de energia de colisão independentes.

#### **PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS E DE MS**

- Polaridade ES+
- Calibração Estático 2
- Capilar (kV) 3,00 3,00
- Cone (V) 50,00 53,36
- Extrator (V) 3,00 3,54
- Lente RF (V) 0,2 0,2
- Temperatura da Fonte (°C) 140 138
- Temperatura de Dessolvatação (°C) 350 348
- Fluxo de Gás Cone (L/Hr) 50 49
- Fluxo de Gás de Dessolvatação (L/Hr) 650 646
- Resolução LM 1 5,0
- Resolução HM 1 15,0
- Energia Iônica 1 1,0
- Entrada 50 -65
- Colisão 2 -15
- Saída 50 -65
- Resolução LM 2 5,0
- Resolução HM 2 15,0
- Energia Iônica 2 1,0
- Multiplicador (V) 650 -647
- Fluxo da Bomba de Seringa (uL/min) 40,0
- Pressão Pirani da Célula de Gás(mbar) 1,87e-4
- Parâmetros do Instrumento - Função 2:

- Polaridade ES+
- Calibração Estático 2
- Capilar (kV) 3,00 3,00
- Cone (V) 50,00 53,36
- Extrator (V) 3,00 3,54
- Lente RF (V) 0,2 0,2
- Temperatura da Fonte (°C) 140 138
- Temperatura de Dessolvatação (°C) 350 348
- Fluxo de Gás Cone (L/Hr) 50 49
- Fluxo de Gás de Dessolvatação (L/Hr) 650 646
- Resolução LM 1 5,0
- Resolução HM 1 15,0
- Energia Iônica 1 1,0
- Entrada 50 -65
- Colisão 2 -15
- Saída 50 -65
- Resolução LM 2 5,0
- Resolução HM 2 15,0
- Energia Iônica 2 1,0
- Multiplicador (V) 650 -647
- Fluxo da Bomba de Seringa (uL/min) 40,0
- Pressão Pirani da Célula de Gás(mbar) 1,87e-4
- Parâmetros do Instrumento - Função 3:
  - Polaridade ES+
  - Calibração Estático 2
  - Capilar (kV) 3,00 3,00
  - Cone (V) 50,00 53,36
  - Extrator (V) 3,00 3,54

- Lente RF (V) 0,2 0,2
- Temperatura da Fonte (°C) 140 138
- Temperatura de Dessolvatação (°C) 350 348
- Fluxo de Gás Cone (L/Hr) 50 49
- Fluxo de Gás de Dessolvatação (L/Hr) 650 646
- Resolução LM 1 5,0
- Resolução HM 1 15,0
- Energia Iônica 1 1,0
- Entrada 50 -65
- Colisão 2 -15
- Saída 50 -65
- Resolução LM 2 5,0
- Resolução HM 2 15,0
- Energia Iônica 2 1,0
- Multiplicador (V) 650 -647
- Fluxo da Bomba de Seringa (uL/min) 40,0
- Pressão Pirani da Célula de Gás(mbar) 1,87e-4
- Registro Experimental ACE
- ----- Executar parâmetros do método -----
- Waters Acquity SDS
- Tempo de Execução: 10,00 min
- Comentário:
- Seleção de Solvente A: A1
- Seleção de Solvente B: B1
- Limite de Baixa Pressão: 0,000 bar
- Limite de Alta Pressão: 1034,200 bar
- Nome do Solvente A: Água
- Nome do Solvente B: Acetonitrila

- Interruptor 1: Sem Mudança
- Interruptor 2: Ligado
- Interruptor 3: Sem Mudança
- Lavagem de Vedaçāo: 5,0 min
- Mapear 1: Pressāo do Sistema
- Mapear 2: %B
- Canal de Dados de Pressāo do Sistema: Sim
- Canal de Dados da Taxa de Fluxo: Nāo
- Canal de Dados de %A: Nāo
- Canal de Dados de %B: Nāo
- Canal de Dados de Pressāo de A Primário: Nāo
- Canal de Dados de Pressāo de A Acumulador: Nāo
- Canal de Dados de Pressāo de B Primário: Nāo
- Canal de Dados de Pressāo de B Acumulador: Nāo
- Canal de Dados de Pressāo do Desgaseificador: Nāo
- [Tabela de Gradiente]
- Tempo(min) Taxa de fluxo %A %B Curva
  - 1. Inicial 0,400 98,0 2,0
  - 2. 7,00 0,400 20,0 80,0 6
  - 3. 7,10 0,400 0,0 100,0 6
  - 4. 8,00 0,400 0,0 100,0 6
  - 5. 8,10 0,400 98,0 2,0 6
  - 6. 10,00 0,400 98,0 2,0 6
- Executar Eventos: Sim
- [Tabela de Eventos]
- Tempo de Execuçāo(min) Parâmetro de Ação do Evento
  - 1. 0,10 Interruptor 2 Ligado 0,00
  - 2. 3,50 Interruptor 2 Desligado 0,00

- 3. 9,00 Interruptor 2 Ligado 0,00
- 
- Waters996 PDA
- Comprimento de Onda Inicial (nm) 210,00
- Comprimento de Onda Final (nm) 400,00
- Resolução (nm) 1,2
- Taxa de Amostragem (espectro/s) 2,000
- Resposta do Filtro 1
- Tempo de Exposição (ms) Automático
- Interpolar 656 Sim
- Tempo de Parada de Aquisição (minutos) 10,00
- Salvar no disco: Sim
- Canal Análogo 1 Waters996 PDA
- Modo de Saída Desligado
- Canal Análogo 2 Waters996 PDA
- Modo de Saída Desligado
- 
- AutoSampler Waters Acquity
- Tempo de Execução: 10,00 min
- Comentário:
- Carregar Adiante: Desativado
- Opção de Loop: Loop parcial com Enchimento Excessivo da Agulha
- LoopOffline: Desabilitar
- Nome do Solvente de Lavagem Fraca: Metanol
- Volume de Lavagem Fraca: 600 uL
- Nome do Solvente de Lavagem Forte: Metanol
- Volume de Lavagem Forte: 200 uL

- Temperatura da Coluna Alvo: 40,0 C
- Faixa de Alarme de Temperatura da Coluna: 20,0 C
- Temperatura Alvo da Amostra: 10,0 C
- Faixa de Alarme de Temperatura da Amostra: 10 C
- Fator de Enchimento Excessivo de Loop Completo: Automático
  - Taxa de Extração da Seringa: Automático
  - Posicionamento da Agulha: Automático
  - Vão de Ar Pré-Aspirado: Automático
  - Vão de Ar Pós-Aspirado: Automático
  - Canal de Dados de Temperatura da Coluna: Sim
  - Canal de Dados de Temperatura Ambiente: Sim
  - Canal de Dados de Temperatura de Amostra: Não
  - Canal de Dados de Temperatura do Organizador de Amostra: Não
    - Canal de Dados de Pressão de Amostra: Não
    - Interruptor 1: Sem Mudança
    - Interruptor 2: Ligado
    - Interruptor 3: Sem Mudança
    - Interruptor 4: Sem Mudança
    - Mapear: Pressão da Amostra
    - Alarme de Temperatura da Amostra: Ativado
    - Alarme de Temperatura da Coluna: Ativado
    - Executar Eventos: Sim
    - [Tabela de Eventos]
    - Tempo de Execução(min) Ação do Evento
      - 1. 0,10 Interruptor 2 Ligado
      - 2. 3,00 Interruptor 2 Desligado

- 3. 3,10 Interruptor 2 Alternar
- 4. 8,00 Interruptor 2 Pulso
- 5. 8,10 Interruptor 2 Desligado
- 6. 10,00 Interruptor 2 Ligado
- Esvaziamento do Enchimento Excessivo da Agulha:

Automático

- Parâmetro de Injeção de Execução de Amostra

Volume de Injeção (ul) - 10,00.

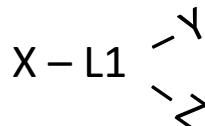
[000367] A partir das curvas de calibração linear, os respectivos limites de detecção foram obtidos usando o procedimento descrito em DIN EN ISO 32645. Os fatores de intensificação são calculados com base no Limite de Detecção (LOD) da testosterona marcada em comparação com o LOD de testosterona não derivatizada. Os resultados são mostrados na Tabela 3, abaixo.

**TABELA 3: RESULTADOS PARA AS MARCAS ESPECÍFICAS**

Marca	Fator de intensificação para testosterona não derivatizada	Tempo de Retenção [min]	Separação de Pico [min]	Largura do Pico [min]	Fragmento de perda neutra	Energia de fragmentação otimizada [V]	Razão de isômero A1/A2
Testosterona não derivatizada	1	2,82	0	0,2	Elemento de estrutura de testosterona	25	n.z.
Amplifex (Sciex)	22	2,35	0,11	0,3	NMe3	20	51/49
Marca 16	158	7,1	0,17	0,52	N2	30	20/80
Marca 18	30	6,3	0,17	0,55	N2	22	10/90
Marca 17	54	5,5	0,17	0,50	SOMe	40	20/80

### REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSTO, caracterizado por ser de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa, que é particularmente capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração permanentemente carregada, em particular compreendendo uma fração permanentemente carregada, e

incluindo qualquer sal do mesmo.

2. COMPOSTO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela unidade reativa X ser selecionada a partir do grupo que consiste em unidade reativa de carbonila, unidade reativa de dieno, unidade reativa de hidroxila, unidade reativa de amino, uma unidade reativa de imina, uma unidade reativa de tiol, uma unidade reativa de diol, uma unidade reativa de fenol, unidade reativa de epóxido, uma unidade reativa de dissulfeto e uma unidade reativa de azida.

3. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pela unidade reativa X ser um grupo reativo a carbonila, em particular em que X é selecionado a partir do grupo que consiste em

(i) uma unidade hidrazina, por exemplo, uma unidade H2N-NH-, ou H2N-NR1-, em que R1 é arila ou alquila C1-4, particularmente alquila C1 ou C2, opcionalmente substituída,

(ii) uma unidade hidrazida, em particular uma carbo-hidrazida ou sulfo-hidrazida, em particular uma unidade  $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  ou  $\text{H}_2\text{N}-\text{NR}_2-\text{C}(\text{O})-$ , em que  $\text{R}_2$  é arila ou alquila C1-4, particularmente alquila C1 ou C2, opcionalmente substituída,

(iii) uma unidade hidroxilamino, por exemplo, uma unidade  $\text{H}_2\text{N}-\text{O}-$ , e

(iv) uma unidade ditiol, particularmente uma unidade 1,2-ditiol ou 1,3-ditiol.

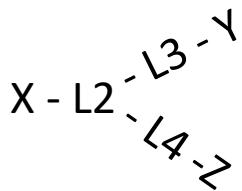
4. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pela unidade reativa X ser um grupo reativo a tiol ou ser um grupo reativo a amino, tal como um grupo éster ativo, por exemplo, éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) ou sulfo éster de NHS, um éster de hidroxibenzotrialzol (HOBt) ou grupo éster de 1-hidroxi-7-acabenzotriazol (HOAt).

5. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela unidade de perda neutra Y liberar uma entidade neutra após ionização.

6. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pela unidade carregada Z ser permanentemente carregada.

7. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pela ramificação, em particular o ligante trifuncional L1, compreender 1 a 30 átomos de C, opcionalmente compreendendo 1 ou mais heteroátomos.

8. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo composto ter uma fórmula de acordo com a fórmula B:



fórmula B

em que:

X, Y e Z são conforme definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 7,

L2, L3 e L4 são ramificações lineares, cada uma individualmente compreendendo C1-C10, opcionalmente cada um individualmente compreendendo um ou mais heteroátomos, e

em que as ramificações lineares L2, L3 e L4, juntas, formam a ramificação, em particular o ligante trifuncional L1, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pela unidade reativa X ser um grupo reativo a carbonila, a unidade de perda neutra Y ser uma fração heterocíclica de 5 membros, a unidade de carga Z compreender uma fração permanentemente carregada positivamente

10. COMPOSTO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pela unidade reativa X ser H<sub>2</sub>N-NH-, a unidade de perda neutra Y ser triazol ou tetrazol, e a unidade de carga Z compreender um grupo de amônio terciário.

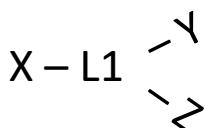
11. COMPOSIÇÃO, caracterizada por compreender o composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

12. KIT, caracterizado por compreender o composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ou a composição, conforme definida na reivindicação 11.

13. ADUTO COVALENTE, caracterizado por compreender

uma molécula de analito e o composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, covalentemente ligados um ao outro, em particular, em que o aduto covalente é formado por reação química da molécula do analito e do composto, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

14. USO DE UM COMPOSTO de fórmula A:



em que:

X é uma unidade reativa, que é particularmente capaz de formar uma ligação covalente com uma molécula de analito,

L1 é um ligante ramificado, em particular um ligante trifuncional,

Y é uma unidade de perda neutra,

Z é uma unidade carregada que compreende pelo menos uma fração permanentemente carregada, em particular compreendendo uma fração permanentemente carregada,

incluindo qualquer sal do mesmo,

ou de uma composição ou kit compreendendo pelo menos um composto de fórmula A,

caracterizado por ser para a determinação de espectrometria de massa de uma molécula de analito, em que a determinação de espectrometria de massa compreende particularmente uma determinação de espectrometria de massa em tandem, mais particularmente em um dispositivo triplo quadrupolo.

15. MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA de uma molécula de analito, caracterizado por compreender as etapas:

(a) reagir a molécula de analito com um composto de fórmula

A, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que um aduto covalente da molécula de analito e do composto de fórmula A é formado, e

(b) submeter o aduto da etapa (a) a uma análise de espectrometria de massa,

de preferência em que a etapa de análise de espectrometria de massa (b) compreende:

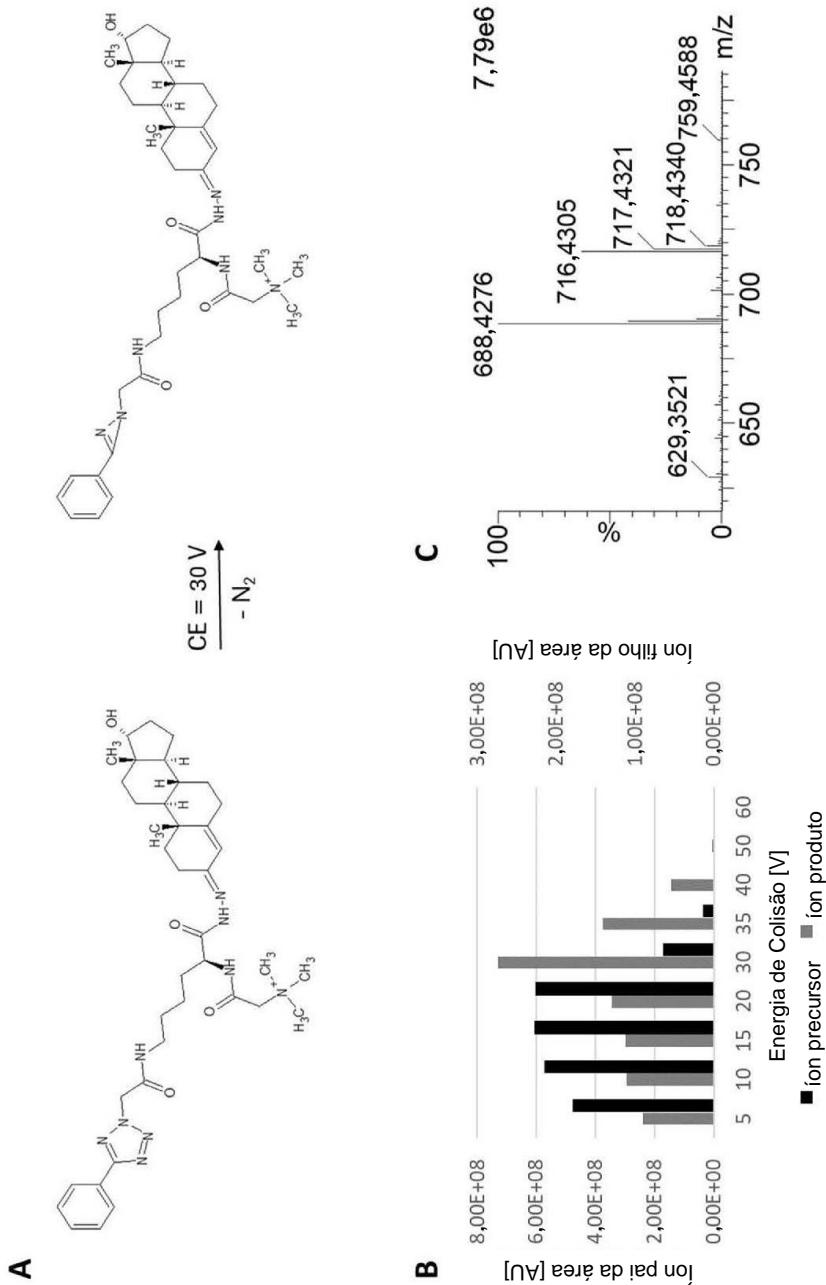
(i) submeter um íon do aduto a um primeiro estágio de análise de espectrometria de massa, em que o íon do aduto é definido de acordo com sua razão massa/carga (m/z),

(ii) causar a fragmentação do íon aduto, através da qual uma primeira entidade neutra, particularmente uma entidade neutra de baixo peso molecular, é liberada e um íon filho do aduto é gerado, em que o íon filho do aduto difere em sua razão m/z a partir do íon aduto, e

(iii) submeter o íon filho do aduto a um segundo estágio de análise de espectrometria de massa, em que o íon filho do aduto é definido de acordo com sua razão m/z, e/ou

em que (ii) pode ainda compreender a fragmentação alternativa do aduto, através da qual uma segunda entidade neutra diferente da primeira entidade neutra é liberada e um segundo íon filho do aduto é gerado, e

em que (iii) pode compreender ainda submeter o primeiro e o segundo íons filhos do aduto a um segundo estágio de análise espectrométrica de massa, em que o primeiro e o segundo íons filhos do aduto são definidos de acordo com suas razões m/z.

**Figura 1**

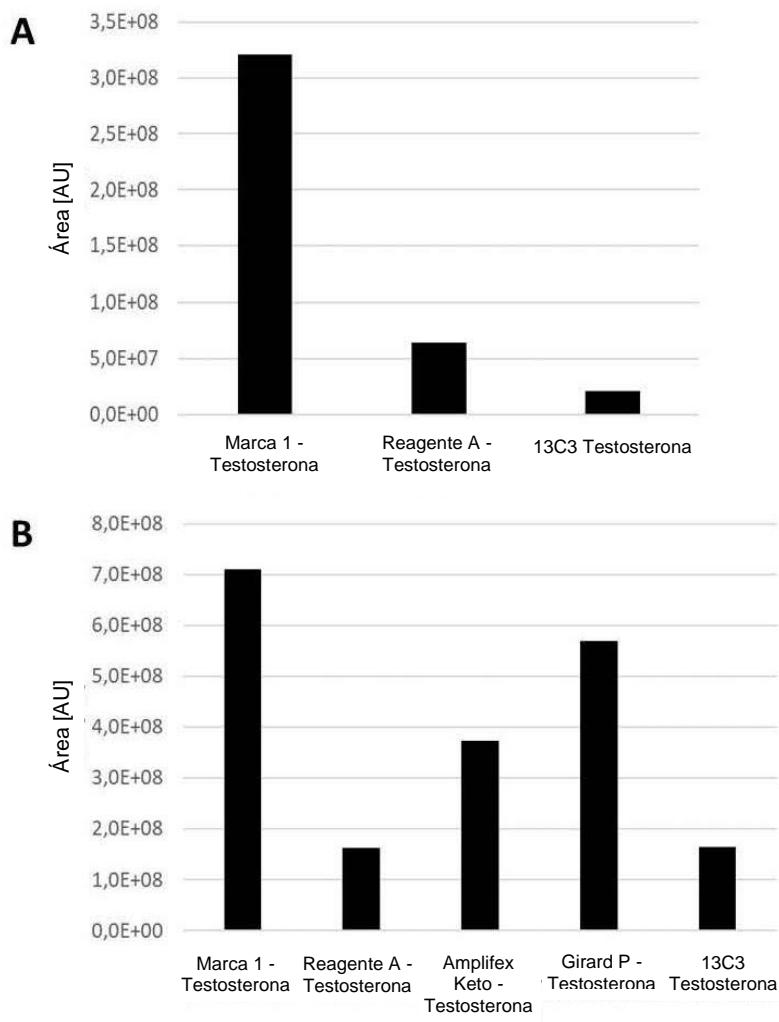
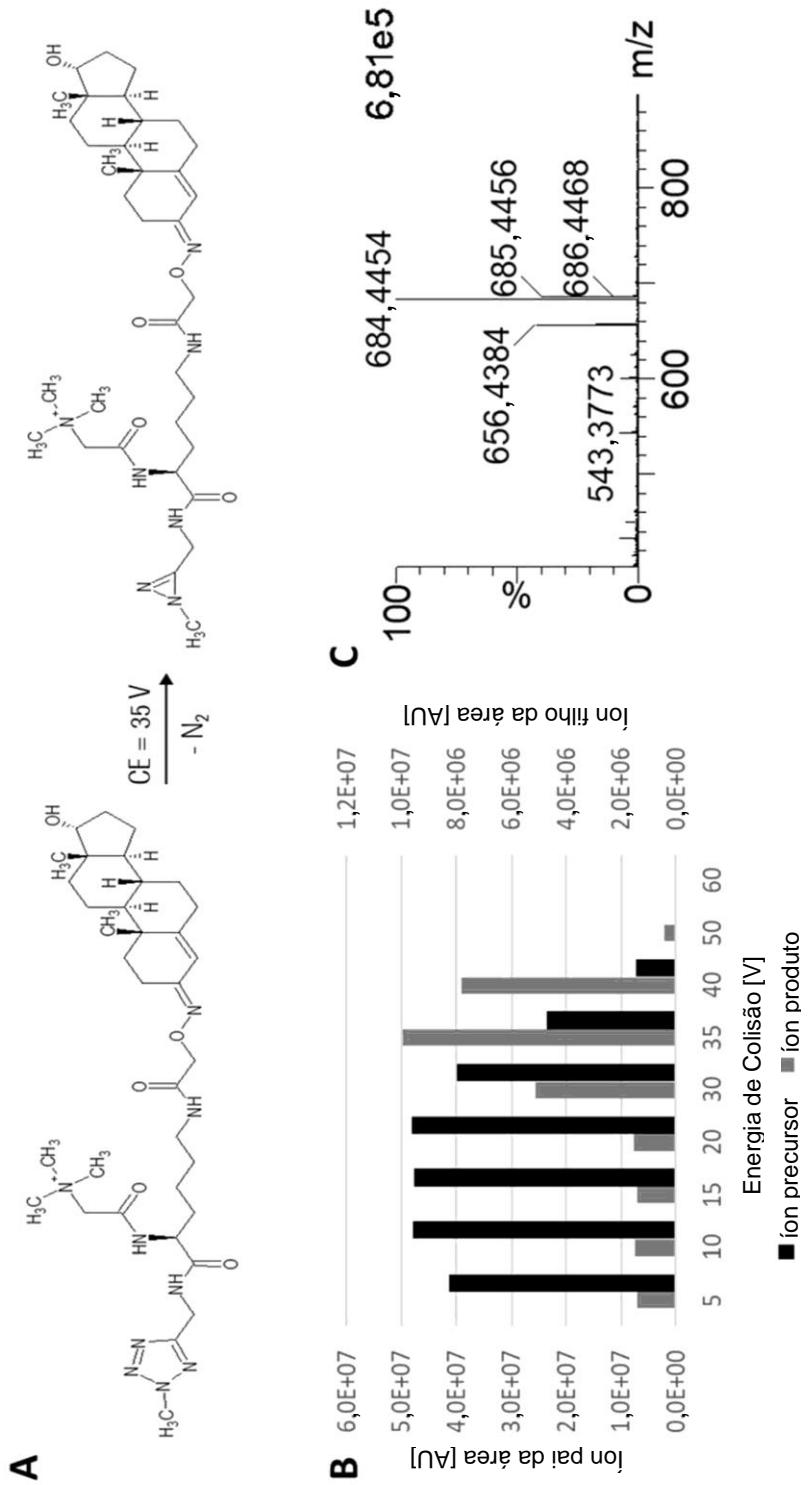
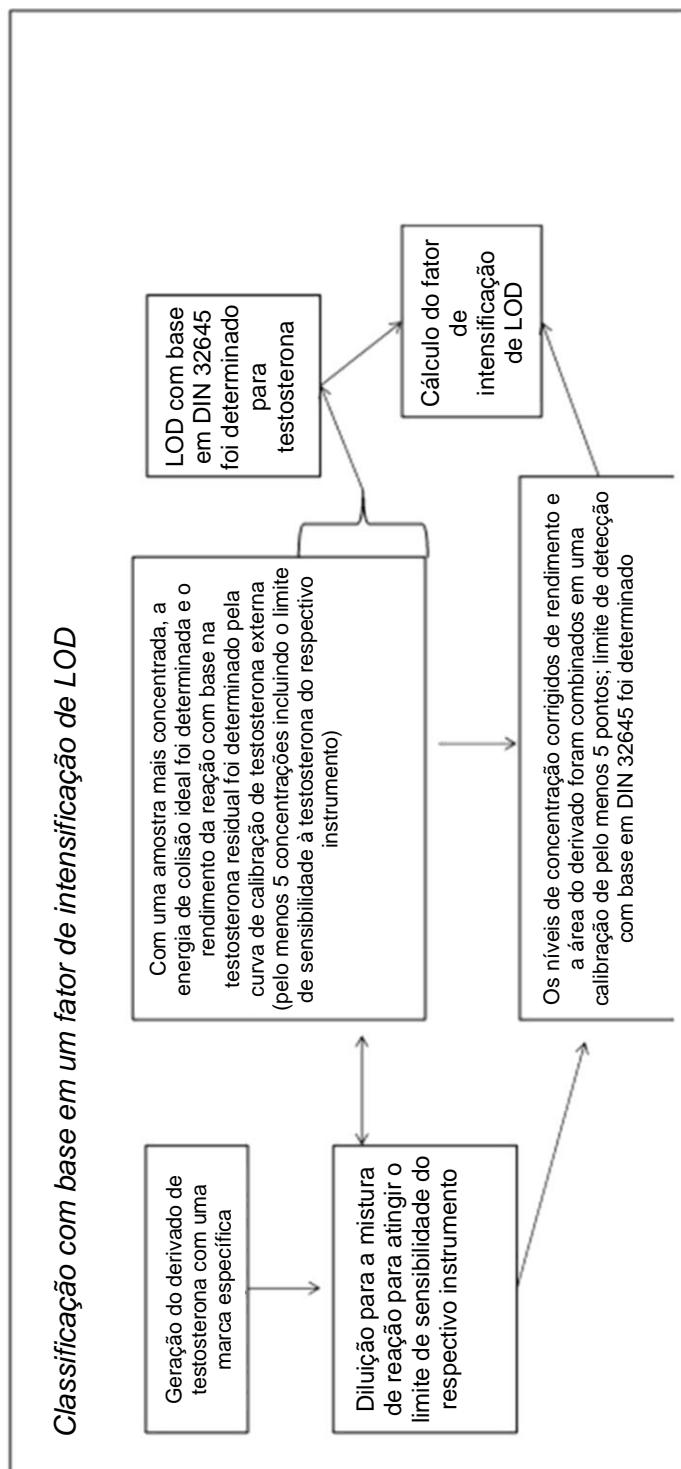
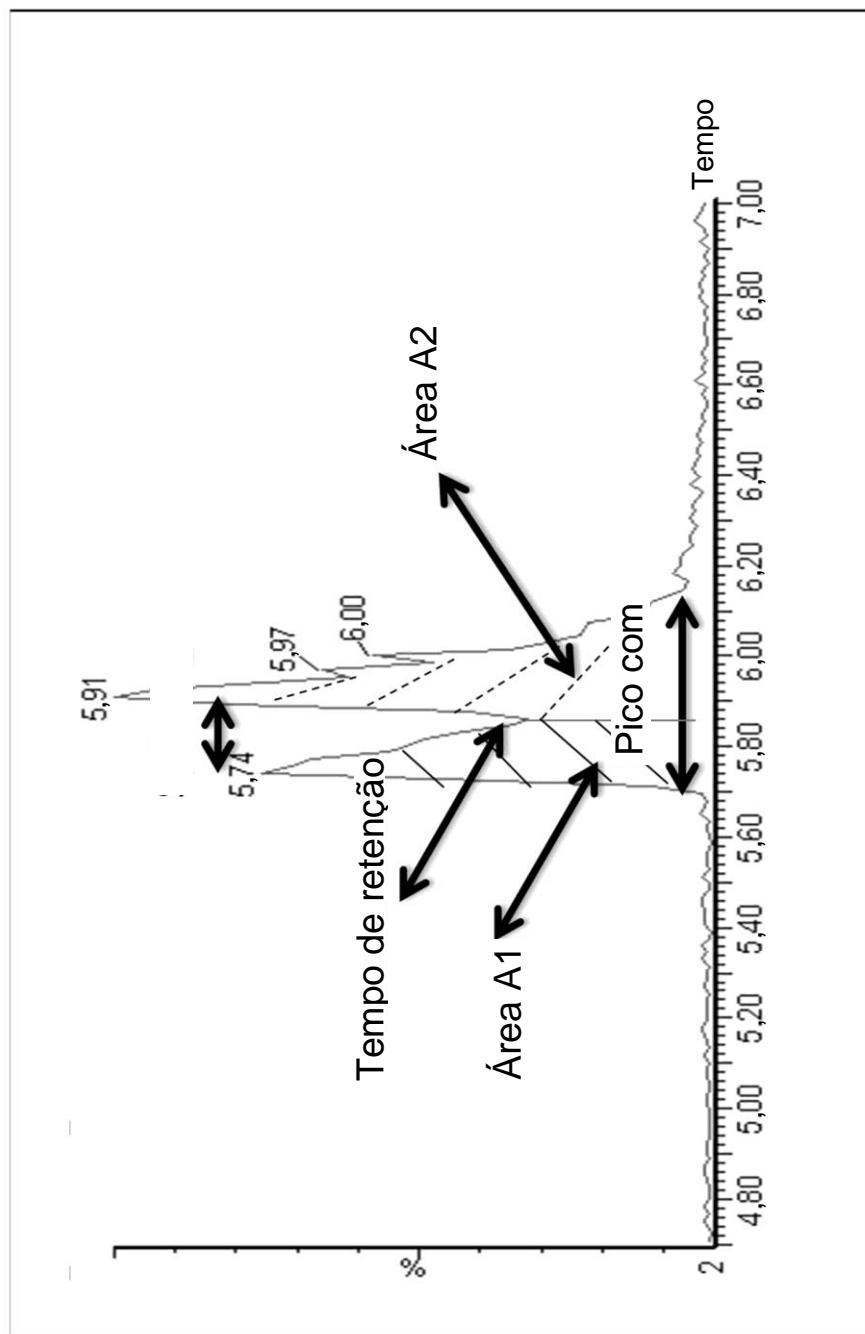
**Figura 2**

Figura 3



**Figura 4**

**Figura 5**

**RESUMO**

**“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO, KIT, ADUTO COVALENTE, USO DE UM  
COMPOSTO E MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPECTROMETRIA  
DE MASSA”**

A presente invenção refere-se a reagentes que são adequados para serem usados em espectrometria de massa, bem como a métodos de determinação de espectrometria de massa de moléculas de analito usando os referidos reagentes.