

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 349**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 30/72** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2007 E 07860283 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2098859**

54 Título: **Método de cuantificación de un péptido y una proteína**

30 Prioridad:

**28.12.2006 JP 2006356161**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.06.2013**

73 Titular/es:

**MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD. (100.0%)  
1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi  
Hokkaido 0650043, JP**

72 Inventor/es:

**MORITA, YOSHIKAZU;  
ONO, AIKO;  
SERIZAWA, ATSUSHI y  
KAWAKAMI, HIROSHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 409 349 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de cuantificación de un péptido y una proteína.

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de medición que puede cuantificar una proteína o un péptido específico, contenido en una cantidad traza, con una alta precisión y facilidad, e incluso sin utilizar ningún reactivo costoso.

10

**Técnica anterior**

Se sabe que el método ELISA, que utiliza un anticuerpo contra una proteína específica, es un método de cuantificación de una proteína específica contenida en una cantidad traza en una muestra de medición. Sin embargo, para preparar el anticuerpo, es necesario preparar un péptido o una proteína muy puros que sirvan como un antígeno y preparar un antisuero administrando el péptido o la proteína a un animal, y el procedimiento es por tanto muy dificultoso. Además, un anticuerpo puede reaccionar con una proteína altamente homóloga y por tanto es necesario examinar si solo se mide una proteína específica. Adicionalmente, la reactividad de una proteína con un anticuerpo varía debido a la desnaturalización térmica y similar. Por lo tanto, en un producto esterilizado, tal como un alimento, es imposible determinar el contenido proteico con una alta precisión incluso si se mide una proteína específica mediante el método ELISA como se ha descrito anteriormente.

Los métodos de análisis cuantitativo para proteínas, que se han desarrollado rápidamente en los últimos años, incluyen un método que utiliza espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida de alto rendimiento (en lo sucesivo en el presente documento denominado LC/MS/MS). Se ha desarrollado un método para identificar una proteína que implica realizar la separación de una muestra que contiene muchos tipos de proteínas por electroforesis bidimensional y medir los péptidos mediante LC/MS/MC obtenidos mediante un tratamiento enzimático de las manchas resultantes. Si la medición se realiza mediante LC/MS/MC, existen las siguientes ventajas: es posible reducir las etapas de tratamiento previo porque no se necesita la derivatización, necesaria en una GC/MS (Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas, por las siglas en inglés *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*) convencional; y es posible medir un compuesto polimérico tal como una proteína o un péptido. En un método de identificación de una proteína por LC/MS/MS, la identificación de la puede realizarse: determinando la masa de un fragmento peptídico producido a partir de una proteína de la muestra utilizando una proteasa específica mediante la primera MS; fragmentar el péptido; realizar la segunda MS para predecir la secuencia de aminoácidos del péptido y comparar con una base de datos todas las secuencias peptídicas predichas.

Al igual que el método de cuantificación de una proteína mediante LS/MS/MS, se ha descrito un método que implica marcar con deuterio un aminoácido en un péptido diana y medir el aminoácido (véase, por ejemplo, el Documento No de Patente 1). Sin embargo, en este método, como sustancia patrón interna, se utiliza el aminoácido marcado con deuterio y dado que marcar los aminoácidos con deuterio es muy costoso y poco habitual, la síntesis peptídica utilizando el método puede limitar su aplicación.

Además, se describe un método de detección mediante LC/MS/MS de una proteína derivada de animales en una mezcla compleja (véase, por ejemplo, el documento de Patente 1). Sin embargo, este método presenta el inconveniente de eliminar sustancias de interferencia y conservar el nivel de contaminantes a un bajo nivel y también requiere procedimientos engorrosos.

Se requiere un método de medición que pueda cuantificar una proteína o un péptido específico contenido en una cantidad traza con una alta precisión y facilidad, incluso sin utilizar ningún reactivo costoso.

[Documento de Patente 1] JP 2005-513481 B  
 [Documento No de Patente 1] David R. Barnidge et al., *Analytical Chemistry*, Vol. 75, Nº 3, 2003  
 C. Carlsson et al., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 34, Nº 2, 2004 describen la determinación de gabapentina por espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida utilizando, como patrón interno, un isómero estructural de gabapentina, en el que la gabapentina y el patrón interno tienen la misma masa monoisotópica exigida, que sin embargo puede detectarse individualmente ya que tiene distintos modelos de fragmentación.

**Descripción de la invención**

60

**Problemas a resolver por la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de medición que pueda cuantificar una proteína o un péptido con facilidad y mayor precisión y sin utilizar ningún reactivo costoso.

### Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención han buscado un método de medición que pueda cuantificar una proteína o un péptido con una mayor precisión. Como resultado, los autores de la presente invención han descubierto el siguiente método. En el caso de medir una proteína A, primero, la proteína A se descompone con una enzima para producir un péptido B. Una parte de la secuencia de aminoácidos del péptido B se reemplaza para producir un péptido C, y la medición se realiza por LC/MS/MS utilizando, como patrón interno, el péptido C. Mientras tanto, en el caso en el que la proteína A esté separada de una muestra de medición y después se descomponga con una enzima, para corregir la tasa de recuperación en la operación de separación, se requiere una proteína que tenga propiedades similares a las de la proteína A como patrón interno para la proteína A. Por lo tanto, una proteína D que es más similar a la proteína A, pero que no es la proteína A, puede obtenerse reemplazando la secuencia del péptido B en la proteína A mediante la secuencia del péptido C. Los autores de la presente invención han descubierto que el péptido B puede medirse de la misma manera que en el caso de utilizar el péptido C utilizando, como patrón interno, la proteína D. Como se ha descrito anteriormente, los autores de la presente invención han descubierto que una proteína o un péptido a medir puede cuantificarse mediante LC/MS/MS utilizando, como patrón interno, un péptido obtenido cambiando una parte del orden de unión de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de un péptido específico en una proteína a medir sin cambiar la mayoría de las propiedades del péptido original y este hallazgo por tanto permite completar la presente invención.

Cambiando el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos en un péptido específico de una proteína a medir, el péptido específico en la proteína a medir y el péptido patrón interno se comportan como sustancias que tienen el mismo peso molecular en la primera MS, y los dos péptidos pueden separarse basándose en la diferencia en las secuencias de aminoácidos en la segunda MS. Basándose en la proporción de las intensidades de señal de los péptidos respectivos determinadas por la segunda MS, la concentración de la proteína a medir puede cuantificarse. El método de medición de la presente invención puede mejorar la precisión de la medición en comparación con una MS de una sola etapa porque la selección basada en la masa se realiza en dos etapas. Adicionalmente, el método puede confirmar que sólo se mide una proteína específica porque la información en la secuencia de aminoácidos puede obtenerse en cualquier momento mediante la segunda MS. Mientras tanto, un método convencional en el que, como patrón interno, se utiliza un péptido que incluye un aminoácido marcado con deuterio, se realiza cambiando al mismo tiempo la medición de un péptido diana y la medición del péptido patrón interno en la primera MS, dando como resultado la disminución de la precisión en la medición. Por otro lado, el método de la presente invención puede realizarse con una alta precisión porque el peso molecular del péptido diana es el mismo que el del péptido patrón interno. Como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención puede realizarse únicamente cambiando el orden de unión de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos y por tanto el método de análisis es fácil. Además, la medición puede realizarse sin utilizar ningún reactivo costoso. Además, el péptido patrón interno puede prepararse utilizando un sintetizador peptídico existente, y por tanto, en cuanto a costes, el método de la presente invención tiene una ventaja sobre el método de medición convencional.

Una proteína obtenida reemplazando la secuencia de aminoácidos se prepara muy fácilmente reemplazando la secuencia a nivel genético de acuerdo con el desarrollo de la tecnología genética. Si como patrón interno puede utilizarse la proteína que tiene un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, puede conseguirse una medición con mayor precisión porque la proteína se comporta como un patrón interno casi de la misma manera a como lo hace una proteína que va a medirse.

La presente invención se refiere a: un método de cuantificación de un péptido a medir mediante LC/MS/MS utilizando, como sustancia patrón interno, un péptido que tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido a medir; un método de cuantificación de una proteína a medir mediante LC/MS/MS utilizando, como sustancia patrón interno, un péptido que tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína a medir; y un método de cuantificación de una proteína a medir mediante LC/MS/MS utilizando, como sustancia patrón interno, una proteína que tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína a medir. En la presente invención, como péptido se define un polímero de aminoácidos que no puede escindirse con una enzima, tal como tripsina, utilizada en la medición. Mientras que, en la presente invención, como proteína se define un polímero de aminoácidos que puede escindirse con una enzima.

Por lo tanto, la presente invención comprende la siguiente constitución.

#### 1. Un método de cuantificación de una proteína o un péptido mediante LC/MS/MS que comprende

- a) la etapa de descomponer enzimáticamente la proteína, en caso de que sea una proteína lo que vaya a cuantificarse;
  - b) utilizar, como sustancia patrón interno, para efectuar la LC/MS/MS un péptido que es el péptido a cuantificar, o un péptido que proviene de la descomposición de la etapa a), pero que tiene un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos;
- en el que los péptidos pueden ionizarse durante la fase MS del método.

2. Un método de cuantificación de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, pero en el que la sustancia patrón interna utilizada para efectuar la LC/MS/MS es, en cambio, una proteína que comprende el péptido de la sustancia patrón interna de la etapa b) de la reivindicación 1.

5 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la proteína a medir es cualquiera de lactoferrina bovina, lactoperoxidasa bovina, angiogenina bovina y cistatina C bovina.

### Efecto de la invención

10 Cambiando el orden de unión a nivel genético, puede prepararse fácilmente una proteína o un péptido que tenga un cambio en el orden de unión de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos. La proteína o el péptido que, como patrón interno, tiene un cambio en el orden de unión de aminoácidos, se piensa que se comporta casi de la misma manera que una proteína a medir y por tanto puede conseguirse una medición con mayor precisión. En el método de la presente invención, la precisión y especificidad pueden mejorarse en comparación con los métodos de  
 15 MS de una sola etapa porque la selección basada en la masa se realiza en dos etapas. Además, el método puede confirmar que solo se mide una proteína específica porque la información en la secuencia de aminoácidos puede obtenerse en cualquier momento mediante la segunda MS. Mientras que, en un método convencional, en el que como patrón interno, se usa un péptido que incluye un aminoácido marcado con deuterio, la segunda MS debe realizarse cambiando al mismo tiempo la medición en un péptido diana y la medición del péptido patrón interno,  
 20 dando como resultado la disminución de la precisión de la medición. Por otro lado, en el método de la presente invención, la medición con alta precisión puede realizarse porque la masa del péptido diana es la misma que la del péptido patrón interno. Como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención puede realizarse cambiando solo el orden de unión de aminoácidos en una secuencia de aminoácidos y por tanto el método de análisis es fácil. Además, la medición puede realizarse sin utilizar ningún reactivo caro y poco habitual. Además, el  
 25 péptido patrón interno puede prepararse usando un sintetizador peptídico asistente y por tanto, el método de la presente invención tiene una ventaja sobre el método de medición convencional en cuanto a costes.

### Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 ilustra la relación entre la proporción de concentración del péptido a medir (LFP01) y el péptido patrón interno (LFP02) y la proporción del área (Ejemplo 6) en ese momento.

### Mejor modo para realizar la invención

35 La presente invención se refiere a: un método de cuantificación de un péptido a medir mediante LC/MS/MS usando un péptido que, como sustancia patrón interno, tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido a medir; un método de cuantificación de una proteína a medir mediante LC/MS/MS utilizando un péptido que, como sustancia patrón interno, tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína a medir; y un método de cuantificación de una proteína  
 40 a medir mediante LC/MS/MS utilizando, como sustancia patrón interna, una proteína que tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína a medir. En los métodos de la presente invención, primero se determina un péptido patrón interno que tenga un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido a medir y el péptido determinado se prepara.

45 En la determinación del péptido a usar como un patrón interno, el péptido que cumple las siguientes condiciones es apropiado.

(1) El péptido se produce solubilizando una proteína con un desnaturizante que pueda permitir una reacción enzimática de la proteína, descomponer la proteína con una endopeptidasa, preferentemente tal como tripsina o lisil endopeptidasa, que tiene una alta especificidad por un aminoácido específico. Esto es porque se desea una peptidasa que tenga una alta especificidad ya que si una proteína se descompone con una peptidasa que tiene baja especificidad en un sistema de muestras complejo, un cambio en la eficacia de reacción puede producir un cambio en la cantidad producida del péptido a medir.  
 50

(2) Siempre que el péptido se ionice mediante LC/MS, puede usarse cualquier péptido del apartado anterior (1). Entre los péptidos obtenidos por escisión de una proteína, es preferible un péptido que presente una alta eficacia de ionización y una alta sensibilidad de detección cuando se detecta mediante LC/MS. Esto es porque si la medición diana se define para un péptido que se detecta a la mayor sensibilidad, existe el temor de que el péptido no pueda cumplir la siguiente condición (3), y por lo tanto todos los péptidos que puedan detectarse se consideran como la diana.  
 55  
 60

(3) Adicionalmente, para usar el péptido como un patrón interno, puede usarse cualquier péptido siempre que tenga un cambio en parte de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos del péptido descrito en el apartado (2) anterior. Deseablemente, se prefiere que el péptido eluya al mismo tiempo de retención en la separación mediante LC/MS. Esto se debe a que la medición puede realizarse frecuentemente usando, como patrón interno, una sustancia que tenga diferente tiempo de retención o una sustancia completamente diferente, por lo tanto, el  
 65

tiempo de retención no tiene por que ser necesariamente el mismo, si bien la ionización y la fragmentación en MS/MS se realiza preferentemente al mismo tiempo.

En la determinación del péptido a usar como patrón interno, es deseable el péptido que cumpla las siguientes condiciones, además de las condiciones anteriormente descritas.

- . El péptido no está fosforilado o modificado por una cadena glucídica.
- . El péptido no contiene cisteína.
- . En la cromatografía, el péptido no se eluye inmediatamente después de comenzar y justo después del punto final.
- . Es poco probable que el péptido produzca iones polivalentes.

Adicionalmente, la medición se realiza preferentemente al mismo tiempo que se satisfacen las siguientes observaciones:

(A) La medición se realiza más preferentemente usando, como patrón interno, una proteína a medir que tenga una secuencia parcial que es la misma que la péptido descrito en el apartado (3) anterior. Esto porque las proteínas que tienen un cambio en una secuencia parcial tienen el mismo peso molecular y presentan casi el mismo comportamiento en la electroforesis con una alta capacidad de separación y similar, porque la medición en un sistema complejo a menudo puede requerir una etapa de extracción y similar, pero la tasa de recuperación del 100% no es realmente difícil. Obsérvese que, es preferible que la proteína a medir y la proteína utilizada como un patrón interno no sean preferentemente diferentes a efectos de un tratamiento enzimático o similar.

(B) Los péptidos producidos por MS/MS son dianas para la medición La diana de medición es preferentemente un péptido que puede detectarse a una mayor sensibilidad y que tiene un peso molecular diferente al del péptido a medir.

Después de la determinación de un péptido patrón interno que tiene un cambio en el enlace de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido a medir, se prepara el péptido patrón interno. El péptido se prepara mediante un método general tal como síntesis peptídica en fase sólida o similar. Además, para la preparación del péptido pueden usarse sintetizadores peptídicos existentes tales como ABI431A (método Boc en fase sólida), ABI433A (método Fmoc en fase sólida) y similar. El método de síntesis peptídica puede ser un método que generalmente se realiza cuando el péptido se sintetiza usando un sintetizador peptídico.

Cambiando el orden de unión de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un péptido específico en una proteína a medir, el péptido específico en la proteína a medir y el péptido patrón interno se comportan como sustancias que tiene el mismo peso molecular en la primera MS, y los péptidos se separan basándose en la diferencia en las secuencias de aminoácidos en la segunda MS. Basándose en la proporción de intensidades de señal dependiendo de cada péptido en la segunda MS, se cuantifica la concentración de la proteína a medir. En la presente invención, la cuantificación mediante LC/MS/MS se realiza como se indica más adelante. Sin embargo, el método es un método general cuando se usa LC/MS/MS y no es un método especial para realizar la presente invención. La separación de los péptidos se realiza mediante elución en gradiente usando un sistema HPLC. Los péptidos se separaron usando el sistema HPLC MAGIC 2002 con una columna (MAGIC C18 equipada con un captador peptídico 5  $\mu$ l (ID 0,2 mm  $\times$  50 mm)) a un caudal de 2  $\mu$ l/min. Se realizó elución en gradiente durante 20 minutos utilizando la solución A (acetonitrilo al 2%-ácido fórmico al 0,05%) y la solución B (acetonitrilo al 90%-ácido fórmico al 0,05%) dentro del intervalo del 2% al 65% de solución B. Los iones a medir eran ión parental: m/z 853,8, ión diana MS/MS: m/z 876,4 e ión diana patrón interno: m/z 862,4 y el intervalo diana de MS/MS fue de 860,9 a 877,9. La MS se realizó usando LCQ Advantage.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describe con más detalle a modo de ejemplos y ejemplos de ensayo. Sin embargo, las descripciones son meras ilustraciones y la presente invención no se limita a estos ejemplos. Obsérvese que los aminoácidos subrayados en los péptidos patrón interno descritos en los ejemplos son los aminoácidos reemplazados. El término "SRM (control de la reacción seleccionada, del inglés *selecting reaction monitoring*)" descrito en los ejemplos se refiere a la medición de un ión secundario producido mediante LC/MS/MS como una diana y forma un par con el término "SIM (control de iones seleccionados, *selected ion monitoring*)", que se refiere a la medición de un ión primario producido mediante LC/MS como una diana. La expresión "diana SRM" se refiere a un péptido que se mide realmente. En la primera MS se detecta un péptido escindido por una enzima y el péptido se divide a una determinada posición de longitud que, en la segunda MS, tiene longitudes específicas por energía eléctrica. Los péptidos resultantes se miden para calcular valores. La secuencia con una sola línea subrayada en la diana SRM representa una parte de una secuencia de aminoácidos que se mide como un ión secundario producido como una diana a medir. El valor "m/z" se calcula dividiendo la masa (m) de un ión realmente observado en un detector de LC/MS entre el número de sus cargas (z). Aunque el estado de carga de cada péptido es diferente en un aparato MS, la masa real de un péptido (peso molecular M) se calcula mediante la siguiente expresión matemática:

$$M = ((m/z)-1)*z$$

Obsérvese que la expresión “mono” se refiere a una masa monoisotópica (peso molecular) que se obtiene calculando una fórmula composicional a partir de la masa isotópica del isótopo de origen natural más abundante.

Ejemplo 1

5

(Preparación del péptido patrón interno lactoferrina bovina)

En la cuantificación de una lactoferrina bovina, se determinó un péptido patrón interno que tenía un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido y después el péptido patrón interno se preparó de la siguiente manera utilizando un sintetizador peptídico (método Fmoc en fase sólida (ABI433A)).

10

. Medición del péptido objeto (LFP01); PM 1305,645 (mono); m/z 653,83 mono +2

Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys fórmula (1)

15

. Diana SRM; m/z 876,4 mono +1

Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys fórmula (1)

20

Tiempo de retención (min); 10,29

Péptido patrón interno (LFP02); PM 1305,645 (mono), m/z 653,83 mono +2

Glu Thr Thr Leu Phe Glu Asn Val Pro Glu Lys fórmula (2)

25

Diana SRM; m/z 876,4 mono +1

Glu Thr Thr Leu Phe Glu Asn Val Pro Glu Lys fórmula (2)

30

Tiempo de retención (min); 10,28

Ejemplo 2

(Preparación 1 del péptido patrón interno lactoperoxidasa bovina)

35

En la cuantificación de una lactoperoxidasa bovina, se determinó un péptido patrón interno que tenía un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido y después el péptido patrón interno se preparó de la siguiente manera utilizando un sintetizador peptídico (método Fmoc en fase sólida (ABI433A)).

40

. Medición del péptido objeto 1; PM 1497,765 (mono); m/z 749,89 mono +2

**Ser Trp Glu Val Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro**

**Leu Val Lys** fórmula (3)

45

diana SRM; m/z 652,4 mono +1

**Ser Trp Glu Val Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro**

**Leu Val Lys** fórmula (3)

50

Tiempo de retención (min); 12,10

. Péptido patrón interno 1

**Ser Trp Glu Leu Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro**

55

**Val Val Lys** fórmula (4)

Diana SRM; m/z 638,4 mono +1

60

**Ser Trp Glu Leu Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro**

**Val Val Lys** fórmula (4)

Tiempo de retención (min): 12,15

Ejemplo 3

(Preparación 2 del péptido patrón interno lactoperoxidasa bovina)

5 En la cuantificación de una lactoperoxidasa bovina, se determinó un péptido patrón interno que tenía un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido, y después el péptido patrón interno se preparó de la siguiente manera utilizando un sintetizador peptídico (método Fmoc en fase sólida (ABI433A)).

. Medición del péptido objeto 2; PM 1466,799 (mono); m/z 734,408 mono +2

10 **Ile His Gly Phe Asp Leu Ala Ala Ile Asn Leu**  
**Gln Arg** **fórmula (5)**

diana SRM; m/z 754,4 mono +1

15 **Ile His Gly Phe Asp Leu Ala Ala Ile Asn Leu**  
**Gln Arg** **fórmula (5)**

20 Tiempo de retención (min); 11,42  
 Péptido patrón interno 2; PM 1466,799 (mono), m/z 734,408 mono +2

**Ile His Ala Phe Asp Leu Ala Gly Ile Asn Leu**  
**Gln Arg** **fórmula (6)**

Diana SRM; m/z 768,4 mono +1

30 **Ile His Ala Phe Asp Leu Ala Gly Ile Asn Leu**  
**Gln Arg** **fórmula (6)**

Tiempo de retención (min): 11,36

35 Ejemplo 4

(Preparación del péptido patrón interno angiogenina bovina)

40 En la cuantificación de una angiogenina bovina, se determinó un péptido patrón interno que tenía un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido, y después el péptido patrón interno se preparó de la siguiente manera utilizando un sintetizador peptídico (método Fmoc en fase sólida (ABI433A)).

. Medición del péptido objeto; PM 1534,757 (mono); m/z 768,386 mono +2

45 **Tyr Ile His Phe Asp Thr Gln His Tyr Asp Ala**  
**Lys** **fórmula (7)**

diana SRM; m/z 1122,6 mono +1

50 **Tyr Ile His Phe Asp Thr Gln His Tyr Asp Ala**  
**Lys** **fórmula (7)**

55 Tiempo de retención (min); 9,99

. Péptido patrón interno; PM 1534,757 (mono), m/z 768,386 mono +2

60 **Tyr Ala His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ile**  
**Lys** **fórmula (8)**



En la Fig. 1, el eje horizontal representa la proporción molar del péptido a medir (LFP01) y del péptido patrón interno (LFP02), y el eje vertical representa la proporción de los péptidos respectivos determinado por LC/MS/MS. Los resultados revelan que la linealidad se mantiene en el intervalo de 2.000 veces. Además, se observó que la pendiente era aproximadamente de 1. A partir de los resultados anteriores, se observó que el péptido a medir y el péptido patrón interno presentaban casi el mismo comportamiento en reacciones después de ionización, es decir, se observó que el péptido a medir y el péptido patrón interno tenían casi la misma proporción de ionización y tasa de producción de fragmentos.

[Tabla 1]

	LFP01 [fmol/μl]	LFP02 [fmol/μl]	Proporción de conc. 01/02	Área		Área/proporción 01/02
				LFP01	LFP02	
1	0,244141	10	0,0244141	83598	2571729	0,032507
2	0,488281	10	0,0488281	107313	1654035	0,06488
3	0,976563	10	0,0976563	151835	1226603	0,123785
4	1,953125	10	0,1953125	349436	1580818	0,221048
5	3,90625	10	0,390625	716557	2158181	0,332019
6	7,8125	10	0,78125	124167	232943	0,533036
7	15,625	10	1,5625	1036283	920833	1,125376
8	31,25	10	3,125	3568835	1837996	1,941699
9	62,5	10	6,25	19354949	3194882	6,05811
10	125	10	12,5	45184765	3730421	12,11251
11	250	10	25	79821523	3283706	24,30836
12	500	10	50	203636951	3739285	54,45879

## 5 Ejemplo 7

(Medición de lactoferrina en leche descremada)

10 Para preparar muestras a medir, se pesó leche descremada cinco veces al día. Se prepararon soluciones acuosas que contenían de 13 a 15 mg/ml de leche descremada, y se añadió ácido fórmico a las mismas a una cantidad de 1/1.000 para preparar soluciones de muestra. Cada solución (10 μl) se deshidrató y después se disolvió en 20 μl de bicarbonato amónico 0,1 M que contenía urea 8 M y Tris (carboxietil) fosfina (TCEP) 1 mM y se calentó a 56 °C durante 30 minutos. La solución se volvió a llevar a temperatura ambiente y se añadieron 5 μl de solución de yodoacetamida 100 mM y se hicieron reaccionar durante 30 minutos en condiciones protectoras de luz. Se añadió agua ultrapura (54 μl) y se añadieron 10 μl de 0,1 μg/ml de tripsina y 10 μl de 0,1 μg/ml de lisil endopeptidasa y la solución mixta se hizo reaccionar a 37 °C durante 16 horas. Se añadió ácido fórmico (1 μl) para detener la reacción y la solución resultante se usó como una solución peptídica de muestra a medir. Cada solución de muestra se eluyó 6 veces con una solución de péptido patrón interno 10 fmol/μl (LFP02) (que contenía ácido fórmico al 0,1%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,02% y acetonitrilo al 2%), y 2,5 μl de la solución diluida se analizó por LC /MS/MS.

25 El área máxima de cada péptido se calculó a partir del cromatograma resultante y se determinaron las proporciones de las áreas para los péptidos respectivos. A partir de las proporciones de las áreas, se determinó la proporción molar de cada péptido basándose en la curva de calibrado mostrada en la Fig. 1. Cuando la concentración de LFP02 se mide por LC/MS/MS es un valor calculado multiplicando 10 fmol/μl por 5/6. La muestra de leche descremada se diluyó 10 veces en la etapa de tratamiento enzimático y se diluyó 6 veces con la solución patrón interna. Por lo tanto, la concentración del péptido diana se calculó mediante la siguiente expresión:

$$30 \text{ Concentración del péptido diana} = \text{proporción molar de cada péptido} \times 5/6 \times 10 \times 60$$

35 Si el peso molecular de la lactoferrina se define como 80.000, la concentración en peso puede determinarse basándose en la concentración molar de la diana. El contenido de la lactoferrina en la leche descremada pudo determinarse basándose en la cantidad de la leche descremada pesada. Los resultados de medición se muestran en la Tabla 2. El término "CV" es un coeficiente de variación calculado dividiendo la desviación típica (DT) entre el valor promedio y después convirtiendo el valor resultante en porcentaje y representa precisión analítica. Como se muestra en la Tabla 2, el valor CV es de aproximadamente 8,9% que es un grado de variabilidad satisfactorio.

[Tabla 2]

Contenido de lactoferrina en leche descremada	
	[lactoferrina mg/100 g - leche descremada]
Ensayo 1	
1	105,87
2	102,20
3	95,37
4	106,92
5	121,23
Promedio	106,3
Desviación típica (DT)	9,5
Precisión analítica (CV) %	8,9

## Ejemplo 8

## 5 (Medición de lactoferrina en leche descremada)

Para preparar muestras a medir, se pesó la leche descremada cinco veces. Se preparó una lactoferrina bovina de tipo mutante que incluía la misma secuencia que la del péptido patrón interno (LFP02) lactoferrina bovina usado en el Ejemplo 1. La lactoferrina bovina de tipo mutante se usó como un patrón interno para medir una lactoferrina a medir en la leche descremada. El método se realizó de la siguiente manera. Se prepararon soluciones acuosas de 15 a 16 mg/ml de leche descremada y a estas se añadió ácido fórmico en una cantidad de 1/1.000 para preparar soluciones de muestra. A 10  $\mu$ l de cada solución de muestra se añadieron 10  $\mu$ l de 30  $\mu$ g/ml de lactoferrina bovina de tipo mutante y la solución resultante se deshidrató y después se disolvió en 20  $\mu$ l de bicarbonato amónico 0,1 M que contenía urea 8 M y Tris(carboxietil)fosfina (TCEP) 1 mM. Todo ello se calentó a 56 °C durante 30 minutos. La solución volvió a llevarse a temperatura ambiente y a la misma se añadieron 5  $\mu$ l de una solución de yodoacetamida 100 mM y se hizo reaccionar durante 30 minutos en condiciones protectoras de luz. A lo resultante se añadió agua ultrapura (54  $\mu$ l) y a esta se añadieron 10  $\mu$ l de 0,1  $\mu$ g/ml de tripsina y 10  $\mu$ l de 0,1  $\mu$ g/ml de lisil endopeptidasa y la solución mixta se hizo reaccionar a 37 °C durante 16 horas. Se añadió ácido fórmico (1  $\mu$ l) para detener la reacción y la solución resultante se usó como una solución peptídica de la muestra a medir. Cada solución de muestra se diluyó 10 veces con una solución acuosa de ácido fórmico al 0,1%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,02% y acetonitrilo al 2%, y 2,5  $\mu$ l de la solución diluida se analizó por LC/MS/MS.

Cada péptido se separó utilizando el sistema HPLC MAGIC 2002 que incluía una columna (MAGIC C18 equipada con un captador peptídico 5  $\mu$ l (ID 0,2 mm  $\times$  50 mm)) a un caudal de 2  $\mu$ l/min. Se realizó elución en gradiente durante 20 minutos con la solución A (acetonitrilo al 2%-ácido fórmico al 0,05%) y la solución B (acetonitrilo al 90%-ácido fórmico al 0,05%) cambiando al mismo tiempo la proporción de solución la B del 2% a 65%. Los iones a medir eran ión parental: m/z 853,8; ión diana MS/MS: m/z 876,4 e ión diana del patrón interno: m/z 862,4 y el intervalo diana de MS/MS fue de 860,9 a 877,9. La MS se realizó usando LCQ Advantage.

El área máxima de cada péptido se calculó a partir del cromatograma resultante y se calculó la proporción del área de los péptidos respectivos. La proporción molar de cada péptido se calculó a partir de la proporción del área basándose en la curva de calibrado mostrada en la Fig. 1. La lactoferrina bovina de tipo mutante y la lactoferrina bovina tenían el mismo peso molecular y la concentración de la lactoferrina bovina de tipo mutante añadida fue de 30  $\mu$ g/ml. Por lo tanto, la concentración de la lactoferrina en la solución de leche descremada se calculó multiplicando la proporción molar de cada péptido por 30. El contenido de lactoferrina en la leche descremada se calculó basándose en la cantidad de la leche descremada pesada. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la medición.

[Tabla 3]

Contenido de lactoferrina en leche descremada	
	[lactoferrina mg/100 g - leche descremada]
Ensayo 1	
1	116,65
2	107,74
3	112,26
4	97,76
5	98,24
Promedio	106,5
Desviación típica (DT)	8,4
Precisión analítica (CV) %	7,9

40

Como resultado, el contenido de lactoferrina en la leche descremada fue de 106,5 mg/100 g de leche descremada.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

5 <120> MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE UN PÉPTIDO Y UNA PROTEÍNA

<130> P/63996.ep01

10 <140> EP07860283.6  
<141> 27-12-2007

<150> JP 2006356161  
<151> 28-12-2006

15 <160> 10  
<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> bovina

25 <400>

Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys  
1 5 10

30 <210> 2  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> construcción sintética

<400>

Glu Thr Thr Leu Phe Glu Asn Val Pro Glu Lys  
1 5 10

40 <210> 3  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> bovina

45 <400>

Ser Trp Glu Val Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro  
1 5 10  
Leu Val Lys

50 <210> 4  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> construcción sintética

<400>

ES 2 409 349 T3

Ser Trp Glu Leu Gly Cys Gly Ala Pro Val Pro  
 1 5 10  
 Val Val Lys

5 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> bovina  
 <400>

Ile His Gly Phe Asp Leu Ala Ala Ile Asn Leu  
 1 5 10  
 Gln Arg

10 <210> 6  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> construcción sintética

20 <400>

Ile His Ala Phe Asp Leu Ala Gly Ile Asn Leu  
 1 5 10  
 Gln Arg

25 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> bovina  
 <400>

30 Tyr Ile His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ala  
 1 5 10  
 Lys

35 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> construcción sintética

40 <400>

Tyr Ala His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ile  
 1 5 10  
 Lys

45 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> bovina  
 <400>

50 <400>

ES 2 409 349 T3

Gln Val Val Ser Gly Met Asn Tyr Phe Leu Asp  
1 5 10  
Val Glu Leu Gly Arg  
15

5  
<210> 10  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10  
<220>  
<223> construcción sintética  
<400>

Gln Gly Val Ser Gly Met Asn Tyr Phe Leu Asp  
1 5 10  
Val Glu Leu Val Arg  
15

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de cuantificación de una proteína o un péptido por LC/MS/MS que comprende
- 5 a) la etapa que consiste en descomponer enzimáticamente la proteína, en el caso en que el que deba cuantificarse una proteína;
- b) utilizar, como sustancia patrón interno para LC/MS/MS, un péptido que es el péptido a cuantificar, o un péptido que proviene de la descomposición de la etapa a), pero que tiene un cambio en el orden de unión de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos;
- 10 en el que los péptidos pueden ionizarse durante la fase MS del método.
2. Un método de cuantificación de una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, pero en el que la sustancia patrón interno utilizada para la LC/MS/MS es, en cambio, una proteína que comprende el péptido de la sustancia patrón interno de la etapa b) de la reivindicación 1.
- 15 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la proteína a medir es una cualquiera de lactoferrina bovina, lactoperoxidasa bovina, angiogenina bovina y cistatina C bovina.

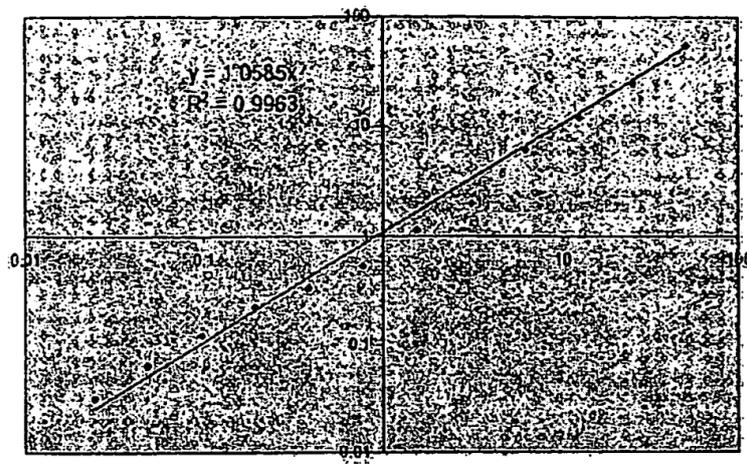


Fig. 1