



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

(21) **PI0708485-4 A2**



* B R P I O 7 0 8 4 8 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 02/03/2007
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)

(51) *Int.Cl.:*
G01N 24/00 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA DISTINGUIR ISÔMEROS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA**

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DISTINGUIR ISOMEROS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA A presente invenção refere-se a métodos para distinguir isômeros de dimetilarginina. Também são apresentados métodos e composições para diagnosticar distúrbios cardiovasculares.

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2006 US 60/778,483

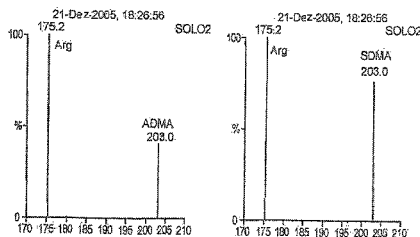
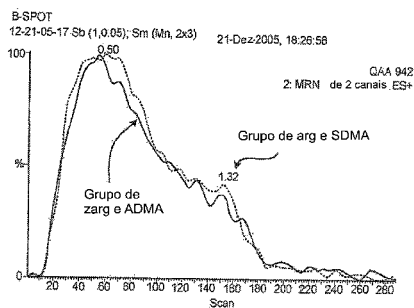
(73) Titular(es): Perkinelmer Las Inc

(72) Inventor(es): Blas Cerda

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007005279 de 02/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/103124 de 13/09/2007



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS PARA DISTINGUIR ISÔMEROS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA".

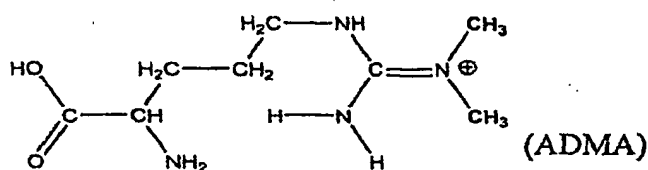
Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

5 Este pedido reivindica prioridade para o Pedido US Série N° 60/778.483, depositado em 2 de março de 2006, cujo conteúdo encontra-se aqui incorporado a título de referência.

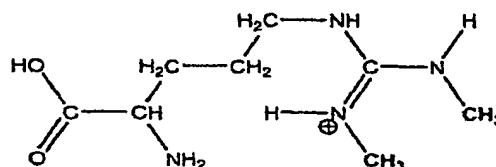
Sumário

10 A presente invenção refere-se, entre outras coisas, a distinguir isômeros moleculares usando espectrometria de massa. Por exemplo, este relatório descritivo apresenta um método para detectar um ou os dois isômeros de dimetilarginina, usando espectrometria de massa em série.

Esses métodos têm várias aplicações e podem ser usados para detectar dimetilarginina em uma amostra (por exemplo, uma amostra proveniente de uma síntese ou uma amostra de um indivíduo). No contexto de diagnóstico, os métodos podem ser usados para obter um perfil metabólico para um indivíduo (por exemplo, um ser humano). Um perfil metabólico é constituído de informações que incluem informações sobre o estado de um ou ambos os membros de um par de isômeros de um metabólito, por exemplo, um ou ambos de: dimetilarginina assimétrica (ADMA) dimetilarginina simétrica (SDMA), os dois isômeros de dimetilarginina:



e



Em algumas modalidades, um perfil metabólico inclui informações sobre outras moléculas, por exemplo, outros metabólitos. O perfil metabólico resultante pode ser usado para avaliar o estado de saúde de um

indivíduo (por exemplo, um ser humano), tal como a presença ou ausência de um distúrbio, por exemplo, um distúrbio vascular (por exemplo, um distúrbio cardiovascular ou um distúrbio hipertensivo).

Em um aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para distinguir isômeros de dimetilarginina. O método inclui as etapas de:
5 para distinguir isômeros de dimetilarginina. O método inclui as etapas de: ionizar uma amostra para gerar íons; seleccionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons seleccionados para produzir íons filhotes; e detectar uma ou ambas de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra
10 por detecção de um ou ambos do sinal m/z de um íon filhote a um m/z único para ADMA e o sinal m/z de um íon filhote a um m/z único para SDMA.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para distinguir isômeros de dimetilarginina, método este que inclui as etapas de: ionizar uma amostra para gerar íons; seleccionar íons tendo uma
15 proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons seleccionados para produzir íons filhotes; e detectar uma ou ambas da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 indica que a amostra compreende dimetilarginina
20 assimétrica (ADMA) e o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 indica que a amostra compreende dimetilarginina simétrica (SDMA). A faixa de m/z pode ser de cerca de m/z 203.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para detectar dimetilarginina simétrica (SDMA), método este que inclui
25 as etapas de: ionizar uma amostra para gerar íons; seleccionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons seleccionados para produzir íons filhotes; e detectar dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra detectando o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172. A faixa de m/z pode ser de cerca de m/z 203.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA). O método inclui as etapas de: ionizar uma amostra para gerar íons; seleccionar íons tendo uma
30

proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) na amostra detectando o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46. A faixa de m/z pode ser de cerca de m/z 203.

5 Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, um padrão interno é adicionado à amostra antes da ionização da amostra. O padrão interno pode ser, ou conter, um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos um átomo pesado. O padrão interno pode conter
10 ou ser um isômero de SDMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado e onde os isômeros de SDMA e de ADMA de referência têm pesos atômicos diferentes.

 Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para detectar isômeros de dimetilarginina, método este que inclui as
15 etapas de: fornecer uma amostra que inclui um ou mais padrões internos, onde pelo menos um padrão interno é um isômero de dimetilarginina contendo pelo menos um átomo pesado; ionizar uma amostra para gerar íons; selecionar íons tendo uma faixa de m/z correspondente à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina (por exemplo, de ocorrência
20 natural) e selecionar íons em uma ou mais faixas de m/z adicionais, as faixas sendo adequadas para isolar o um ou mais padrões internos; fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e/ou dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção de um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para ADMA
25 e/ou um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para SDMA usando os íons filhotes; e detectar o um ou mais padrões internos.

 Em algumas modalidades, a faixa m/z corresponde à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina é cerca de m/z 203. Em algumas modalidades, a amostra pode incluir um primeiro padrão interno
30 que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e onde os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômi-

cos diferentes . Em algumas modalidades, a amostra inclui um primeiro padrão interno que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e onde os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos iguais.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, o método pode incluir ainda a etapa de medir o nível de SDMA e/ou ADMA na amostra.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, a amostra que é ionizada pode ser uma amostra biológica. A amostra biológica pode ser, ou conter, sangue, soro, plasma, linfa, fluído amniótico, saliva, fluído cerebrospinal, fluído lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, a amostra que é ionizada pode conter compostos além da dimetilarginina. A amostra que é ionizada pode conter compostos que não comigram em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, é possível detectar um ou mais analitos adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser biomoléculas metabólicas. O um ou mais analitos adicionais podem ser aminoácidos ou acilcarnitinas. O um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina. Em algumas modalidades, o um ou mais analitos adicionais podem ser medidos, por exemplo, usando espectrometria de massa em série.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, a amostra não é quimicamente modificada antes da ionização da amostra. Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, a amostra é quimicamente modificada antes da ionização da amostra.

Em algumas modalidades de qualquer um dos métodos descritos acima, o nível de um sinal a cerca de m/z 46 e o nível de um sinal a cer-

ca de m/z 172 pode ser medido, por exemplo, determinando o resultado de uma função dependente do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um método para diagnosticar um distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA, o método compreendendo: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir o nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde um nível alterado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA. O distúrbio pode caracterizar-se por níveis de ADMA aumentados e/ou níveis de SDMA aumentados. O distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA pode ser um distúrbio vascular e/ou um distúrbio hipertensivo. O distúrbio hipertensivo pode ser pré-eclâmpsia. A faixa de m/z range pode ser cerca de m/z 203.

A amostra biológica que é ionizada pode conter compostos além da dimetilarginina. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano. O distúrbio vascular pode ser um distúrbio cardiovascular ou um distúrbio hipertensivo. O distúrbio hipertensivo pode ser pré-eclâmpsia. O distúrbio cardiovascular pode ser aterosclerose. O distúrbio vascular pode ser diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, ou hipertensão. Em algumas modalidades, é possível medir o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172. A amostra de referência pode ser de um indivíduo que não tem, não tem suspeita de ter, nem corre o risco de desenvolver um distúrbio cardiovascular.

A amostra biológica pode ser, ou conter, sangue, soro, plasma, linfa, fluido amniótico, saliva, fluido cerebrospinal, fluido lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

Em algumas modalidades, um ou mais analitos adicionais. Podem ser medidos um ou mais analitos adicionais pode ser citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina. O um ou mais analitos adicionais podem ser aminoácidos ou acilcarnitinas. O um ou mais analitos
5 adicionais podem ser medidos, por exemplo, usando espectrometria de massa.

Em algumas modalidades, um padrão interno pode ser adicionado à amostra biológica antes da ionização da amostra. O padrão interno pode ser, ou conter, um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos
10 um átomo pesado. O padrão interno pode ser, ou conter, um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e onde os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

Em ainda um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta
15 um método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indivíduo, método este que inclui as etapas de: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir um ou ambos
20 do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um
25 distúrbio vascular. A faixa de m/z pode ser cerca de m/z 203. A amostra biológica que é ionizada pode conter compostos além da dimetilarginina. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano. O distúrbio vascular pode ser um distúrbio cardiovascular ou um distúrbio hipertensivo. O distúrbio hipertensivo pode ser pré-eclâmpsia. O distúrbio cardiovascular
30 pode ser aterosclerose. O distúrbio vascular pode ser diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, ou hipertensão. Em algumas modalidades, é possível medir o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o

nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172. A amostra de referência pode ser de um indivíduo que não tem, não tem suspeita de ter, nem corre o risco de desenvolver um distúrbio cardiovascular.

Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos
5 adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina. O um ou mais analitos adicionais podem ser aminoácidos ou acilcarnitinas. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos, por exemplo, usando espectrometria de
10 massa. A amostra biológica pode ser, ou conter, sangue, soro, plasma, linfa, fluído amniótico, saliva, fluído cerebrospinal, fluído lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor. A amostra biológica que é ionizada pode ser, ou conter, compostos além da dimetilarginina.

Em algumas modalidades, o método pode incluir a etapa de:
depois de diagnosticar o indivíduo como tendo, ou correndo o risco de desenvolver, um distúrbio vascular, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos. O um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes redutores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores. O um ou mais anti-hipertensivos podem ser diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa
15 bloqueadores. O um ou mais agentes abaixadores de colesterol podem ser estatinas.
20

Em algumas modalidades, um padrão interno pode ser adicionado à amostra biológica antes da ionização da amostra. O padrão interno pode ser, ou conter, um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos
25 um átomo pesado. O padrão interno pode ser, ou conter, um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e onde os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

Em um outro aspecto, este relatório descritivo fornece um método
30 para diagnosticar pré-eclâmpsia em um indivíduo, método este que inclui as etapas de: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de

5 massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, pré-eclâmpsia. A faixa de m/z pode ser cerca de m/z 203. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano.

10 Em ainda um outro aspecto, este relatório descritivo fornece um método para avaliar a resposta de um indivíduo a um agente terapêutico. O método pode incluir as etapas de: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo tratado com um agente terapêutico; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga
15 (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde o mesmo nível ou um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra biológica obtida do indivíduo antes do tratamento é uma indicação de que o indivíduo não está respondendo ao tratamento e um nível reduzido de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação à amostra biológica obtida do indivíduo antes do
20 tratamento é uma indicação de que o indivíduo está respondendo ao tratamento. A faixa de m/z pode ser cerca de m/z 203. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano. Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina. O um ou mais analitos adicionais podem ser aminoácidos ou acilcarnitinas. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos, por exemplo, usando espectrometria de massa. A amostra biológica pode ser, ou conter, sangue, soro, plasma, linfa, fluido amniótico, saliva, fluido cerebro-

pinhal, fluído lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor. A amostra biológica que é ionizada pode ser, ou conter, compostos além da dimetilarginina. O indivíduo pode ser um indivíduo que tem, ou com suspeita de ter, um distúrbio vascular. O distúrbio vascular pode ser um distúrbio hipertensivo tal como pré-eclâmpsia. O distúrbio vascular pode ser um distúrbio cardiovascular tal como aterosclerose. O distúrbio vascular pode ser diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, ou hipertensão.

Em algumas modalidades, é possível medir o nível de ADMA e o nível de SDMA. Em algumas modalidades, o método também pode incluir: se o indivíduo não está respondendo ao tratamento, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos diferentes. O um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes abaixadores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores. O um ou mais anti-hipertensivos podem ser diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa bloqueadores. O um ou mais agentes abaixadores de colesterol podem ser estatinas.

Em algumas modalidades, o método pode incluir: se o indivíduo estiver respondendo ao tratamento, continuar a administrar o mesmo agente terapêutico ao indivíduo.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo fornece um método para fornecer um perfil metabólico para um indivíduo, o método compreendendo: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e detectar um ou ambos do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172; e fornecer um perfil metabólico do indivíduo que inclui um parâmetro que é função de um ou ambos do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172. A faixa de m/z pode ser cerca de m/z 203. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano. O indivíduo pode ser um indivíduo com suspeita de ter um distúrbio cardiovascular. Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos adi-

cionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina. O um ou mais analitos adicionais podem ser aminoácidos ou acilcarnitinas. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos, por exemplo, usando espectrometria de massa.

5 A amostra biológica pode ser, ou conter, sangue, soro, plasma, linfa, fluido amniótico, saliva, fluido cerebrospinal, fluido lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor. A amostra biológica que é ionizada pode ser, ou conter, compostos além da dimetilarginina. O indivíduo pode ser um indivíduo que tem, ou com suspeita de ter, um distúrbio vascular. O distúrbio vascular pode ser
10 um distúrbio hipertensivo tal como pré-eclâmpsia. O distúrbio vascular pode ser um distúrbio cardiovascular tal como aterosclerose. O distúrbio vascular pode ser diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, ou hipertensão.

Em algumas modalidades, é possível medir o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon
15 filhote a cerca de m/z 172.

Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser qualquer um daqueles descritos neste relatório descritivo. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos usando espectrometria de massa.

20 Em ainda um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um perfil metabólico para um indivíduo obtido pelo método compreendendo: fornecer uma amostra biológica de um indivíduo; ionizar a amostra biológica para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z , fragmentar os íons selecionados para produzir
25 íons filhotes; e medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 para obter o perfil metabólico do indivíduo. A faixa de m/z pode ser cerca de m/z 203. O indivíduo pode ser um mamífero, por exemplo, um ser humano. O indivíduo pode ser um
30 indivíduo com suspeita de ter um distúrbio vascular. Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser qualquer um daqueles descritos neste relatório descri-

tivo. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos usando espectrometria de massa.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo fornece um método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indivíduo, o método compreendendo: fornecer um perfil metabólico descrito neste relatório descritivo; e comparar um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA no perfil metabólico com o nível de ADMA e o nível de SDMA em um perfil metabólico de referência, onde um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA em comparação com o nível no perfil metabólico de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo fornece um método para avaliar um composto, o método compreendendo: contatar uma célula ou um indivíduo com o composto; ionizar uma amostra da célula ou do indivíduo para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ; fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir o nível de um ou ambos de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, onde uma alteração em um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA na amostra obtida da célula ou do indivíduo contatada com o composto em comparação com o nível em uma amostra de uma célula ou de um indivíduo não contatada com o composto indica que o composto é um composto que é um modulador dos níveis de ADMA ou SDMA. A célula pode ser a célula de um mamífero, por exemplo, uma célula de ser humano. A célula pode ser uma célula endotelial. A célula pode ser uma célula expressando eNOS. A célula pode ser obtida de um indivíduo que tem, ou com risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

Em algumas modalidades, é possível medir um ou mais analitos adicionais. O um ou mais analitos adicionais podem ser qualquer um daqueles descritos neste relatório descritivo. O um ou mais analitos adicionais podem ser medidos usando espectrometria de massa.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um kit para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo: um ou ambos de ADMA e SDMA, onde um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; e, opcionalmente, instruções de como detectar SDMA e ADMA. O kit pode conter um ácido orgânico tal como ácido oxálico.

Em um outro aspecto, este relatório descritivo apresenta um kit para dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo: um ou ambos de ADMA e SDMA, onde um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; um ácido orgânico; e, opcionalmente, instruções de como detectar SDMA e ADMA. O ácido orgânico pode ser ácido oxálico.

Em algumas modalidades de qualquer um dos kits descritos nesta invenção, os kits também podem conter um aplicativo de computador útil para detectar um ou ambos de ADMA ou SDMA.

Em algumas modalidades de qualquer um dos kits descritos nesta invenção, os kits também podem conter um ou mais padrões internos adicionais úteis na detecção de uma ou mais de quaisquer das biomoléculas (por exemplo, biomoléculas metabólicas) descritas nesta invenção.

Os métodos descritos nesta invenção têm várias aplicações. Por exemplo, os métodos podem ser usados para avaliar a pureza de uma amostra, por exemplo, a pureza de um produto de síntese química ou de uma purificação. Ele pode ser usado para determinar uma reação química, por exemplo, na qual um isômero de dimetilarginina é um reagente, intermediário ou produto. A reação pode ocorrer *in vitro*, por exemplo, em um sistema livre de células ou em células, ou *in vivo*.

Este relatório descritivo também apresenta uma composição que inclui ADMA contendo pelo menos um isótopo de átomo pesado, e que é pelo menos 10, 20, 60, 80, 90, 95, 97, 98, 98, 99,5% pura. A composição pode ter uma concentração maior que cerca de 1 pM (por exemplo, maior que cerca de 1 nM). Por exemplo, a molécula de ADMA tem um peso atômico pelo menos 1, 2, 3, 4, unidades atômicas maior que a ADMA natural.

A composição pode ser substancialmente livre de ADMA que tem uma proporção de massa/carga de cerca de 203. A composição pode ser usada como um padrão interno. Por exemplo, a composição pode ser adicionada a uma amostra.

5 Este relatório descritivo também apresenta uma composição que inclui SDMA contendo pelo menos um isótopo de átomo pesado, e que é pelo menos 10, 20, 60, 80, 90, 95, 97, 98, 98, 99,5% pura. A composição pode ter uma concentração maior que cerca de 1 pM (por exemplo, maior que cerca de 1 nM). Por exemplo, a molécula de SDMA tem um peso atômico pelo menos 1, 2, 3, 4, unidades atômicas maior que a SDMA natural. A
10 composição pode ser substancialmente livre de SDMA que tem uma proporção de massa/carga de cerca de 203. A composição pode ser usada como um padrão interno. Por exemplo, a composição pode ser adicionada a uma amostra.

15 O relatório descritivo apresenta ainda uma composição que inclui ADMA contendo pelo menos um isótopo de átomo pesado e SDMA contendo pelo menos um isótopo de átomo pesado. Tipicamente, esses isômeros pesados de dimetilarginina têm uma proporção de massa/carga diferente do outro. A composição pode ser usada como um padrão interno. Por exemplo, a composição pode ser adicionada a uma amostra. Em uma modalidade, a composição é substancialmente livre de ADMA que tem uma proporção de massa/carga (m/z) de cerca de 203. Em uma outra modalidade, a
20 composição inclui ainda SDMA que tem uma proporção de massa/carga de cerca de 203.

25 Muitos espectrômetros de massa possuem precisões de massa para alta resolução. Por exemplo, no caso de um íon com uma única carga (por exemplo, um íon de ADMA ou SDMA com uma única carga), esta faixa corresponde a 0,6 m/z . Neste relatório descritivo, os íons com uma única carga positiva dos isômeros de dimetilarginina têm um m/z nominal de 203.
30 Por conseguinte, tais faixas podem ser usadas nesta invenção. Por exemplo, a seleção de íons com uma proporção de massa para carga (m/z) de cerca de 203 pode ser implementada usando um canal que varia de 202,7 a

203,3. Deve ficar entendido que os métodos descritos nesta invenção também abrangem o uso de íons de dimetilarginina com múltiplas cargas (por exemplo, duas ou três), íons com múltiplas cargas estes que por conseguinte afetam a precisão de massa e a faixa amu de resolução. Por exemplo, para um íon com duas cargas, a faixa amu corresponde a 0,3 m/z e assim por diante. Variações mínimas (por exemplo, variações na calibragem) em um espectrômetro de massa podem resultar em sinais m/z de íon primitivo e filhote no isômero de dimetilarginina que não coincidem com aqueles apresentados neste relatório descritivo, mas o sinal m/z correspondente àqueles descritos podem ser facilmente identificados e usados, por exemplo, por compensação do desvio na calibragem.

Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas neste relatório descritivo estão aqui incorporados em sua integridade a título de referência. Os materiais, métodos, e exemplos descritos nesta invenção são apenas ilustrativos e não pretendem ser limitativos.

Outros aspectos e vantagens da invenção tornar-se-ão aparentes a partir da descrição a seguir, dos desenhos, e das reivindicações.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é uma representação esquemática representando a estrutura química da arginina, dimetilarginina assimétrica (ADMA), e dimetilarginina simétrica (SDMA).

A figura 2 é um espectro de massa em série da SDMA e representação esquemática da fragmentação de SDMA e fragmentos (ionizados e neutros) produzidos na fragmentação. "A" indica o íon primitivo de SDMA com uma proporção de massa para carga (m/z) de 203. "B" indica o íon do fragmento filhote específico de SDMA com m/z 172. O espectro de massa representa sinais m/z do íon filhote detectados subsequente à fragmentação de uma amostra contendo SDMA incluindo o íon primitivo (m/z 203) e o fragmento específico de SDMA (m/z 172; indicado pela seta). O eixo dos X representa a proporção massa para carga (m/z) e o eixo dos Y representa a abundância relativa (percentagem) de cada íon na amostra.

A figura 3 é um espectro de massa em série da ADMA e representação esquemática da fragmentação de ADMA e fragmentos (ionizados e neutros) produzidos na fragmentação. "A" indica o íon primitivo de ADMA com uma proporção de massa para carga (m/z) de 203. "B" indica o íon do
5 fragmento filhote específico de ADMA com m/z 46. O espectro de massa representa sinais m/z do íon filhote detectados subsequente à fragmentação de uma amostra contendo ADMA incluindo o íon primitivo (m/z 203) e o fragmento específico de ADMA (m/z 46; indicado pela seta). O eixo dos X representa a proporção massa para carga (m/z) e o eixo dos Y representa a
10 abundância relativa (percentagem) de cada íon na amostra.

A figura 4 é um espectro de massa em série (experimento conhecido como monitoramento de múltiplas reações ou MRM) de uma amostra de sangue mostrando os perfis de tempo da corrente iônica total (TIC) superposta de SDMA e ADMA (superior; Monitoramento de Múltiplas Reações) e um par de espectros de massa correlatos mostrando a quantidade
15 relativa da ADMA (esquerda) e SDMA (direita) na amostra em relação à (controle). Os respectivos perfis de tempo TIC para ADMA e SDMA estão indicados pelas setas (superior). O eixo dos X dos perfis de TIC está em unidades de número de imagens ("scans") e o eixo dos Y representa a a-
20 bundância relativa. Para os dois espectros de massa inferiores, o eixo dos X representa a proporção massa para carga (m/z) e o eixo dos Y representa a abundância relativa (percentagem) de cada íon na amostra.

A figura 5 é uma representação esquemática mostrando as estruturas químicas de dois padrões internos nos métodos descritos nesta invenção: dimetilarginina simétrica rotulada com deutério (SDMA; esquerda) e
25 dimetilarginina assimétrica rotulada com deutério (ADMA; direita).

Descrição Detalhada

A tecnologia descrita nesta invenção refere-se à detecção de uma ou mais formas de isômeros moleculares de maneira que identifica ca-
30 da isômero de forma única. Em uma modalidade, o método inclui ionizar uma amostra para gerar íons; selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) na faixa m/z correspondente ao grupo de isômeros;

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e detectar um, dois ou mais dos isômeros detectando pelo menos um sinal m/z para um íon filhote único para um dos isômeros. Em muitas implementações, o método permite detectar simultaneamente cada isômero do grupo de isômeros.

5 Os métodos descritos nesta invenção podem ser usados para distinguir entre (e medir) isômeros de dimetilarginina (SDMA e/ou ADMA). Nas aplicações desses métodos, é possível obter perfis metabólicos para um indivíduo (por exemplo, um ser humano), perfil este que reflete a situação de pelo menos dimetilarginina assimétrica (ADMA) e/ou dimetilarginina
10 simétrica (SDMA). O perfil metabólico resultante pode ser usado para avaliar o estado de saúde de um indivíduo (por exemplo, um ser humano), tal como a presença ou ausência de um distúrbio metabólico ou um distúrbio vascular (por exemplo, um distúrbio cardiovascular ou um distúrbio hipertensivo).

15 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa em série pode ser usada para distinguir e/ou medir isômeros. Na espectrometria de massa em série, dois analisadores de massa estão ligados em série via uma célula de colisão. O primeiro analisador de massa (MS-1) é usado para selecionar um íon de
20 interesse (por exemplo, um íon de uma proporção específica de massa para carga (m/z)). Os íons selecionados são então transferidos para uma célula de colisão onde eles são fragmentados por colisões com um gás inerte. Este processo é chamado de dissociação colisionalmente ativada (CAD). Depois de os íons primitivos (às vezes chamados de precursor) terem sido
25 fragmentados, o segundo analisador de massa (MS-2) é usado para explorar e detectar todos os íons filhotes produzidos ou para selecionar e detectar íons de fragmentos particulares.

No exemplo 1 (abaixo), a espectrometria de massa em série foi usada para isolar os íons precursores de ADMA e SDMA, fragmentar os íons,
30 ons, e detectar picos específicos que são indicativos da presença destes dois compostos na amostra. SDMA e ADMA são moléculas isoméricas (vide figura 1) e, como tais, têm o mesmo peso molecular (vide figs. 2 e 3). No

entanto, as duas moléculas diferem pela posição de seus dois grupos metil. Como mostrado na figura 1, SDMA tem uma distribuição simétrica da substituição metila com um grupo metila em cada uma das porções nitrogênio de guanidino disponíveis, ao passo que ADMA contém dois grupos metila no mesmo nitrogênio do grupo guanidino.

Em um tipo de espectrometria de massa em série, conhecida como exploração dos íons produzidos, os íons primitivos (neste caso SDMA m/z 203 ou ADMA m/z 203) são selecionados em MS-1 e transferidos para uma célula de colisão onde eles fragmentam (exemplificado pelas representações esquemáticas nas figs. 2 e 3). Os fragmentos produzidos por cada íon primitivo são detectados por exploração MS-2 resultando em uma imagem do íon produzido (ou filhote) de cada íon primitivo selecionado. A figura 2 mostra um pico único correspondendo à SDMA em 172 m/z , ao passo que a figura 3 mostra um pico único correspondendo à ADMA em 46 m/z . dessa forma, SDMA e ADMA podem ser distinguidas em uma única amostra em uma análise.

A figura 4 mostra que SDMA, ADMA e arginina podem ser distinguidas em uma única amostra em uma análise usando monitoramento de múltiplas reações (exploração por MRM). Em um tipo de espectrometria de massa em série conhecido como monitoramento de múltiplas reações (MRM), um íon primitivo de interesse é selecionado em MS-1, fragmentado na célula de colisão e um íon de fragmento específico resultante da ativação colisional é selecionado em MS-2 e finalmente detectado. MS-1 e MS-2 são fixados para selecionar respectivamente os pares de íons primitivo e de fragmento correspondentes de interesse para um período de tempo predeterminado (poucos milissegundos). Esta transição íon primitivo específico-íon produzido pode ser considerada como um canal de detecção. Se for necessário detectar analitos adicionados, canais de detecção adicionais com transições de massa específicas podem ser introduzidos na experiência. Os dados de todas as transições de massa (canais) selecionadas podem ser adquiridos em seqüência para obter as informações desejadas. A detecção e quantificação de SDMA e ADMA em uma mistura podem ser ob-

tidas empregando a transição de massa específica para cada um desses compostos da seguinte maneira: para ADMA: MS-1 fixado para selecionar e transmitir o íon primitivo em m/z 203, MS-2 fixado para selecionar e transmitir o íon produzido específico em m/z 46 (canal 1 ou transição de MRM 1); e
5 para SDMA: MS-1 fixado para selecionar e transmitir o íon primitivo em m/z 203, MS-2 fixado para selecionar e transmitir o íon produzido específico em m/z 172 (canal 2 ou transição de MRM 2). Estas duas transições de MRM podem ser medidas seqüencialmente a partir da mesma amostra por um período de tempo predeterminado para detectar a presença e/ou a concentração de uma mistura desses compostos em tal amostra. Nestas experiências de MRM, são detectados os íons de fragmento verdadeiros (m/z 46 ou
10 m/z 172). No entanto, é o m/z do íon primitivo correspondente que é registrado no espectro de MRM.

Devido ao fato de que, neste exemplo, os íons primitivos de
15 SDMA e ADMA têm o mesmo m/z , cada canal gera seu próprio espectro oferecendo resolução completa entre esses dois isômeros. Os espectros mostrados na figura 4 foram obtidos da maneira descrita acima, no entanto, as transições de massa específicas para arginina foram acrescentadas a cada canal para mostrar que quando o m/z dos íons primitivos difere da
20 transição de massa dos analitos, ambas as transições de massa podem ser registradas no mesmo espectro. Estes métodos também podem ser usados para distinguir outros isômeros moleculares, contanto que, com a fragmentação, sejam produzidos íons com proporções m/z diferentes.

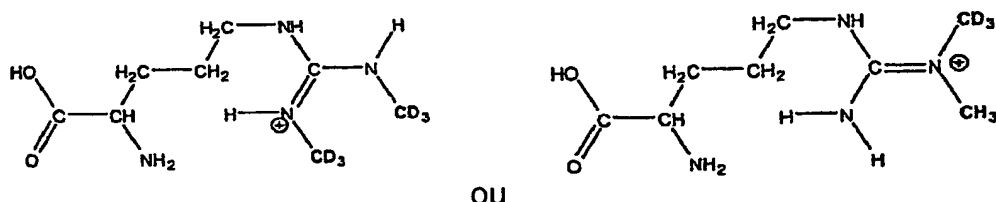
A detecção simultânea de arginina (por exemplo, como mostrado na figura 4) demonstra que padrões internos rotulados com isótopos estáveis para um ou ambos de ADMA e SDMS podem ser adicionados a uma amostra, com o que pode ser efetuada a quantificação de ADMA e SDMA. Tal marcação de ADMA e SDMA com isótopos resulta em um desvio de massa, embora retendo propriedades físico-químicas muito similares entre
30 os compostos rotulados e não rotulados.

Em geral, é possível adicionar um ou mais padrões internos a uma concentração conhecida a uma amostra para permitir a quantificação

do analito de interesse (por exemplo, ADMA e/ou SDMA). Por exemplo, para uma amostra analisada usando espectrometria de massa em série, a proporção dos sinais produzidos por ADMA, SDMA e seus padrões internos correspondentes pode ser usada para determinar as quantidades desses compostos na amostra. Os padrões internos também podem ser adicionados para distinguir moléculas de ocorrência natural (endógenas). Os padrões internos podem ser preparados em uma solução de extração antes de misturar uma amostra (por exemplo, uma amostra de sangue) e a solução de extração. Alternativamente, os padrões internos podem ser adicionados à mistura em qualquer etapa na preparação da amostra que garanta que esses padrões internos não serão removidos da mistura durante o processamento da amostra (por exemplo depois de uma extração líquido-líquido ou uma extração de fase sólida).

Os padrões internos, ou analitos de referência, para um isômero (ou outras moléculas, por exemplo, biomoléculas descritas neste relatório descritivo) detectados por um método descrito nesta invenção podem ser qualquer modificação ou análogo de um isômero que é detectável por espectrometria de massa. Um analito de referência é separadamente detectável na biomolécula com base em características físicas únicas, tal como uma massa ou proporção de massa para carga única. Como descrito acima, um padrão interno comumente usado para espectrometria de massa é uma forma isotopicamente rotulada estável ou um derivado químico de um isômero. Por exemplo, análogos rotulados com isótopos estáveis podem ser usados para quantificar SDMA e ADMA usando a técnica conhecida como espectrometria de massa por diluição de isótopos onde o analito e os padrões internos são processados na mesma amostra. Padrões internos podem ser criados de modo que 1) a marcação cause um desvio na massa de pelo menos 1 unidade de massa e 2) nenhum dos rótulos de isótopos estáveis fique localizado em sítios lábeis para prevenir alterações. Os rótulos podem ser ^2H (D), ^{15}N , ^{13}C ou ^{18}O em qualquer combinação. A localização real dos rótulos na molécula pode variar desde que o pré-requisito 2 (acima) seja satisfeito. Além disso, a posição dos rótulos da alteração potencial na massa

dos íons de fragmento também pode ser usada para confirmar separação do padrão interno e analitos. Exemplos de padrões internos potenciais úteis nos métodos descritos nesta invenção incluem, porém sem limitação:



Vários tipos de espectrômetros de massa encontram-se disponíveis ou podem ser produzidos com várias configurações, todos eles podendo ser úteis nos métodos descritos nesta invenção. Em geral, um espectrômetro de massa possui os seguintes componentes principais: uma entrada de amostra, uma fonte iônica, uma célula de colisão, um analisador de massa, um detector, um sistema de vácuo, e um sistema de controle do instrumento, e um sistema de dados. Uma diferença na entrada de amostra, fonte iônica, e analisador de massa geralmente define o tipo de instrumento e suas capacidades. Por exemplo, uma entrada pode ser uma fonte de cromatografia líquida em coluna capilar ou pode ser uma sonda ou plataforma direta tal como usada em dessorção a laser assistida por matriz. Fontes iônicas comuns são, por exemplo, "electropulverização", incluindo "nanopulverização" e "micropulverização" ou dessorção a laser assistida por matriz. Analisadores de massa comuns incluem filtros de massa quadrupolares, analisadores de massa por tempo de voo (de preferência um analisador de massa por tempo de voo de aceleração ortogonal), filtros de massa com sifão de íons, analisadores com setor magnético, ou analisadores de massa por ressonância ciclôtrica de íons por transformada de Fourier ("FTICR"). A célula de colisão pode ser, por exemplo, um conjunto de hastes quadrupolares, um conjunto de hastes hexapolares, ou um conjunto de hastes octopolares. A célula de colisão de preferência forma um envoltório substancialmente estanque a gás distante da entrada de íons e da abertura de saída de íons. Um gás de colisão tal como hélio, argônio, nitrogênio, ar ou metano pode ser introduzido na célula de colisão.

Os exemplos específicos descritos neste relatório descritivo fo-

ram realizados usando espectrômetros de massa em série (vide, por exemplo, o exemplo 1).

Amostras adequadas para os métodos descritos nesta invenção incluem qualquer líquido biológico, célula, tecido, ou fração dos mesmos, que inclui biomoléculas indicativas de um estado metabólico. Uma amostra 5 pode ser, por exemplo, um espécime obtido de um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser humano) ou pode ser derivada de tal indivíduo. Por exemplo, uma amostra pode ser uma seção de tecido obtida por biópsia, ou células que são colocadas em cultura de tecido ou adaptadas 10 para cultura de tecido. Amostras exemplificativas das mesmas incluem fibroblastos cultivados, células de fluido amniótico cultivadas, e amostras de vilos coriônicos. Uma amostra também pode ser um espécime de um líquido biológico tal como urina, sangue, plasma, soro, saliva, sêmen, cuspe, fluido cerebrospinal, lágrimas, muco, e outros. Uma amostra pode ser ainda fra- 15 cionada, se desejado, em uma fração contendo tipos específicos de células. Por exemplo, uma amostra de sangue pode ser fracionada em soro ou em frações contendo tipos particulares de células sanguíneas tais como células sanguíneas vermelhas ou células sanguíneas brancas (leucócitos). Se desejado, uma amostra pode ser uma combinação de amostras de um indiví- 20 duo tal como uma combinação de uma amostra de tecido e de líquido, e outras. Métodos para obter amostras que preservam a atividade ou integridade das moléculas na amostra são bastante conhecidos pelos versados na técnica. Tais métodos incluem o uso de tampões e/ou inibidores apropriados, que incluem inibidores de nuclease, protease e fosfatase, que preser- 25 vam ou minimizam alterações nas moléculas na amostra. Tais inibidores incluem, por exemplo, quelantes tais como ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido bis(P-aminoetil éter)N,N,N1,N1-tetraacético de etileno glicol (EGTA), inibidores de protease tais como fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipainina e outros, e inibidores de fosfatase 30 tais como fosfato, fluoreto de sódio, vanadato e outros. Tampões e condições apropriados para isolar moléculas são bastante conhecidos pelos especialistas na técnica e podem variar dependendo, por exemplo, do tipo de

molécula na amostra a ser caracterizada (vide, por exemplo, Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis & Ashwood, eds. W.B. Saunders, Philadelphia, (1999)). Uma amostra também pode ser processada para eliminar ou minimizar a presença de substâncias interferentes. Para uso nos métodos descritos nesta invenção, uma amostra pode estar em vários estados físicos. Por exemplo, uma amostra pode ser um líquido ou sólido, pode ser dissolvida ou suspensa em um líquido, pode estar em uma emulsão ou gel, e pode ser absorvida em um material. Como um exemplo não limitativo, uma amostra pode ser uma amostra de sangue líquido, amostra de soro líquido, amostra de célula branca líquida, sangue seco, soro, ou amostra de célula branca, ou uma tal amostra absorvida em um substrato de papel ou polímero.

Antes de efetuar a espectrometria de massa, uma amostra pode ser extraída usando uma solução de extração (vide abaixo). Para os métodos descritos nesta invenção, uma amostra (por exemplo, uma amostra extraída) não requer outras modificações químicas antes da análise usando espectrometria de massa em série. Por exemplo, uma etapa de derivatização particular não é um requisito para detecção específica e simultânea de ADMA e SDMA. No entanto, se a detecção de outros analitos na amostra requer algum tipo de derivatização da amostra, esta derivatização pode ser aplicada à SDMA e ADMA se apropriado ou adequado. Neste caso, a massa dos íons primitivos para SDMA e ADMA vai ser alterada mas a natureza específica dos íons produzidos a partir de SDMA e ADMA, não. Por exemplo, se for necessária uma etapa de esterificação para detectar e medir um grupo de analitos tais como acilcarnitinas ou aminoácidos, SDMA e ADMA também podem ser esterificadas, esterificação esta que não afeta a detecção específica e simultânea de ADMA e SDMA ou dos analitos adicionais. Mais especificamente, se os analitos extraídos precisarem ser convertidos

em ésteres butílico, SDMA e ADMA também podem ser convertidas em ésteres butílicos. Neste caso a massa e portanto a m/z para SDMA e ADMA serão alteradas de 203 para 259. No entanto, a produção dos picos de m/z em 46 e 172 específicos para ADMA e SDMA, respectivamente, permanece inalterada. Portanto, SDMA e ADMA derivatizadas podem ser detectadas monitorando-se os canais MS-1 e MS-2 de MRM 259 a 46 para ADMA e 259 a 172 para SDMA. Uma etapa de butilação pode ser usada para a análise de aminoácidos e acilcarnitinas presentes em amostras de sangue total secadas em papel-filtro (ou outras amostras). Por conseguinte, a espectrometria de massa pode ser usada para detectar SDMA e ADMA a partir de tais amostras ao mesmo tempo que, por exemplo, aminoácidos, acilcarnitinas, e outros analitos.

Em algumas aplicações dos métodos descritos nesta invenção, um ácido orgânico tal como ácido oxálico pode ser adicionado a uma solução de extração ou diretamente a uma amostra. Por exemplo, o ácido orgânico pode ser adicionado até uma concentração final de cerca de 0,1% (por exemplo, cerca de 0,01%, cerca de 0,05%, cerca de 0,15%, cerca de 0,2%, cerca de 0,25%, cerca de 0,3%, cerca de 0,4%, cerca de 0,45%, ou cerca de 0,5%) v/v na amostra extraída. Se o ácido orgânico for adicionado à amostra antes da extração, as condições podem minimizar a perda do ácido orgânico. Em algumas aplicações, um ácido orgânico pode ser adicionado a uma solução (por exemplo, uma solução de limpeza ou enxágüe) injetada na máquina subsequente à análise de uma amostra.

Aplicações exemplificativas

Os métodos descritos nesta invenção podem ser usados para obter um perfil molecular para uma amostra. O perfil pode incluir informações que indicam se um isômero molecular particular está presente e tipicamente inclui informações sobre a presença (seja qualitativa ou quantitativa) de cada isômero de um grupo particular.

Em algumas aplicações desses métodos de espectrometria de massa, é possível obter perfis metabólicos para um indivíduo (por exemplo, um ser humano). Por exemplo, os perfis podem incluir o nível de ADMA

e/ou SDMA em um indivíduo (por exemplo, um ser humano). Outras biomoléculas também podem ser detectadas, quantificadas, e/ou avaliadas, incluindo, por exemplo, um ou mais de NMMA, ornitina, citrulina, homocisteína e creatinina, em uma amostra biológica usando espectrometria de massa em série. As informações resultantes (perfil metabólico) podem ser usados para avaliar o estado de saúde de um indivíduo (por exemplo, um ser humano), tal como a presença ou ausência de um distúrbio, por exemplo, metabólico ou vascular (por exemplo, distúrbio hipertensivo ou cardiovascular), ou para avaliar o risco de um distúrbio.

O estado metabólico de um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser humano) pode ser refletido, por exemplo, pela presença, quantidade, proporções, e modificações de aminoácidos no corpo. Metilação pós-tradução é um exemplo de uma modificação de aminoácidos que pode ser indicativa de um estado metabólico. Os principais produtos de metilação produzidos durante o andamento de renovação de proteínas são ADMA e SDMA. Essas formas metiladas de arginina têm papéis importantes na função normal de um organismo, e portanto aumentos ou reduções anormais em suas quantidades podem alterar funções fisiológicas em um organismo. Como um exemplo, ADMA, assim como um outro derivado de arginina, NMMA (monometil arginina), são inibidores conhecidos para a enzima, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). eNOS desempenha um papel na regulação das funções endoteliais e cardiovasculares (vide, por exemplo, King et al. (1995) *Reprod. Fertil. Dev.* 7(6):1581-1584 e Jin et al. (1996) *J Cardiovasc. Pharmacol.* 28(3):439-446). Quando as de ADMA em um organismo aumentam, a atividade de eNOS é inibida, e o resultado fisiológico é função endotelial reduzida, uma condição que ocorre em muitas doenças que incluem hipertensão, pré-eclâmpsia, diabetes, insuficiência renal e hipercolesterolemia. A SDMA não inibe eNOS, mas possui a mesma via que a ADMA para entrada de células e pode por conseguinte afetar a função endotelial. Como um exemplo, vários estudos mostraram níveis de SDMA alterados em indivíduos com distúrbios renais (vide por exemplo Lluçh P. et al. (2006) *Experimental Biology and Medicine* 231:70-75 e Kielstein J.T. et

al. (2006) *Nephrology Dialysis Transplantation* 21(9):2446-2451.)

A quantidade e/ou proporções de outros aminoácidos também podem refletir um estado de função endotelial e distúrbios correspondentes. Por exemplo, arginina é convertida em citrulina e óxido nítrico, que é um outro mediador na função endotelial. Além disso, a ADMA é convertida em citrulina e dimetilamina (DMA). A quantidade de arginina e/ou citrulina pode assim revelar um estado da função das células endoteliais. Vários estudos mostraram relações de níveis de ADMA e outras biomoléculas e estados patológicos. Por exemplo, Millatt et al. ((2003) *Circulation* 108(12):1420-1) apresentaram dados demonstrando que o modelo de rato de hipertensão pulmonar crônica induzida por hipoxia está associado a concentrações pulmonares aumentadas do inibidor de NOS ADMA. Além disso, os ratos com hipertensão pulmonar apresentaram expressão pulmonar e atividade reduzidas da enzima metabolizadora de ADMA DDAH I. Homocisteína e creatinina são outras biomoléculas que desempenham papéis em doenças vasculares. Por exemplo, estudos mostraram que a determinação dos níveis de homocisteína pode ajudar na avaliação do risco cardiovascular em populações hipertensas (vide, por exemplo, Bortolotto et al. (1999) *Hypertension* 34(4 Pt 2):837-42). Além disso, as pesquisas mostraram que quando óxido nítrico sintase é inibida, há produção insuficiente de óxido nítrico. Óxido nítrico é um vasodilatador; níveis reduzidos de óxido nítrico mostraram-se relacionados à hipertensão. Portanto, informações sobre a quantidade de tais biomoléculas podem ser usadas como um prognosticador para o risco de desenvolver uma distúrbio hipertensivo ou cardiovascular.

Portanto, a habilidade de distinguir isômeros de dimetilarginina -- ADMA e SDMA -- seja isolados ou junto com outras biomoléculas (por exemplo, biomoléculas metabólicas), pode ser útil para avaliar o estado de saúde de um indivíduo. Por conseguinte, é possível, ao mesmo tempo, detectar outros aminoácidos tais como NMMA, arginina, ornitina, citrulina, e homocisteína, assim como outras biomoléculas tais como creatinina, na amostra, por exemplo, identificando picos únicos para tais moléculas na análise por espectrometria de massa. A Tabela 1 inclui uma lista inesgotável de

analitos (por exemplo, biomoléculas) que podem ser simultaneamente detectadas com ADMA e/ou SDMA usando os métodos descritos nesta invenção.

Tabela 1

NAMO DO ANALITO	ABREVIACÃO
Aminoácidos	
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Citrulina	Cit
Glicina	Gly
Leucina	Leu
Metionina	Met
Ornitina	Orn
Fenilalanina	Phe
Tirosina	Tyr
Valina	Val
Carnitinas	
Carnitina livre	C0
Acetilcarnitina	C2
Propionilcarnitina	C3
Malonilcarnitina	C3DC
Butirilcarnitina	C4
3-Hidróxi-butirilcarnitina	C4OH
Isovalerilcarnitina	C5
Tigililcarnitina	C5:1
Glutarilcarnitina	C5DC
3-Hidróxi-isovalerilcarnitina	C5OH
Hexanoilcarnitina	C6
Adipilcarnitina	C6DC
Octanoilcarnitina	C8

NAMO DO ANALITO	ABREVIACÃO
Octenoilcarnitina	C8:1
Decanoilcarnitina	C10
Decenoilcarnitina	C10:1

Um perfil metabólico obtido pelos métodos descritos nesta invenção podem ser usados para diagnosticar ou prognosticar a suscetibilidade a uma variedade de distúrbios metabólicos ou vasculares (por exemplo, cardiovasculares ou hipertensivos) porque os indicadores bioquímicos (por exemplo, SDMA e/ou ADMA) examinados podem ser indicativos de tais distúrbios, quer ou não que sintomas fisiológicos ou comportamentais do distúrbio tenham se tornado aparentes (por exemplo, alguém com suspeita de ter um distúrbio metabólico ou vascular (por exemplo, cardiovascular ou distúrbio hipertensivo). Um perfil metabólico como o descrito nesta invenção pode ser útil para monitorar o metabolismo de um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser humano), tal como de alguém passando por tratamento para um distúrbio metabólico. Como um exemplo não limitativo, os métodos podem ser usados para determinar a eficácia terapêutica de um tratamento particular. Com base nesta determinação, é possível oferecer ao indivíduo opções terapêuticas adicionais ou alternativas. O perfil metabólico também pode ser útil para avaliar a aceitação do de uma modalidade de tratamento particular pelo paciente, tal como restrição dietética. Por conseguinte, a tecnologia descrita nesta invenção é aplicável ao rastreamento, diagnóstico, prognóstico, terapia de monitoramento e aceitação, e qualquer outra aplicação na qual é útil determinar a presença ou a quantidade de grupos de duas ou mais biomoléculas, tais como duas ou mais de ADMA, SDMA, NMMA, arginina, ornitina, citrulina, homocisteína e creatinina,.

Um perfil metabólico gerado usando os métodos descritos nesta invenção pode ser obtido usando uma variedade de amostras biológicas. Amostras adequadas incluem aquelas descritas acima.

Em um aspecto, um perfil metabólico como o descrito nesta invenção pode ser usado para a avaliar a presença ou ausência de um distúrbio hipertensivo. Distúrbios hipertensivos são as complicações médicas

comuns na gravidez, e a causa principal de doenças e morte maternas e infantis em todo o mundo. Eles incluem pelo menos duas entidades diferentes: uma (hipertensão induzida pela gravidez, PIH) aparece pela primeira vez durante a gravidez e revertida com o parto. A outra (hipertensão crônica), é uma condição preexistente não associada porém coincidente com a gravidez, que pode se manifestar pela primeira vez durante a gravidez e que não é resolvida com o parto. Independente do estado de gravidez ou não-gravidez, em muitos casos a hipertensão é resultado de espasmo de vasos pequenos (vasoconstricção). Portanto, os principais riscos para o feto resultam da perfusão placentária diminuída levando a um suprimento reduzido do oxigênio e nutrientes necessários para o desenvolvimento e bem-estar fetal. Os riscos maternos incluem hipoperfusão de órgãos importantes tais como rim, fígado, e cérebro. Distúrbios hipertensivos incluem, por exemplo, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, hipertensão na gravidez (HIP), hipertensão de Goldblatt, hipertensão adrenal, hipertensão maligna, hipertensão ocular, hipertensão renal, ou hipertensão crônica. Distúrbios hipertensivos podem resultar em edema cerebral ou renal e hemorragia e derrame.

Em outros aspectos, um perfil metabólico como o descrito nesta invenção pode ser usado para avaliar a presença ou ausência de distúrbios cardiovasculares, tais como hiperhomocisteinemia, diabetes melito, hipercolesterolemia, hiperglicemia e resistência à insulina, doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular, aterosclerose e doença vascular periférica. Um grupo de biomoléculas para detecção usando os métodos descritos nesta invenção pode ser selecionado com base na condição patológica particular a ser detectada. As condições patológicas associadas à ADMA, SDMA, NNMA, arginina, citrulina, e outras, são conhecidas pelos especialistas na técnica. Como um exemplo, condições patológicas associadas à ADMA e outras biomoléculas estão descritas em Lin & Lin (2004) *Acta Cardiol Sin* 2:201-211. Em alguns casos, é possível gerar um perfil metabólico de um indivíduo já identificado como tendo ou com risco de desenvolver um distúrbio metabólico ou vascular tal como um distúrbio cardiovascular ou hipertensivo, por exemplo, para monitorar a situação do distúrbio do indivíduo, a

resposta do indivíduo a uma modalidade de tratamento particular, ou a aceitação do regime de tratamento por um indivíduo.

Indivíduos de todas as idades podem ser afetados por distúrbios metabólicos ou vasculares diagnosticados usando um perfil metabólico descrito nesta invenção. Portanto, uma amostra usada em um método descrito nesta invenção pode ser obtida de um indivíduo (por exemplo, um ser humano) de qualquer idade, incluindo um neonato, recém-nascido, bebê, criança, e adulto, tal como uma mulher grávida. Os métodos também podem ser usados para indivíduos com risco de desenvolver um distúrbio metabólico ou vascular. Tais indivíduos incluem aqueles que têm (i) um histórico familiar de (um pré-disposição genética) para tais distúrbios ou (ii) um ou mais fatores de risco para desenvolver tais distúrbios. Fatores de risco exemplificativos para distúrbios cardiovasculares ou hipertensivos incluem: exposição a estresse prolongado (emocional ou físico), fumo, uma dieta rica em gorduras ou colesterol, um estilo de vida sedentário, ou um ou mais medicamentos que aumentam a pressão sanguínea.

Os métodos descritos nesta invenção envolvem determinar a presença ou a quantidade de pelo menos duas biomoléculas (por exemplo, dois ou mais isômeros), por exemplo simultaneamente, onde a presença ou quantidade de cada biomolécula está correlacionada com a presença ou ausência de um distúrbio metabólico, cardiovascular, ou hipertensivo. Os métodos descritos nesta invenção podem ser usados quantitativamente, se desejado, para possibilitar a comparação dos resultados de amostras de teste com uma quantidade padrão conhecida ou predeterminada de um analito(s) particular(es) (por exemplo, usando um padrão interno como descrito acima). Os métodos também podem ser usados quantitativamente quando uma amostra de teste é comparada com uma amostra de referência, que pode ser uma referência normal ou uma referência de distúrbio metabólico. Neste formato, a quantidade relativa de biomoléculas pode ser indicativa de um distúrbio metabólico. Uma amostra de referência, por exemplo, pode ser de um indivíduo que tem, sem suspeita de ter, sem o risco de desenvolver um distúrbio tal como um distúrbio metabólico ou vascular (por exemplo,

distúrbio cardiovascular ou hipertensivo).

5 Geralmente, um valor de corte para uma dada biomolécula pode variar e seria conhecido na literatura para analitos e enzimas comumente testados. Adaptações rotineiras óbvias de métodos conhecidos na literatura
10 podem ser usadas para estabelecer valores de corte para analitos raramente testados. Um valor de corte é tipicamente uma quantidade de biomolécula, ou proporção com uma outra biomolécula, acima ou abaixo do qual é considerado indicativo de um distúrbio metabólico ou causa para um novo exame. Portanto, de acordo com a tecnologia descrita nesta invenção um
15 nível de referência de pelo menos uma biomolécula em um tipo de amostra particular é identificado como um valor de corte, acima do qual existe uma correlação significativa entre a presença da pelo menos uma biomolécula e a presença (ou ausência) de um distúrbio metabólico. Deve ficar entendido que grupos de biomoléculas podem ser interpretados como um todo, em
partes ou em termos de analito por analito.

Os versados na técnica vão reconhecer que alguns valores de corte não são absolutos no sentido de que correlações clínicas ainda são significativas em uma gama de valores em qualquer lado do corte; no entanto, é possível selecionar um valor de corte ótimo (por exemplo escores de H
20 variáveis, e outros) da biomolécula para tipos de amostras particulares. Os valores de corte determinados para uso nos métodos descritos nesta invenção geralmente são comparados com limites publicados mas podem ser individualizados para a metodologia usada e para a população de pacientes. Deve ficar entendido que aprimoramentos nos valores de corte ótimos
25 podem ser determinados dependendo da sofisticação dos métodos estatísticos usados e do número e fonte das amostras usadas para determinar valores de nível de referência para as diferentes biomoléculas e tipos de amostras. Portanto, os valores de corte estabelecidos podem ser ajustados para mais ou para menos, com base em reavaliações periódicas ou mudanças na
30 metodologia ou distribuição da população. Além disso, valores de corte específicos para o instrumento podem ser usados, se desejado, por exemplo tal como quando a comparabilidade de desempenho inter-instrumentos é <

10%.

O nível de referência pode ser determinado por uma variedade de métodos, contanto que o nível de referência resultante forneça precisamente uma quantidade de cada biomolécula acima que existe em um primeiro grupo de indivíduos (por exemplo, seres humanos) tendo uma probabilidade de distúrbio metabólico diferente de um segundo grupo de indivíduos tendo uma quantidade de atividade de analito ou enzima metabólicos abaixo do nível de referência. O nível de referência pode ser determinado por comparação da quantidade de biomoléculas, por exemplo, em populações de indivíduos (por exemplo, pacientes) com o mesmo distúrbio metabólico. Isto pode ser realizado, por exemplo, por análise de histograma, na qual um grupo inteiro de pacientes são graficamente representados, onde um primeiro eixo representa a quantidade de biomolécula e um segundo eixo representa o número de indivíduos no grupo cuja amostra contém uma ou mais biomoléculas em uma quantidade dada. Dois ou mais grupos separados de indivíduos podem ser determinados por identificação de subgrupos de populações do grupo que têm o mesmo nível de biomoléculas ou níveis similares de biomoléculas. A determinação do nível de referência pode então ser feita com base em uma quantidade que melhor distingue esses grupos separados. O nível de referência pode ser um único número, igualmente aplicável a cada indivíduo, ou o nível de referência pode variar, de acordo com as subpopulações específicas de indivíduos. Por exemplo, indivíduos mais velhos podem ter um nível de referência diferente de indivíduos mais jovens para o mesmo distúrbio metabólico. Além disso, um indivíduo com doença mais avançada (por exemplo, uma forma mais avançada de um distúrbio cardiovascular) pode ter um valor de referência diferente do de uma forma mais branda da doença.

Métodos para identificar compostos que modulam os níveis de ADMA ou SDMA

Também são fornecidos nesta invenção métodos para identificar compostos que modulam (por exemplo, diminuem) os níveis de ADMA e/ou SDMA em uma célula. Como níveis desregulados destes dois metabólicos

são associados a um maior risco de certos distúrbios (por exemplo, distúrbios cardiovasculares e hipertensivos), os compostos identificados desta maneira podem ser úteis no tratamento de distúrbios cardiovasculares e hipertensivos. Células que podem ser contatadas com o composto candidato podem ser de qualquer espécie desde que as células produzam ADMA ou SDMA (seja sinteticamente ou naturalmente). As células podem ser células ou linhagens de células primárias e podem ser de qualquer tipo histológico, por exemplo, sem limitação, células epiteliais, fibroblastos, células linfóides, macrófagos/monócitos, granulócitos, queratinócitos, células neuronais, ou células musculares. As células podem ser cultivadas em pratos de cultura de tecido. Geralmente é preferível cultivar as células em placas de ensaio de múltiplos compartimentos (por exemplo placas de ensaio de 96 compartimentos ou de 384 compartimentos) para que vários compostos candidatos possam avaliados ao mesmo tempo. O composto candidato (opcionalmente a várias concentrações variando, por exemplo, de 0,001 nM a 10 mM) pode ser adicionado a uma solução (por exemplo, meio de cultura) contendo as células ou, quando o composto é uma proteína, as células podem expressar o mesmo de forma recombinante. Subsequente à incubação das células expressando ADMA e/ou SDMA, a presença ou o nível de ADMA e/ou SDMA pode ser determinado usando os métodos de espectrometria de massa descritos nesta invenção. Antes da detecção, as células podem ser lisadas em condições que permitam que seja preparada uma amostra que seja compatível com espectrometria de massa em série. Geralmente um composto de controle pode ser adicionado a um grupo de células seja para controle positivo ou para controle negativo. Por exemplo, um composto que se sabe aumentar ou diminuir a quantidade de ADMA ou SDMA pode ser adicionado a um grupo de células (por exemplo, um composto que inibe a proteína arginina metiltransferase; vide, por exemplo, Leiper et al. (2005) Eur. J Clin. Pharma. 62(Supp1):33-35). Um composto que se sabe não modular o nível de ADMA ou SDMA também pode ser adicionado a um grupo de células.

Os compostos identificados em qualquer um dos métodos descritos nesta invenção incluem várias classes químicas. Os compostos po-

dem ser biomoléculas incluindo, porém sem limitação, peptídios, polipeptídios, peptidomiméticos (por exemplo, peptóides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, sacarídeos, ácidos graxos, esteróides, purinas, pirimidinas, derivados ou análogos estruturais dos mesmos, polinucleotídeos, e análogos de polinucleotídeos. Os compostos podem ser compostos de moléculas pequenas ou compostos de moléculas grandes.

A identificação dos compostos de teste através do uso de várias bibliotecas descritas nesta invenção permite a subsequente modificação do composto de teste "hit" ou "lead" para otimizar a capacidade do "hit" ou "lead" de modular os níveis de ADMA e/ou SDMA em uma célula.

Deve ficar entendido que modificações que não afetam substancialmente a atividade das várias modalidades desta invenção também estão incluídas na definição da invenção oferecida neste relatório descritivo. Por conseguinte, o exemplo a seguir pretende ilustrar, e não limitar, a presente invenção.

Exemplo 1

Este exemplo descreve uma experiência na qual ADMA e SDMA presentes em uma única amostra foram distinguidos usando espectrometria de massa. A amostra foi preparada inoculando ADMA e SDMA em sangue total em concentrações aproximadamente equimolares. Arginina também foi inoculada na mesma alíquota de sangue para servir como uma referência de intensidade relativa. O sangue foi então distribuído em papel-filtro e deixado secar à temperatura ambiente por 24 horas. Pequenas punções (1/8" cada) foram excisadas da amostra de sangue seco e distribuídas nos compartimentos de uma placa de microtitulação. As punções com mancha de sangue assim produzidas foram então extraídas na placa de microtitulação com uma solução aquosa de metanol (contendo 80% de metanol, 20% de água e 0,1% de ácido acético) por aproximadamente 30 minutos. O extrato foi injetado diretamente, com a ajuda de um auto-classificador, no espectrômetro de massa sem modificação química posterior e sem qualquer separação cromatográfica nítida ("upfront") (por exemplo, HPLC preliminar). As experiências foram realizadas usando um quadrupolo triplo Sciex API 2000 ou um

quadropolo triplo Waters Quattro Micro. Os dois espectrômetros de massa estavam equipados com "electropulverização" como fontes de íons.

A análise por espectrometria de massa em série da amostra consistiu em dois grupos de canais de monitoramento de múltiplas reações (MRM). Em um grupo, foram monitoradas as seguintes transições de massa: m/z 175 para m/z 70 e m/z 203 para m/z 46 (vide figs. 2 e 3). A primeira transição de massa corresponde a uma fragmentação específica para arginina e a segunda a uma fragmentação específica para ADMA. No segundo grupo de canais de MRM, a arginina e SDMA foram monitoradas pelas seguintes transições de massa: m/z 175 para m/z 70 e m/z 203 para m/z 172 para arginina e SDMA, respectivamente. A transição para arginina corresponde à perda neutra de 105 unidades de massa atômica (amu) e representa a perda nominal dos grupos carboxílico e guanidino do íon protonado. A transição específica para ADMA representa a formação do íon de dimetil amônio a partir da ADMA protonada e a transição específica para SDMA representa a perda neutra de 31 amu que é equivalente à perda neutra da metil amina.

Mesmo sem quantificação absoluto, o exame das intensidades de ADMA e SDMA em relação às intensidades da arginina diferencia estes dois íons isoméricos. Neste exemplo pode-se ver que a intensidade da SDMA em relação àquela da arginina é maior que aquela da ADMA contra a arginina. Esta tendência indica que esses dois isômeros apresentam sensibilidade diferencial na experiência de espectrometria de massa em série. As medidas de arginina, SDMA e ADMA podem ser afetadas por moléculas residuais (transporte) de analito (por exemplo, ADMA ou SDMA) remanescentes no espectrômetro de massa. A adição de ácido oxálico à preparação de amostra reduziu significativamente os efeitos de transporte observados. A figura 4 mostra um exemplo dos espectros de MRM do exemplo descrito acima.

Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência a modalidades específicas da mesma, deve ficar entendido pelos versados na técnica que várias alterações podem ser feitas e equivalentes podem ser

substituídos sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da invenção. Além disso, muitas modificações podem ser feitas para adaptar uma situação particular, material, composição de matéria, processo, etapa ou etapas do processo, ao objetivo, espírito e escopo da presente invenção. Todas

5 estas modificações devem ser consideradas dentro do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para distinguir isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

5 selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção de um ou ambos do sinal m/z de um íon filhote em um m/z único para ADMA e do sinal m/z de um íon filhote em um m/z único para SDMA.

2. Método para distinguir isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

15 selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, em que o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 indica que a amostra compreende dimetilarginina assimétrica (ADMA) e o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 indica que a amostra compreende dimetilarginina simétrica (SDMA).

3. Método para detectar dimetilarginina simétrica (SDMA), o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

25 selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

30 detectar dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172.

4. Método para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA), o

método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) na amostra por detecção do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

10 6. Método para detectar isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

fornecer uma amostra que inclui um ou mais padrões internos, em que pelo menos um padrão interno é um isômero de dimetilarginina contendo pelo menos um átomo pesado;

15 ionizar uma amostra para gerar íons;
selecionar íons tendo uma faixa de m/z correspondente à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina e selecionar íons em uma ou mais faixas de m/z adicionais, as faixas sendo adequadas para isolar o um ou mais padrões internos;

20 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes;
detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e/ou dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção de um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para ADMA e/ou um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para SDMA usando os íons filhotes; e

25 detectar o um ou mais padrões internos.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a faixa de m/z correspondente à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina é cerca de m/z 203.

30 8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que a amostra inclui um primeiro padrão interno que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros

de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que a amostra inclui um primeiro padrão interno que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos iguais.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, compreendendo ainda medir o nível de SDMA na amostra.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, compreendendo ainda medir o nível de ADMA.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, compreendendo ainda medir o nível de SDMA e de ADMA.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que a amostra que é ionizada é uma amostra biológica.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a amostra biológica compreende sangue, soro, plasma, linfa, fluido amniótico, saliva, fluido cerebrospinal, fluido lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, em que a amostra que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a amostra que é ionizada contém compostos que não co-migram em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, em que são detectados um ou mais analitos adicionais.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

18. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

19. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

20. Método de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que o

um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16-20, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos.

5 22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectroscopia de massa em série.

10 23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, em que a amostra não é quimicamente modificada antes da ionização da amostra.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, em que a amostra é quimicamente modificada antes da ionização da amostra.

15 25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-24, em que um padrão interno é adicionado à amostra antes da ionização da amostra.

26. Método de acordo com as reivindicações 1-5 ou 9-25, em que o padrão interno compreende um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos um átomo pesado.

20 27. Método de acordo com as reivindicações 1-5 ou 9-25, em que o padrão interno contém um isômero de SDMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA de referência têm pesos atômicos diferentes.

25 28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-27, em que o nível de um sinal a cerca de m/z 46 e o nível de um sinal a cerca de m/z 172 são medidos.

30 29. Método de acordo com a reivindicação 28, compreendendo ainda determinar o resultado de uma função dependente do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172.

30. Método para diagnosticar um distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA, o método compreendendo:

- fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)
em uma faixa de m/z ,
- 5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
medir o nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote
a cerca de m/z 46 e o nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon fi-
lhote a cerca de m/z 172,
em que um nível alterado de um ou ambos de ADMA e SDMA
- 10 na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é
uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um
distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA.
31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o distúr-
bio é caracterizado por níveis de ADMA aumentados.
- 15 32. Método de acordo com a reivindicação 30 ou 31, em que o
distúrbio é caracterizado por níveis de SDMA aumentados.
33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-
32, em que o distúrbio é caracterizado por níveis de ADMA aumentados e
níveis de SDMA aumentados.
- 20 34. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
vascular.
35. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
- 25 renal.
36. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
hipertensivo.
37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o distúr-
bio hipertensivo é pré-eclâmpsia.
- 30 38. Método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indi-
víduo, o método compreendendo:

- fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)
em uma faixa de m/z ,
- 5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z
de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal
 m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,
em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA
- 10 na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é
uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um
distúrbio vascular.
39. Método de acordo com as reivindicações 30-38, em que a
faixa de m/z é cerca de m/z 203.
- 15 40. Método de acordo com as reivindicações 30-39, em que a
amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.
41. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-
40, em que o indivíduo é um mamífero.
42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que o mamí-
20 fero é um ser humano.
43. Método de acordo com a reivindicação 38-42, em que o dis-
túrbio vascular é um distúrbio cardiovascular.
44. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-
40, em que o distúrbio vascular é um distúrbio hipertensivo.
- 25 45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-
40, em que o distúrbio vascular é selecionado do grupo que consiste em:
diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, hipertensão, e pré-
eclâmpsia.
46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-
30 45, em que o distúrbio vascular é aterosclerose.
46. Método de acordo com a reivindicação 44, em que o distúr-
bio hipertensivo é pré-eclâmpsia.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-46, em que o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 é medido.

5 48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-46, em que a amostra de referência é de um indivíduo que não tem, não tem suspeita de ter, nem corre o risco de desenvolver um distúrbio cardiovascular.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-48, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

10 50. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

51. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

15 52. Método de acordo com a reivindicação 49, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 49-52, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

20 54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 38-53, compreendendo ainda depois de diagnosticar o indivíduo como tendo, ou correndo o risco de desenvolver, um distúrbio vascular, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos.

25 55. Método de acordo com a reivindicação 54, em que o um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes abaixadores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, em que o um ou mais anti-hipertensivos são diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa bloqueadores.

30 57. Método de acordo com a reivindicação 55, em que o um ou mais agentes abaixadores de colesterol são estatinas.

58. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-

57, em que a amostra biológica compreende sangue, soro, plasma, linfa, fluído amniótico, saliva, fluído cerebrospinal, fluído lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

5 59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-58, em que um padrão interno é adicionado a uma amostra biológica antes da ionização da amostra.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, em que o padrão interno compreende um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos um átomo pesado.

10 61. Método de acordo com a reivindicação 59, em que o padrão interno contém um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

15 62. Método para diagnosticar pré-eclâmpsia em um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

20 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

25 em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, pré-eclâmpsia.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

30 64. Método de acordo com a reivindicação 62 ou 63, em que o indivíduo é um mamífero.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, em que o mamí-

fero é um ser humano.

66. Método para avaliar a resposta de um indivíduo a um agente terapêutico, o método compreendendo:

5 fornecer uma amostra biológica de um indivíduo tratado com um agente terapêutico;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

10 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

em que o mesmo nível ou um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra biológica obtida do indivíduo antes do tratamento é uma indicação de que o indivíduo não está respondendo ao tratamento e um nível reduzido de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação à amostra biológica obtida do indivíduo antes do tratamento é uma indicação de que o indivíduo está respondendo ao tratamento.

20 67. Método de acordo com a reivindicação 66, em que o nível de ADMA e o nível de SDMA são medidos.

68. Método de acordo com a reivindicação 67, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

25 69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-69, em que a amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

70. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-70, compreendendo ainda: se o indivíduo não está respondendo ao tratamento, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos diferentes.

30 71. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-70, em que o indivíduo tem, ou está com suspeita de ter, um distúrbio vascular.

72. Método de acordo com a reivindicação 71, em que o distúrbio vascular é um distúrbio hipertensivo.

74. Método de acordo com a reivindicação 71, em que o distúrbio vascular é selecionado do grupo que consiste em: diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, hipertensão, e pré-eclâmpsia.

75. Método de acordo com a reivindicação 71, em que o distúrbio vascular é um distúrbio cardiovascular.

76. Método de acordo com a reivindicação 75, em que o distúrbio cardiovascular é aterosclerose.

77. Método de acordo com a reivindicação 72, em que o distúrbio hipertensivo é pré-eclâmpsia.

78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 70-77, em que o um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes abaixadores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, em que o um ou mais anti-hipertensivos são diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa bloqueadores.

80. Método de acordo com a reivindicação 78, em que o um ou mais agentes abaixadores de colesterol são estatinas.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-69, compreendendo ainda se o indivíduo estiver respondendo ao tratamento, continuar a administrar o mesmo agente terapêutico ao indivíduo.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 66-82, em que o indivíduo é um mamífero.

83. Método de acordo com a reivindicação 82, em que o mamífero é um ser humano.

84. Método para fornecer um perfil metabólico para um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)

em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172; e

5 fornecer um perfil metabólico do indivíduo que inclui um parâmetro que é função de um ou ambos do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172.

85. Método de acordo com a reivindicação 84, em que em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

10 86. Método de acordo com a reivindicação 84 ou 85, em que a amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

87. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 84-86, em que o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 são medidos.

15 88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 84-87, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

89. Método de acordo com a reivindicação 88, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

20 90. Método de acordo com a reivindicação 88 ou 89, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

91. Método de acordo com a reivindicação 88 ou 89, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

25 92. Método de acordo com a reivindicação 88 ou 89, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-92, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

30 94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-93, em que o indivíduo é um mamífero.

95. Método de acordo com a reivindicação 94, em que o indivíduo é um ser humano.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88-95, em que o indivíduo é um indivíduo com suspeita de ter um distúrbio cardiovascular.

5 97. Perfil metabólico para um indivíduo obtido pelo método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

10 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 para obter o perfil metabólico do indivíduo.

15 98. Método de acordo com a reivindicação 97, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

99. Método de acordo com a reivindicação 97 ou 98, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

20 100. Método de acordo com a reivindicação 99, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

101. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

25 102. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

103. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

30 104. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98-103, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

105. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 97-105, em que o indivíduo é um mamífero.

106. Método de acordo com a reivindicação 105, em que o indivíduo é um ser humano.

107. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 97-106, em que o indivíduo é um indivíduo com suspeita de ter um distúrbio vascular.

108. Método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer o perfil metabólico como definido na reivindicação 97; e

comparar um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA no perfil metabólico com o nível de ADMA e o nível de SDMA em um perfil metabólico de referência,

em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA em comparação com o nível no perfil metabólico de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

109. Método para avaliar um composto, o método compreendendo:

contatar uma célula ou um indivíduo com o composto;

ionizar uma amostra da célula ou do indivíduo para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

medir o nível de um ou ambos de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

em que uma alteração em um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA na amostra obtida da célula ou do indivíduo contato com o composto em comparação com o nível em uma amostra de uma célula ou indivíduo não contatado com o composto indica que o composto é um composto que é um modulador dos níveis de ADMA ou SDMA.

110. Método de acordo com a reivindicação 109, em que a célula é uma célula de mamífero.

111. Método de acordo com a reivindicação 110, em que a célula de mamífero é uma célula de ser humano.

112. Método de acordo com a reivindicação 110 ou 111, em que uma célula é uma célula endotelial.

5 113. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 109-112, em que a célula expressa eNOS.

114. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 109-113, em que a célula é obtida de um indivíduo que tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

10 115. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 109-114, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

116. Método de acordo com a reivindicação 115, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

15 117. Método de acordo com a reivindicação 115 ou 116, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

118. Método de acordo com a reivindicação 115 ou 116, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

20 119. Método de acordo com a reivindicação 115 ou 116, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

120. Composição compreendendo dimetilarginina assimétrica (ADMA) compreendendo pelo menos um isótopo de átomo pesado.

121. Composição compreendendo dimetilarginina simétrica (SDMA) compreendendo pelo menos um isótopo de átomo pesado.

25 122. Composição compreendendo dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), em que um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado.

123. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 120-122, em que o isótopo de átomo pesado é deutério.

30 124. Kit for detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo:

um ou ambos de ADMA e SDMA, em que um ou ambos de

ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; e instruções de como detectar SDMA e ADMA.

125. Kit de acordo com a reivindicação 124, compreendendo ainda um ácido orgânico.

5 126. Kit para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo:

um ou ambos de ADMA e SDMA, em que um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; um ácido orgânico; e

10 instruções de como detectar SDMA e ADMA.

127. Kit de acordo com a reivindicação 125 ou 126, em que o ácido orgânico é ácido oxálico.

128. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 124-127, compreendendo ainda um programa de computador para detectar uma
15 ou ambas de ADMA ou SDMA.

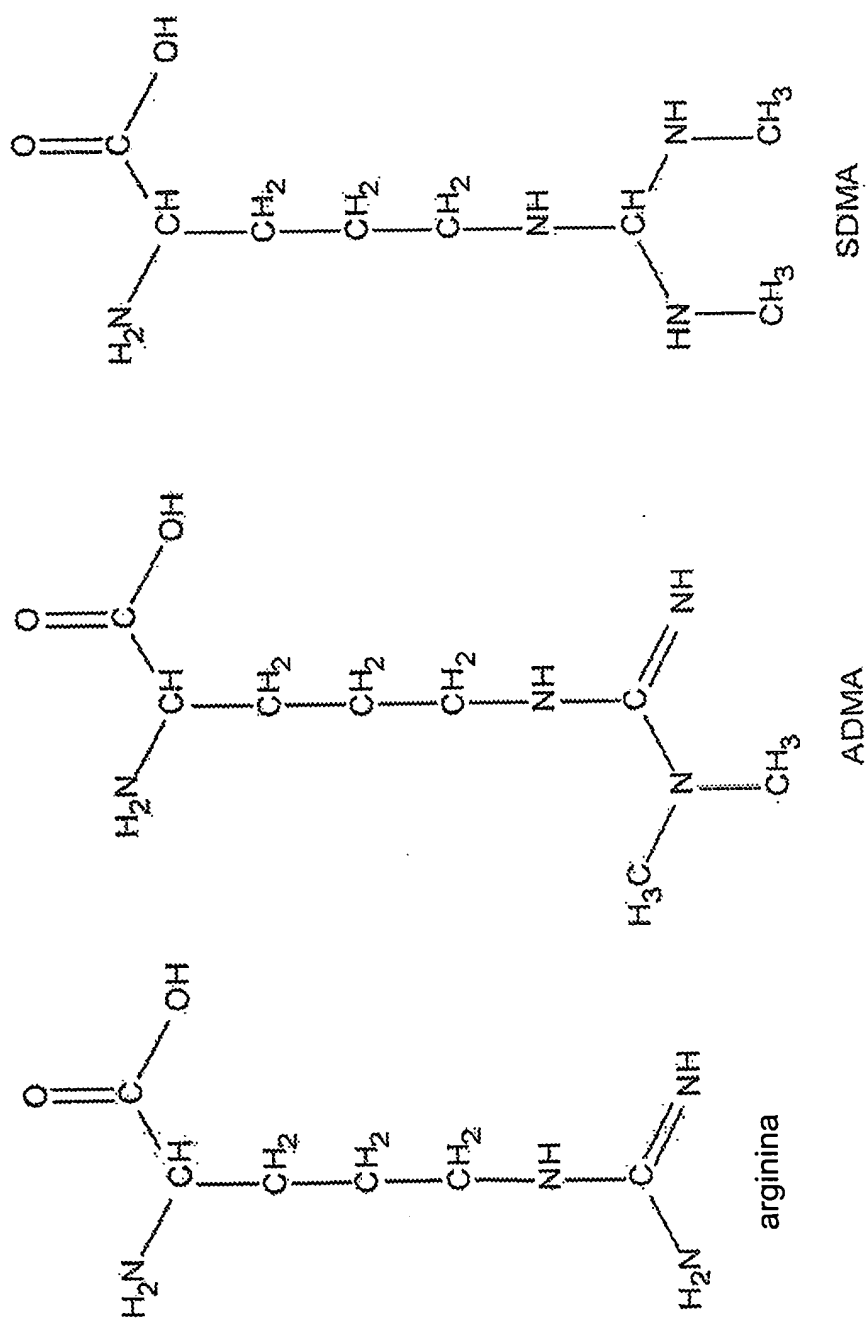
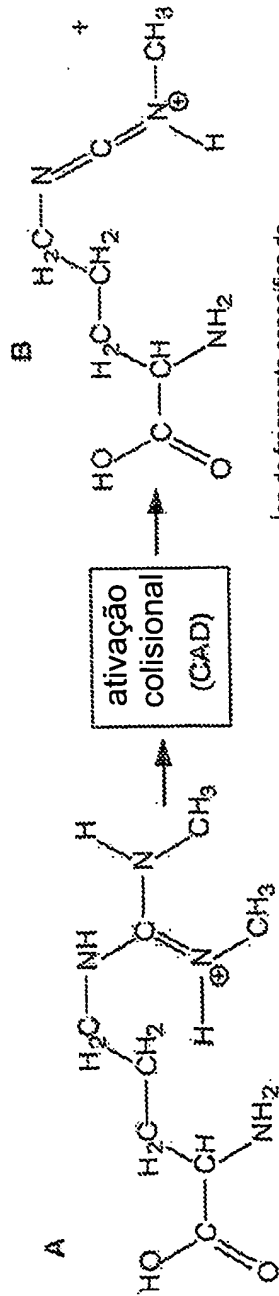
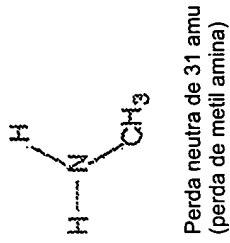


FIG. 1



Íon de fragmento específico de SDMA detectado em MS-2 m/z 172

Íon parental de SDMA selecionado em MS-1 m/z 203

filhotes de SOLO2 de 203ES+ 2.53e7

07-Dez-2005, 13: 14: 18

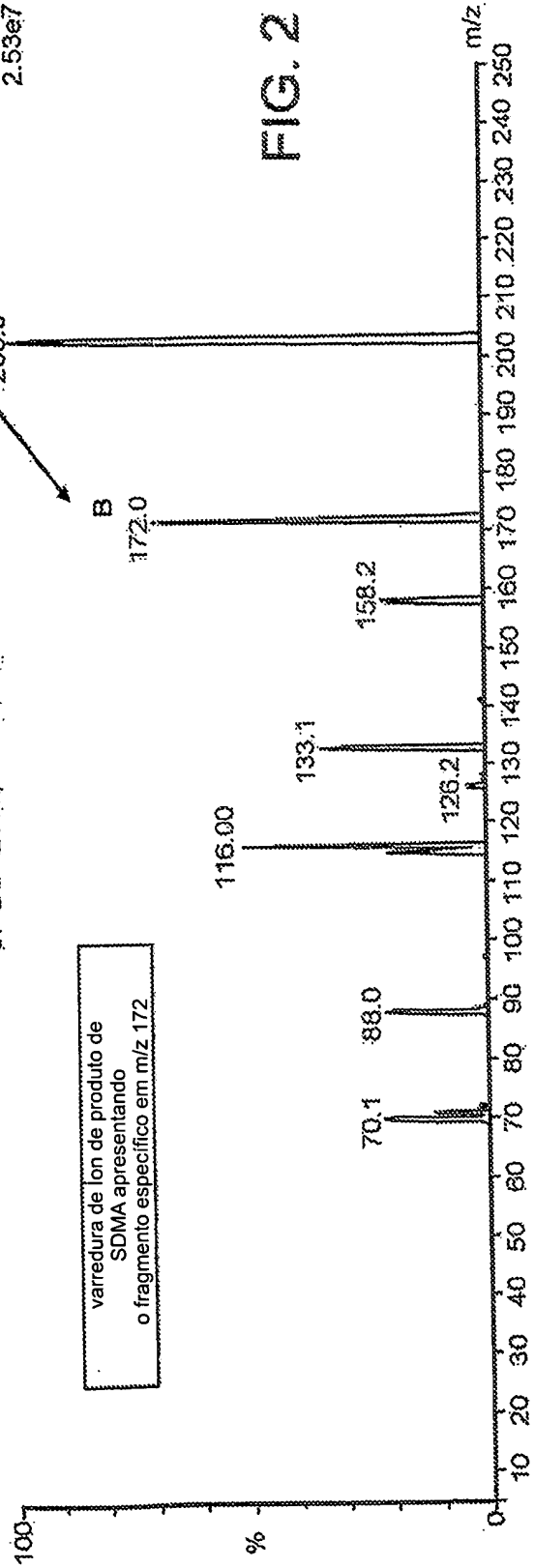
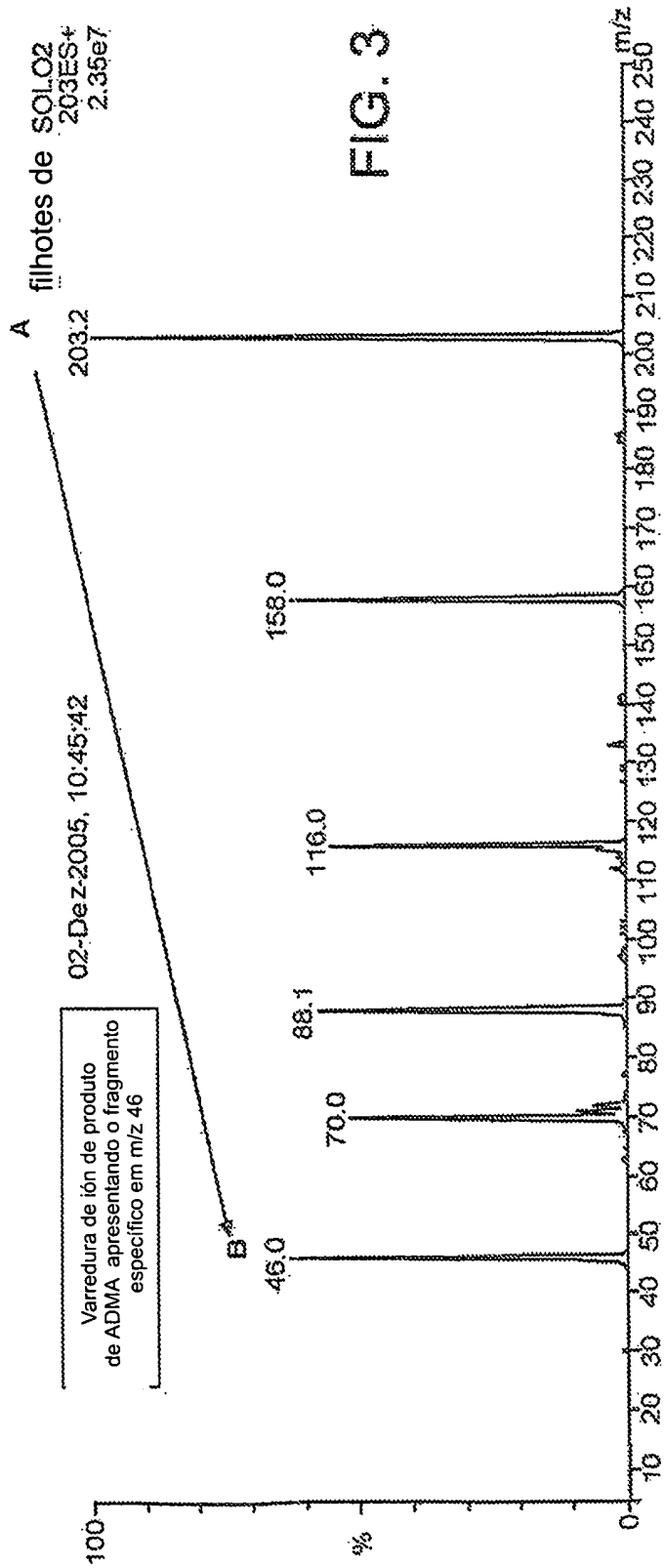
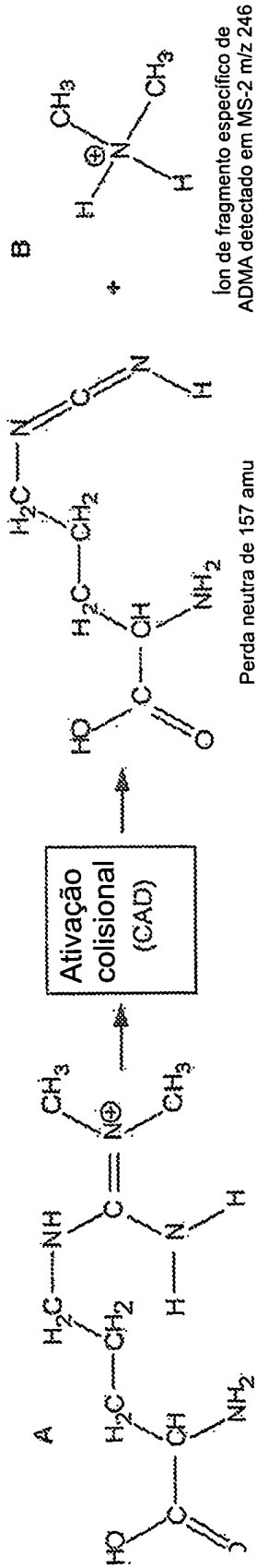


FIG. 2



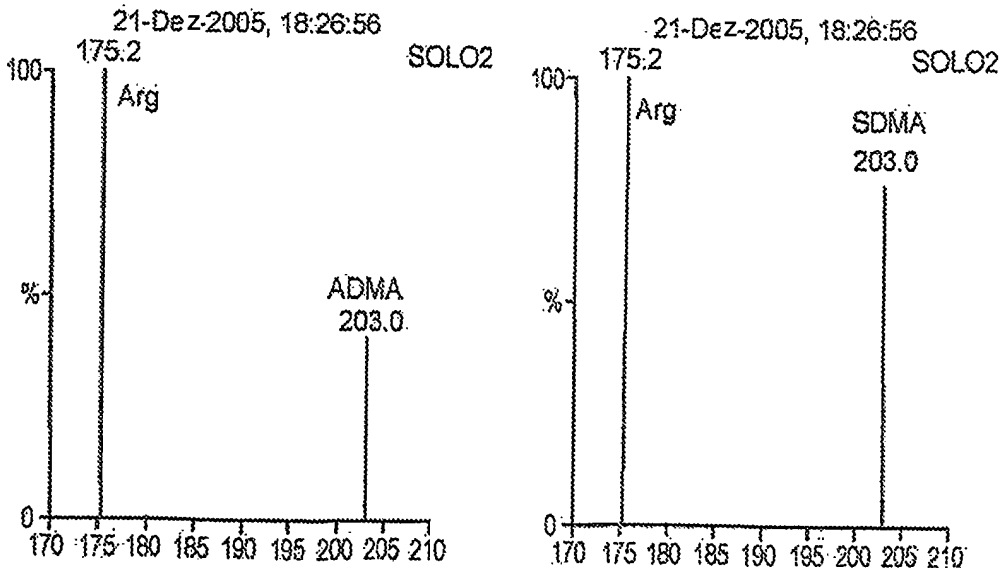
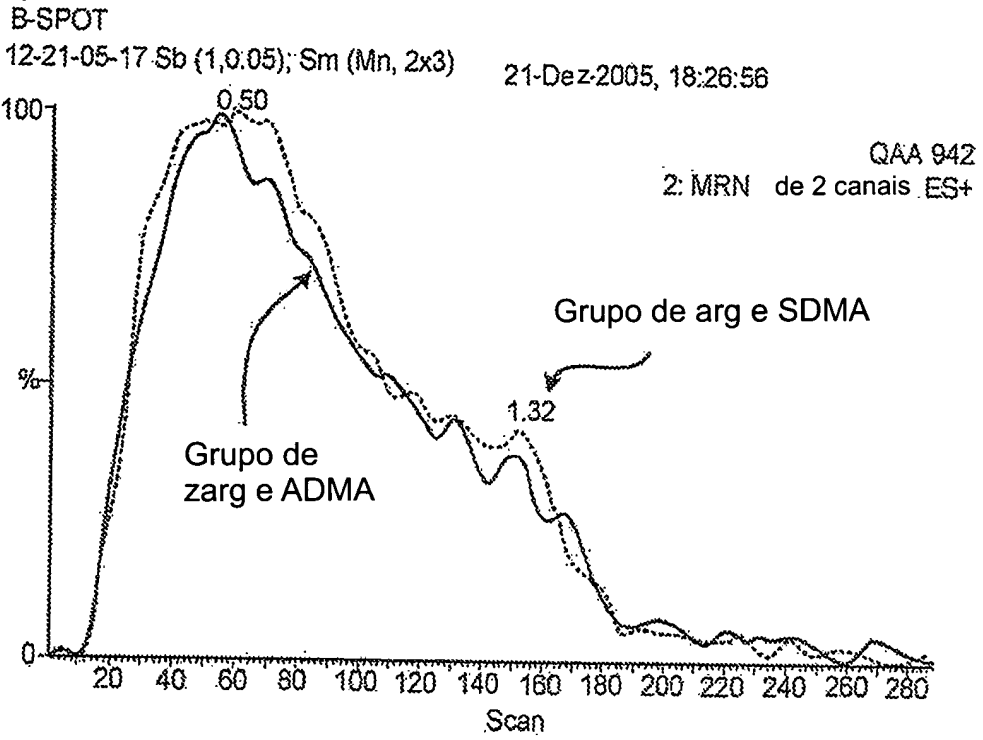


FIG. 4

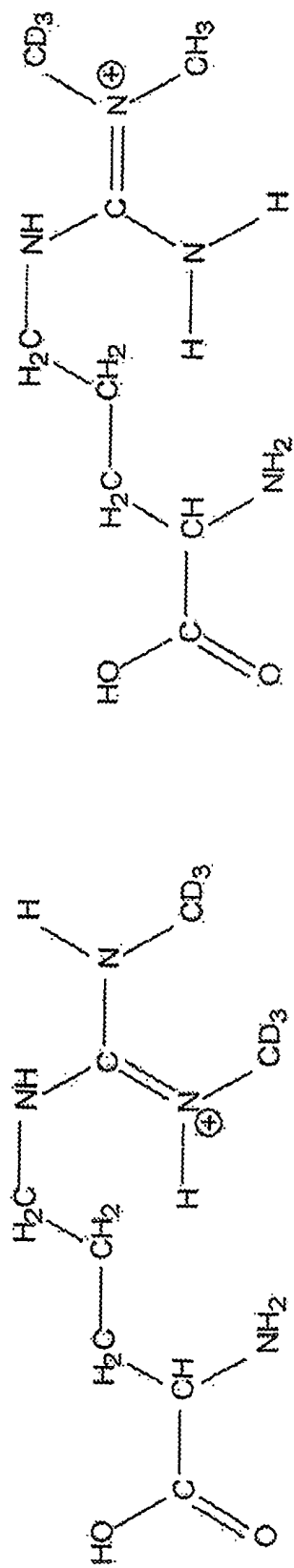


FIG. 5

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA DISTINGUIR ISÔMEROS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSA"**.

A presente invenção refere-se a métodos para distinguir isômeros de dimetilarginina. Também são apresentados métodos e composições para diagnosticar distúrbios cardiovasculares.

Novo quadro reivindicatório (total de 129 reivindicações) para
processamento na fase nacional brasileira.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para distinguir isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

5 selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção de um ou ambos do sinal m/z de um íon filhote em um m/z único para ADMA e do sinal m/z de um íon filhote em um m/z único para SDMA.

2. Método para distinguir isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

15 selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172, em que o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 indica que a amostra compreende dimetilarginina assimétrica (ADMA) e o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 indica que a amostra compreende dimetilarginina simétrica (SDMA).

25 3. Método para detectar dimetilarginina simétrica (SDMA), o método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

30 detectar dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172.

4. Método para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA), o

método compreendendo:

ionizar uma amostra para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) na amostra por detecção do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

10 6. Método para detectar isômeros de dimetilarginina, o método compreendendo:

fornecer uma amostra que inclui um ou mais padrões internos, em que pelo menos um padrão interno é um isômero de dimetilarginina contendo pelo menos um átomo pesado;

15 ionizar uma amostra para gerar íons;

selecionar íons tendo uma faixa de m/z correspondente à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina e selecionar íons em uma ou mais faixas de m/z adicionais, as faixas sendo adequadas para isolar o um ou mais padrões internos;

20 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes;
detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e/ou dimetilarginina simétrica (SDMA) na amostra por detecção de um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para ADMA e/ou um ou mais do sinal m/z de um íon filhote único para SDMA usando os íons filhotes; e

25 detectar o um ou mais padrões internos.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a faixa de m/z correspondente à faixa que é adequada para isolar isômeros de dimetilarginina é cerca de m/z 203.

30 8. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que a amostra inclui um primeiro padrão interno que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros

de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

9. Método de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que a amostra inclui um primeiro padrão interno que é um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um segundo padrão interno que é um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos iguais.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, compreendendo ainda medir o nível de SDMA na amostra.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, compreendendo ainda medir o nível de ADMA.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, compreendendo ainda medir o nível de SDMA e de ADMA.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a amostra que é ionizada é uma amostra biológica.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que a amostra biológica compreende sangue, soro, plasma, linfa, fluído amniótico, saliva, fluído cerebrospinal, fluído lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a amostra que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, em que a amostra que é ionizada contém compostos que não co-migram em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-15, em que são detectados um ou mais analitos adicionais.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

19. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

20. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

21. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que o

um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-21, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos.

5 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectroscopia de massa em série.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, em que a amostra não é quimicamente modificada antes da ionização da amostra.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, em que a amostra é quimicamente modificada antes da ionização da amostra.

15 26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-25, em que um padrão interno é adicionado à amostra antes da ionização da amostra.

27. Método de acordo com as reivindicações 1-5 ou 10-26, em que o padrão interno compreende um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos um átomo pesado.

20 28. Método de acordo com as reivindicações 1-5 ou 10-26, em que o padrão interno contém um isômero de SDMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA de referência tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA de referência têm pesos atômicos diferentes.

25 29. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, em que o nível de um sinal a cerca de m/z 46 e o nível de um sinal a cerca de m/z 172 são medidos.

30 30. Método de acordo com a reivindicação 29, compreendendo ainda determinar o resultado de uma função dependente do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172.

31. Método para diagnosticar um distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA, o método compreendendo:

- fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)
em uma faixa de m/z ,
- 5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
medir o nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote
a cerca de m/z 46 e o nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon fi-
lhote a cerca de m/z 172,
em que um nível alterado de um ou ambos de ADMA e SDMA
- 10 na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é
uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um
distúrbio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA.
32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o distúr-
bio é caracterizado por níveis de ADMA aumentados.
- 15 33. Método de acordo com a reivindicação 31 ou 32, em que o
distúrbio é caracterizado por níveis de SDMA aumentados.
34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31-
33, em que o distúrbio é caracterizado por níveis de ADMA aumentados e
níveis de SDMA aumentados.
- 20 35. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
vascular.
36. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
- 25 renal.
37. Método de acordo com a reivindicação 31, em que o distúr-
bio caracterizado por níveis alterados de ADMA ou SDMA é um distúrbio
hipertensivo.
38. Método de acordo com a reivindicação 37, em que o distúr-
bio hipertensivo é pré-eclâmpsia.
- 30 39. Método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indi-
víduo, o método compreendendo:

- fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)
em uma faixa de m/z ,
- 5 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e
medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z
de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal
 m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,
em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA
10 na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é
uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um
distúrbio vascular.
40. Método de acordo com as reivindicações 31-39, em que a
faixa de m/z é cerca de m/z 203.
- 15 41. Método de acordo com as reivindicações 31-40, em que a
amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.
42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31-
41, em que o indivíduo é um mamífero.
43. Método de acordo com a reivindicação 42, em que o mamí-
20 fero é um ser humano.
44. Método de acordo com a reivindicação 39-43, em que o dis-
túrbio vascular é um distúrbio cardiovascular.
45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-
41, em que o distúrbio vascular é um distúrbio hipertensivo.
- 25 46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-
41, em que o distúrbio vascular é selecionado do grupo que consiste em:
diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, hipertensão, e pré-
eclâmpsia.
47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-
30 46, em que o distúrbio vascular é aterosclerose.
48. Método de acordo com a reivindicação 45, em que o distúr-
bio hipertensivo é pré-eclâmpsia.

49. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, em que o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 é medido.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-48, em que a amostra de referência é de um indivíduo que não tem, não tem suspeita de ter, nem corre o risco de desenvolver um distúrbio cardiovascular.

51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31-50, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

53. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

54. Método de acordo com a reivindicação 51, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

55. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 51-54, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

56. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-55, compreendendo ainda depois de diagnosticar o indivíduo como tendo, ou correndo o risco de desenvolver, um distúrbio vascular, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que o um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes abaixadores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, em que o um ou mais anti-hipertensivos são diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa bloqueadores.

59. Método de acordo com a reivindicação 57, em que o um ou mais agentes abaixadores de colesterol são estatinas.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31-

59, em que a amostra biológica compreende sangue, soro, plasma, linfa, fluido amniótico, saliva, fluido cerebrospinal, fluido lacrimal, muco, urina, cuspe, ou suor.

5 61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 31-60, em que um padrão interno é adicionado a uma amostra biológica antes da ionização da amostra.

62. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o padrão interno compreende um isômero de dimetilarginina que inclui pelo menos um átomo pesado.

10 63. Método de acordo com a reivindicação 61, em que o padrão interno contém um isômero de SDMA tendo pelo menos um átomo pesado, e um isômero de ADMA tendo pelo menos um átomo pesado e em que os isômeros de SDMA e de ADMA têm pesos atômicos diferentes .

15 64. Método para diagnosticar pré-eclâmpsia em um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)

em uma faixa de m/z ,

20 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

25 em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, pré-eclâmpsia.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

30 66. Método de acordo com a reivindicação 64 ou 65, em que o indivíduo é um mamífero.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, em que o mamí-

fero é um ser humano.

68. Método para avaliar a resposta de um indivíduo a um agente terapêutico, o método compreendendo:

5 fornecer uma amostra biológica de um indivíduo tratado com um agente terapêutico;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

10 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

em que o mesmo nível ou um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação ao nível em uma amostra biológica obtida do indivíduo antes do tratamento é uma indicação de que o indivíduo não está respondendo ao tratamento e um nível reduzido de um ou ambos de ADMA e SDMA na amostra biológica em relação à amostra biológica obtida do indivíduo antes do tratamento é uma indicação de que o indivíduo está respondendo ao tratamento.

20 69. Método de acordo com a reivindicação 68, em que o nível de ADMA e o nível de SDMA são medidos.

70. Método de acordo com a reivindicação 69, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

25 71. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-70, em que a amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-71, compreendendo ainda: se o indivíduo não está respondendo ao tratamento, administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos diferentes.

30 73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-72, em que o indivíduo tem, ou está com suspeita de ter, um distúrbio vascular.

74. Método de acordo com a reivindicação 73, em que o distúrbio vascular é um distúrbio hipertensivo.

75. Método de acordo com a reivindicação 73, em que o distúrbio vascular é selecionado do grupo que consiste em: diabetes, hipercolesterolemia, insuficiência renal, hipertensão, e pré-eclâmpsia.

76. Método de acordo com a reivindicação 73, em que o distúrbio vascular é um distúrbio cardiovascular.

77. Método de acordo com a reivindicação 76, em que o distúrbio cardiovascular é aterosclerose.

78. Método de acordo com a reivindicação 74, em que o distúrbio hipertensivo é pré-eclâmpsia.

79. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 72-78, em que o um ou mais agentes terapêuticos são um ou mais anti-hipertensivos, um ou mais agentes abaixadores de colesterol, ou um ou mais beta bloqueadores.

80. Método de acordo com a reivindicação 79, em que o um ou mais anti-hipertensivos são diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, vasodilatadores, ou alfa bloqueadores.

81. Método de acordo com a reivindicação 79, em que o um ou mais agentes abaixadores de colesterol são estatinas.

82. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-81, compreendendo ainda se o indivíduo estiver respondendo ao tratamento, continuar a administrar o mesmo agente terapêutico ao indivíduo.

83. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 68-82, em que o indivíduo é um mamífero.

84. Método de acordo com a reivindicação 83, em que o mamífero é um ser humano.

85. Método para fornecer um perfil metabólico para um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;
ionizar a amostra biológica para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z)

em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

detectar uma ou ambas do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e o sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172; e

5 fornecer um perfil metabólico do indivíduo que inclui um parâmetro que é função de um ou ambos do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 46 e do sinal m/z de íon filhote a cerca de m/z 172.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, em que em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

10 87. Método de acordo com a reivindicação 85 ou 86, em que a amostra biológica que é ionizada contém compostos além da dimetilarginina.

88. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85-87, em que o nível do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e da presença do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 são medidos.

15 89. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85-88, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

20 91. Método de acordo com a reivindicação 89 ou 90, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

92. Método de acordo com a reivindicação 89 ou 90, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

25 93. Método de acordo com a reivindicação 89 ou 90, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 89-93, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

30 95. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 89-94, em que o indivíduo é um mamífero.

96. Método de acordo com a reivindicação 95, em que o indivíduo é um ser humano.

97. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 89-96, em que o indivíduo é um indivíduo com suspeita de ter um distúrbio cardiovascular.

5 98. Perfil metabólico para um indivíduo obtido pelo método compreendendo:

fornecer uma amostra biológica de um indivíduo;

ionizar a amostra biológica para gerar íons;

selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

10 fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e

medir um ou ambos do nível de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172 para obter o perfil metabólico do indivíduo.

15 99. Método de acordo com a reivindicação 98, em que a faixa de m/z é cerca de m/z 203.

100. Método de acordo com a reivindicação 98 ou 99, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

20 101. Método de acordo com a reivindicação 100, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

102. Método de acordo com a reivindicação 99 ou 100, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

25 103. Método de acordo com a reivindicação 99 ou 100, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

104. Método de acordo com a reivindicação 99 ou 100, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

30 105. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 99-104, em que o um ou mais analitos adicionais são medidos usando espectrometria de massa.

106. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98-105, em que o indivíduo é um mamífero.

107. Método de acordo com a reivindicação 106, em que o indivíduo é um ser humano.

108. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 98-107, em que o indivíduo é um indivíduo com suspeita de ter um distúrbio vascular.

109. Método para diagnosticar um distúrbio vascular em um indivíduo, o método compreendendo:

fornecer o perfil metabólico como definido na reivindicação 98; e comparar um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA no perfil metabólico com o nível de ADMA e o nível de SDMA em um perfil metabólico de referência,

em que um nível elevado de um ou ambos de ADMA e SDMA em comparação com o nível no perfil metabólico de referência é uma indicação de que o indivíduo tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

110. Método para avaliar um composto, o método compreendendo:

contatar uma célula ou um indivíduo com o composto;
ionizar uma amostra da célula ou do indivíduo para gerar íons;
selecionar íons tendo uma proporção de massa para carga (m/z) em uma faixa de m/z ,

fragmentar os íons selecionados para produzir íons filhotes; e medir o nível de um ou ambos de ADMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 46 e do nível de SDMA em função do sinal m/z de um íon filhote a cerca de m/z 172,

em que uma alteração em um ou ambos do nível de ADMA e do nível de SDMA na amostra obtida da célula ou do indivíduo contato com o composto em comparação com o nível em uma amostra de uma célula ou indivíduo não contatado com o composto indica que o composto é um composto que é um modulador dos níveis de ADMA ou SDMA.

111. Método de acordo com a reivindicação 110, em que a célula é uma célula de mamífero.

112. Método de acordo com a reivindicação 111, em que a célula de mamífero é uma célula de ser humano.

113. Método de acordo com a reivindicação 111 ou 112, em que uma célula é uma célula endotelial.

5 114. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 110-113, em que a célula expressa eNOS.

115. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 110-114, em que a célula é obtida de um indivíduo que tem, ou corre o risco de desenvolver, um distúrbio vascular.

10 116. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 110-115, compreendendo ainda medir um ou mais analitos adicionais.

117. Método de acordo com a reivindicação 116, em que o um ou mais analitos adicionais são biomoléculas metabólicas.

15 118. Método de acordo com a reivindicação 116 ou 117, em que o um ou mais analitos adicionais são selecionados do grupo que consiste em: citrulina, dimetilamina, arginina, ornitina, homocisteína, e creatina.

119. Método de acordo com a reivindicação 116 ou 117, em que o um ou mais analitos adicionais são aminoácidos.

20 120. Método de acordo com a reivindicação 116 ou 117, em que o um ou mais analitos adicionais são acilcarnitinas.

121. Composição compreendendo dimetilarginina assimétrica (ADMA) compreendendo pelo menos um isótopo de átomo pesado.

122. Composição compreendendo dimetilarginina simétrica (SDMA) compreendendo pelo menos um isótopo de átomo pesado.

25 123. Composição compreendendo dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), em que um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado.

124. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 121-123, em que o isótopo de átomo pesado é deutério.

30 125. Kit para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo:

um ou ambos de ADMA e SDMA, em que um ou ambos de

ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; e instruções de como detectar SDMA e ADMA.

126. Kit de acordo com a reivindicação 125, compreendendo ainda um ácido orgânico.

5 127. Kit para detectar dimetilarginina assimétrica (ADMA) e dimetilarginina simétrica (SDMA), o kit compreendendo:

um ou ambos de ADMA e SDMA, em que um ou ambos de ADMA e SDMA compreendem pelo menos um isótopo de átomo pesado; um ácido orgânico; e

10 instruções de como detectar SDMA e ADMA.

128. Kit de acordo com a reivindicação 126 ou 127, em que o ácido orgânico é ácido oxálico.

129. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações 125-128, compreendendo ainda um programa de computador para detectar uma
15 ou ambas de ADMA ou SDMA.