

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 923**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/76** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07B 59/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 08750514 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2152727**

54 Título: **Patrones de péptidos**

30 Prioridad:

**02.05.2007 GB 0708529**

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

**16.01.2015**

73 Titular/es:

**KING'S COLLEGE LONDON (50.0%)  
Strand**

**London WC2R 2LS, GB y  
GUY'S AND ST. THOMAS' NHS FOUNDATION  
TRUST (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TURNER, CHARLES y  
DALTON, RAYMOND NEIL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 526 923 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

Patrones de péptidos

### Descripción

#### Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a espectrometría de masas (MS), en particular a los patrones de péptidos para su uso en aplicaciones de espectrometría de masas, tales como MS en tándem (MSMS).

#### Antecedentes de la invención

10 Típicamente, la MSMS no se utiliza en la técnica para cuantificar proteínas de forma rutinaria. El procedimiento más común utilizado para la detección/cuantificación de la proteína sigue siendo el inmunoensayo/ELISA, en particular en entornos clínicos. La MSMS de triple cuadrupolo se emplea de forma habitual para el análisis de moléculas pequeñas. Esto es porque el peso molecular para el análisis eficaz está limitado a aproximadamente 3000 Daltons. Por esta razón, la técnica se suele considerar inadecuada para el análisis de las proteínas que pueden tener masas mucho más grandes. Aunque algunas otras técnicas de EM pueden ser adecuadas para proteínas, como MALDI-TOF, la MSMS es necesaria por su especificidad. Con el fin de superar las dificultades del análisis de proteínas cuyo peso molecular supera los 3.000, éstas se dividen en péptidos. Los péptidos relativamente cortos, por ejemplo los péptidos de 8 aminoácidos, pueden proporcionar una identificación prácticamente específica de una proteína.

15 En un desarrollo adicional, se desea utilizar la MSMS para las mediciones cuantitativas de la proteína. Los sistemas tecnológicos de MSMS anteriores cuentan sólo con un análisis cualitativo. En el mejor de los casos, los intentos de la técnica anterior sólo han conseguido un resultado semi-cuantitativo. Con el fin de lograr la cuantificación, lo ideal es etiquetar toda la proteína. Esto se ha intentado en conexión con la apolipoproteína E4. Esta proteína se produjo en un sistema de expresión. Esta es una técnica muy trabajosa y cara. El coste de esta técnica es tal que es prohibitivo para el uso rutinario.

20 En la EM (como MSMS de electrospray) existen problemas relacionados con la interferencia, especialmente a través de efectos de supresión de iones. La supresión de iones se debe a la presencia de compuestos menos volátiles que pueden cambiar la eficacia de la formación de gotas o la evaporación de las gotas, que a su vez afecta a la cantidad de iones cargados en la fase gaseosa que en última instancia llega al detector.

25 Por lo tanto, un factor importante que puede afectar al rendimiento cuantitativo de una detección de masas es la supresión de iones. Matriz de la muestra, compuestos coeluyentes y otros factores pueden contribuir a este efecto. Los efectos de la ionización pueden ocurrir teóricamente, ya sea en la fase de solución o en la fase gas. La masa y la carga de analitos individuales son factores clave a la hora de hacer que un compuesto sea candidato para la supresión de iones o a la hora de convertir un compuesto en una fuente de supresión de iones para otro. Se ha demostrado que las moléculas con mayor masa suprimirán la señal de moléculas más pequeñas y que los analitos más polares son más susceptibles a la supresión.

30 La presencia de la supresión de iones u otros efectos deletéreos se puede evaluar a través de protocolos experimentales. La primera implica la comparación de (a) la respuesta del instrumento para los calibradores (incluyendo cualquier patrón interno) inyectada directamente en la fase móvil, (b) la misma cantidad de compuesto añadido a las muestras preextraídas, y (c) la misma cantidad de compuesto añadido a la matriz de espécimen antes de la extracción. El segundo protocolo, que se puede ver como parte de las pruebas de interferencia para un ensayo, implica la inyección de drogas o metabolitos que también pueden estar presentes en la muestra. El hecho de que un medicamento coeluyente no produzca fragmentos de masa similares no significa que este compuesto sea incapaz de suprimir iones.

35 Otro problema con la MSMS en el análisis de proteínas es un problema de digestión. Típicamente, los péptidos se generan a partir de la proteína por la acción endopeptidasa. La endopeptidasa estándar de la industria para uso en esta aplicación es la tripsina. Obviamente, se requiere una digestión con tripsina eficiente o completa a fin de reducir con éxito la proteína a sus péptidos componentes para el análisis de la MSMS. Para el análisis cuantitativo, es importante que se obtenga una indicación de la digestión con el fin de validar la lectura de los fragmentos peptídicos individuales de la proteína objetivo. A fin de abordar este problema Anderson y Hunter (2006 Mol Cell Proteomics vol 5 pp573-88) clonaron secuencias de ADN para péptidos clínicamente importantes, vinculados y expresados en un sistema de expresión de proteínas libre de células con arginina y lisina isótopas estables añadidas. Esto se traduce en una proteína de fusión marcada que consiste en una serie de péptidos concatenados, que se separarán teóricamente por la acción de la tripsina. Un problema con este enfoque es que los péptidos concatenados no son equivalentes en la estructura secundaria o terciaria a cualquiera de los polipéptidos parentales. Un problema adicional con este enfoque es que la escisión de la proteína es muy probable que se vea dificultada estéricamente debido al gran número de péptidos que se han fundidos juntos. Además, el punto de escisión de la tripsina para muchos de estos péptidos se enmascarará en la estructura tridimensional de una proteína de fusión grande. Incluso si estos puntos con el tiempo se pueden escindir, es probable que tengan baja eficiencia y quizás una cinética de reacción

que podría interferir con el análisis. Además, en el informe de Anderson et al que se utiliza, solo se puede detectar una proporción menor de los productos de digestión de los tripticos pronosticados (17/30 de dichos péptidos no se detectaron de forma reproducible de acuerdo con Anderson). Además, este péptido etiquetado multi-fusionado es difícil de realizar de acuerdo con Anderson. Incluso si se pudiera reproducir de forma fiable, sigue implicando un sistema libre de células para la producción de la proteína de fusión. Dichos sistemas pueden sufrir el metabolismo de la lisina o la arginina u otros aminoácidos. Esto hace más difícil el control de la gama de productos que se producen. Por otra parte, hay una tasa de error significativa que provoca la introducción de aminoácidos incorrectos en el producto polipéptido fusionado. Esto se produce en la etapa de traducción, de manera que el ARNm que se introduce no se puede traducir con precisión en la proteína en dicho sistema libre de células, provocando errores en el polipéptido que pueden variar y que puede ser tan altos como varios percentiles del producto polipéptido.

Aunque este enfoque se ha optimizado, los fragmentos de péptidos tripticos se preparan típicamente en paralelo, separados de la digestión de la muestra a analizar, y luego se 'pinchan' en la muestra antes del análisis. Claramente, este enfoque es incapaz de controlar la acción endopeptidasa en la muestra a analizar.

Li-Rong et al, (J. Proteome Research, 3, 469-477, 2004) describen los polipéptidos derivables de factor de elongación 2 y albúmina. Los péptidos se obtienen por digestión y luego se utilizan en espectrometría de masas.

La presente invención pretende superar los problemas asociados con la técnica anterior.

### Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que el rendimiento de la MS se puede maximizar mediante la provisión de patrones de péptidos internos. Estos patrones de péptidos se corresponden de forma ventajosa con péptidos de productos digestos tripticos derivados de la proteína de interés.

En contraste con las técnicas anteriores, los presentes inventores han demostrado de forma sorprendente que la tripsina tiene un requisito extremadamente mínimo para extremos C-terminal con el fin de producir una escisión eficaz. Así, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan patrones de péptidos que se corresponden con los fragmentos de péptidos tripticos esperados de una proteína a analizar, con la adición de un extremo C-terminal extremadamente corto para permitir la digestión triptica eficiente. Mediante el uso de estos patrones, los problemas de supresión de iones pueden controlarse internamente dado que las especies de péptidos a analizar son idénticas en las secuencias de aminoácidos a los patrones de péptidos. Además, estos patrones de péptidos proporcionan un control interno para la digestión triptica pues es posible analizar esos patrones de péptidos que se han escindido mediante digestión triptica, ya que perderán el extremo de aminoácidos C-terminal extremadamente corto que se proporciona para "leer" o controlar la acción de la tripsina.

Así, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan patrones de péptidos de bajo coste que son capaces de controlar internamente problemas de supresión de iones y también problemas de digestión de tripticos, aumentando de forma fiable y rentable la eficacia del análisis de MS de proteínas y péptidos.

Así, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para hacer un patrón de péptido para espectrometría de masas comprendiendo dicho procedimiento

(a) la identificación de los puntos de escisión de endopeptidasa en una secuencia de polipéptido progenitor de interés;

(b) la selección de secuencias de péptido a partir de dicho polipéptido progenitor que se definen mediante los puntos de escisión de endopeptidasa de la etapa (a),

(c) la adición de una extensión C-terminal a cada secuencia seleccionada,

en la que si el punto de escisión de endopeptidasa es C-terminal para su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende de 1 a 6 aminoácidos,

en la que si el punto de escisión de endopeptidasa es N-terminal para su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende dicha secuencia de reconocimiento,

en la que si el punto de escisión de endopeptidasa está dentro de su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende el resto de dicha secuencia de reconocimiento de C-terminal para el punto de escisión; y

(d) la síntesis de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos extendida de la etapa (c).

Por supuesto, hay que señalar que las etapas de (c) se pueden aplicar por separado (por ejemplo, individualmente) en función del contexto. Por ejemplo, cuando se utiliza una endopeptidasa que tiene un punto de escisión N-terminal para su secuencia de reconocimiento, a continuación, la invención se refiere a un procedimiento como el descrito en

el que dicha extensión C-terminal comprende dicha secuencia de reconocimiento. Lo mismo ocurre con las otras ramas de la etapa (c).

5 La longitud de la extensión C-terminal puede ser elegida por el operador y puede ser de hasta 6 o 7 aminoácidos o incluso más. Se utilizan adecuadamente hasta 6 aminoácidos, más adecuadamente hasta 5 aminoácidos. Las extensiones más cortas tienen la ventaja de que dan lugar a una fabricación de péptido más barata. Por lo tanto, se prefiere una extensión de un aminoácido, siempre que sea suficiente para permitir la escisión eficaz por endopeptidasa.

10 La secuencia de continuación de la proteína parental se utiliza, preferentemente, como secuencia de la extensión C-terminal de la etapa (c). Se puede utilizar cualquier secuencia de aminoácidos como extensión C-terminal. Vemos que se puede utilizar NDCTTM, lo que demuestra que es posible que cualquier secuencia de continuación sea adecuada. Sin embargo, la secuencia de la extensión C-terminal coincide, de forma más adecuada, con la secuencia de aminoácidos de continuación natural del polipéptido parental. Preferiblemente, la cisteína no está presente en la extensión C-terminal.

15 Preferiblemente, los aminoácidos 1 a 6 de la etapa (c) son idénticos a los aminoácidos 1 a 6 que siguen inmediatamente el punto de reconocimiento de endopeptidasa en la secuencia de polipéptido de interés.

Preferiblemente, los aminoácidos 1 a 6 de la etapa (c) son TCVAD.

20 Preferiblemente, la síntesis del péptido se realiza por medios químicos, es decir, síntesis química de péptidos. Preferiblemente, la síntesis no se realiza por medios recombinantes que pueden precisar mano de obra adicional y/o generar errores adicionales con respecto a los ácidos nucleicos utilizados. Preferiblemente, la síntesis no se realiza mediante el uso de un sistema de expresión libre de células que puede generar altas tasas de error y/o problemas de metabolismo de ciertos residuos de aminoácidos. Preferiblemente, la síntesis química se realiza mediante síntesis de Merrifield. Es evidente que un operador experto puede variar el esquema de síntesis preciso para optimizar los rendimientos o la eficiencia u otros factores. Estas características tienen las ventajas de eliminar fuentes de error tales como errores de secuencia en la preparación de un nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de interés, o errores de transcripción en la fabricación de ARNm, o el metabolismo de diversos residuos de aminoácidos, o la eliminación de pasos trabajosos, o una combinación de estas ventajas, tal y como se explica de forma más detallada a continuación.

30 Preferiblemente, dicho péptido está marcado con al menos un isótopo estable, preferiblemente al menos dos isótopos estables. Preferiblemente, dichos isótopos se seleccionan entre el grupo que está formado por deuterio, carbono 13, nitrógeno 15 y oxígeno 18. Preferiblemente, dicho isótopo es el carbono 13. Cuando se utilizan dos isótopos, estos son, preferiblemente, de carbono 13 y nitrógeno 15. Preferiblemente, el isótopo estable se incorpora N-terminal con respecto al punto de escisión de endopeptidasa de forma que el péptido mantiene la marca después de la escisión de la endopeptidasa.

35 La endopeptidasa es preferiblemente cualquier entidad catalítica, como una enzima o fragmento, de ahí que pueda romper un enlace peptídico. Actualmente se definen seis grupos de proteasa: serina, treonina, cisteína, ácido aspártico, metalo y ácido glutámico. Preferiblemente, dicha endopeptidasa es una única endopeptidasa. Preferiblemente, dicha endopeptidasa se selecciona entre el grupo que está formado por tripsina y endopeptidasas V8, preferiblemente tripsina. Preferiblemente, dicha endopeptidasa tiene una secuencia de reconocimiento de  $XXK$  o  $XXR$ .

40 Preferiblemente, el polipéptido parental (polipéptido de interés) es la albúmina.

45 Por supuesto, uno de los patrones péptidos podría utilizarse de manera universal para el control de la digestión de la endopeptidasa en la muestra. Sin embargo, para controlar la supresión de iones del patrón péptido utilizado es necesario generar iones de la misma estructura general que la de los que se van a detectar. Por lo tanto, los patrones de péptidos derivados de / basados en el polipéptido de interés (polipéptido parental) se utilizan, preferentemente, para el análisis o la detección de dicho polipéptido.

50 Por otro lado, la invención proporciona un péptido que está formado por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que está formado por LVNEVTEFAKT, LVNEVTEFAKTC, LVNEVTEFAKTCV, LVNEVTEFAKTCVA y LVNEVTEFAKTCVAD. Preferiblemente, el último residuo K que se produce en dicho péptido está marcado con isótopos estables. Preferiblemente, dicho isótopo estable se selecciona entre el grupo que está formado por deuterio, carbono 13, nitrógeno 15 y oxígeno 18. Preferiblemente, dicho isótopo es el carbono 13.

#### **Descripción detallada de la invención**

55 Los ensayos de metabolitos cuantitativos que utilizan la MSMS se basan en técnicas de dilución de isótopos estables, donde se añade una cantidad constante de un isótopo estable del compuesto de interés en una fase temprana del análisis para corregir cualquier pérdida/cambio de procesamiento, la eficiencia de ionización, la eficiencia de fragmentación y la variabilidad de detección. La señal de isótopos estables actúa como una regla y la concentración del metabolito en la muestra original es una función (por lo general lineal) de la proporción de isótopos.

El material de la estandarización interna ideal para cualquier medición de la proteína cuantitativa basada en la MSMS es la proteína en cuestión debidamente etiquetada con aminoácidos de isótopos estables. En teoría, en el análisis basado en péptidos sería necesario etiquetar cada péptido medido. En el caso de la digestión proteolítica usando tripsina, la escisión se puede predecir en el enlace peptídico C-terminal de la lisina o la arginina. Por lo tanto, para la

5

tripsina, el etiquetado de isótopos estables sólo de lisina y arginina garantiza que todos los péptidos liberados son isótopos estables marcados en el C-terminal y, debido a que son arginina/lisina, la carga se localiza para proporcionar, en la MSMS, una secuencia informativa y de serie en la que cada fragmento y contiene la marca y, por lo tanto, una transición de supervisión de reacción múltiple informativa (MRM). Sin embargo, el coste de tal enfoque es prohibitivo.

El enfoque más simple y barato para el problema es utilizar un péptido marcado de isótopo estable del péptido a medir. Esto permite la postdigestión para cualquiera de las pérdidas de procesamiento, etc. (véase más arriba) y, por lo tanto, no controla la propia digestión; una etapa crucial, en particular en el análisis clínico de rutina en el que tendrán que minimizarse los tiempos de incubación. Anderson y Hunter (ibid.) han hecho múltiples construcciones peptídicas concatenadas, usando sistemas de clonación y expresión. En teoría, estos permitirían la medición de

10

15

múltiples proteínas simultáneamente. Es evidente que estos productos demuestran la proteólisis pero son costosos y no son equivalentes a la proteína original, por lo que sigue habiendo problemas de eficiencia debido a la complejidad de las construcciones, y los problemas de errores y la consistencia de los productos finales.

Según la invención, se propone una solución más simple y de aplicación más general a estos problemas. Teniendo en cuenta la estructura de endopeptidasas, tales como la enzima tripsina y el proceso funcional de la proteólisis, es evidente que en cualquier punto de escisión de la proteína en el que esté, aparte del residuo de lisina/arginina que se ajusta al pozo del punto activo, los aminoácidos N-terminal para el punto que afectan a la unión de la proteína y, en consecuencia, sólo se necesita el siguiente aminoácido C-terminal para permitir la corrección del proceso proteolítico. Los aspectos de la invención se basan en este hallazgo clave.

20

#### Aplicaciones de la MS

25

La espectrometría de masas (MS) es una potente técnica analítica cualitativa y cuantitativa que se ha introducido en muchos laboratorios clínicos y de investigación durante los últimos 5 años. El costo de los analizadores de MS se ha reducido a un nivel que es asequible para la mayoría de los laboratorios. Hay una mayor conciencia de las aplicaciones de laboratorio de la MS en el laboratorio clínico, por lo que el apoyo técnico y el desarrollo del ensayo son prioridades importantes. En el laboratorio clínico, los espectrómetros de masas se utilizan para medir una amplia

30

35

gama de analitos clínicamente importantes. Cuando se aplica a muestras biológicas, la importancia de la MS se encuentra en su selectividad de cara a la identificación y cuantificación de compuestos. La combinación de la cromatografía de gases o HPLC con la MS produce una herramienta especialmente potente. Esto es especialmente así para HPLC-MS o HPLC-MS en tándem, que es la razón de que esta combinación esté siendo utilizada por muchos laboratorios clínicos.

En particular, la invención implica el uso de la MSMS como una potente herramienta para identificar la presencia de proteínas específicas, péptidos y variantes de proteínas en fluidos biológicos. El interés se debe al uso creciente de proteínas y péptidos específicos como indicadores de estados de enfermedad o a la aparición probable de estados de enfermedad.

40

Existe un interés creciente en la medición cuantitativa de proteínas por MSMS. Usando la digestión triptica y el modo de supervisión de reacción múltiple (MRM) específico del péptido es fácil detectar la presencia / ausencia de un péptido, pero la cuantificación precisa requiere un patrón interno marcado de isótopo estable. Esto es necesario para corregir las variables analíticas, principalmente la digestión triptica y la supresión de iones.

Los inventores divulgan un enfoque simple, flexible y rentable que se ocupa de estas cuestiones.

Para tener en cuenta la supresión de iones los patrones son isótopos estables etiquetados.

45

La presente invención se refiere a los patrones que tengan en cuenta los problemas de digestión de proteínas y de supresión de iones. Los patrones son baratos y fáciles de sintetizar.

#### Patrones de péptidos y patrones de péptidos internos

50

La co-digestión del patrón péptido y la muestra a analizar tiene la ventaja de controlar la acción endopeptidasa internamente dentro de la muestra actual que se está analizando. Por lo tanto, el patrón de péptido de la invención y la muestra preferiblemente siempre se co-digieren con el fin de controlar la eficacia de la digestión y/o las características metabólicas de la etapa de reacción de digestión/incubación. Esta aplicación de co-digestión se conoce por su uso como un patrón de péptido interno por las razones indicadas anteriormente. Así, la invención se refiere al uso de patrones de péptidos como se describe anteriormente como patrones de péptidos internos. Claramente, el uso como patrón de péptido interno proporciona muchos beneficios. Sin embargo, los patrones de péptidos de la invención también se pueden utilizar como patrones de péptidos convencionales, es decir,

55

añadiéndolos simplemente a ('pinchándolos' en) la muestra antes del análisis. En esta realización, el patrón de

péptido no se co-digiere con la muestra, sino que simplemente se añade a la muestra ya digerida y después se analiza. En esta realización, el propio patrón de péptido no se puede escindir, normalmente se analizará en el estado en el que se encuentre cuando se pinche en la muestra. Así, la invención se refiere al uso de los patrones de péptidos, como se describe anteriormente, como patrones de péptidos convencionales.

5 En realizaciones de patrones de péptidos convencionales, es posible que sea necesario hacer suposiciones sobre la digestión ya que no hay ningún control "interno" para la digestión en tales aplicaciones. Por lo tanto, las inferencias extraídas de los resultados dependen del conocimiento exacto de la cantidad de patrones de péptido añadida a la muestra.

10 En las realizaciones de patrones de péptido internas se pueden hacer cálculos en base a la relación isotópica, por ejemplo, mediante la producción de una curva de calibración y el uso de la relación isotópica en el cálculo de las concentraciones. Esto es una ventaja de las realizaciones de patrones de péptidos internos preferidos de la invención.

#### Ventajas

15 La invención aborda de forma ventajosa el doble problema de control de la digestión de proteínas y la supresión de iones.

Es una ventaja de los patrones de péptidos de la presente invención que el punto de escisión se presenta para la endopeptidasa. La técnicas de concatenación anteriores adolecen de enterrar, enmascarar o impedir estéricamente el acceso al punto de reconocimiento de endopeptidasa. Este problema se supera ventajosamente utilizando los patrones de péptidos según la presente invención.

20 La síntesis libre de células de la técnica anterior es un proceso largo y caro. Los patrones de péptidos individuales de la presente invención son más baratos y más fáciles de fabricar, lo cual es una ventaja de la presente invención.

25 Es una ventaja de la presente invención que se pueden retener las secuencias de péptidos de origen natural. En particular, en algunas realizaciones, la secuencia de origen natural del péptido de interés puede conservarse incluso en el extremo C-terminal (extensión C-terminal) que sigue al punto de escisión de la endopeptidasa en los patrones de péptidos de la presente invención. Esto tiene la ventaja de presentar el punto de reconocimiento de la endopeptidasa que ocurre naturalmente en el contexto de sus aminoácidos vecinos presentes de forma natural, proporcionando así otro nivel de control interno para la acción de la endopeptidasa en la muestra que se analiza.

30 Una ventaja adicional de la presente invención se deriva de la síntesis química de los péptidos de interés. Esto evita ventajosamente una etapa de ácido nucleico en la producción de polipéptidos. Un paso de ácido nucleico inevitablemente requiere más mano de obra y costo. Además, introduce nuevas oportunidades de errores al introducir en el sistema, por ejemplo, errores en la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico que se utiliza para codificar el patrón péptido. Por lo tanto, las realizaciones de la invención que evitan la producción de transcripción o traducción de los patrones de péptidos aportan ventajas adicionales. Por lo tanto, se prefiere la síntesis química de los patrones de péptidos de la invención.

35 En una realización, las normas de péptidos de la presente invención no se derivan, preferiblemente, de las proteínas plasmáticas. Por lo tanto, los patrones de péptidos de la presente invención son, preferiblemente, para proteínas no plasmáticas.

40 La fabricación de polipéptidos en sistemas libres de células biológicas implican problemas de metabolismo de ciertos aminoácidos. Por lo tanto, es muy difícil controlar los productos que se producen. Además de esto, hay una tasa de error de origen natural significativa asociada con sistemas libres de células y de expresión que pueden conducir a que un porcentaje de los productos tenga aminoácidos incorrectos incorporadas. Los patrones de péptidos de la presente invención mejoran de forma ventajosa uno o varios de estos problemas.

45 Las técnicas de la técnica anterior implican con frecuencia una etapa de cromatografía. De forma ventajosa, el uso de los patrones de péptidos de la presente invención permite la eliminación, para algunas aplicaciones clínicas importantes, de este trabajado paso.

Una ventaja de la invención es poder eliminar las etapas de cromatografía.

Una ventaja de la invención es que ayuda a eliminar los problemas causados por los cambios de la matriz (por ejemplo, pacientes enfermos).

#### Preparación de un péptido

50 Los procedimientos de la invención requieren la preparación de los patrones de péptidos. El primer paso en este proceso es para decidir sobre la secuencia del propio patrón de péptido. Como un primer paso, los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa se identifican en una secuencia de polipéptido parental de interés. La secuencia de polipéptido parental de interés es simplemente la entidad que se desea estudiar en la muestra. Esto podría ser

cualquier polipéptido que se desea analizar. En cuanto a la endopeptidasa, esto puede ser cualquier endopeptidasa adecuada para su uso en la digestión de polipéptidos. Las endopeptidasas modelo se discuten en más detalle a continuación. Con el fin de identificar los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa en la secuencia de polipéptido parental, se realiza una comparación de la secuencia entre el punto de reconocimiento de la endopeptidasa y la secuencia de polipéptido parental. Esto puede hacerse manualmente, mediante la lectura de la secuencia del polipéptido y el marcado en cada punto de escisión de la tripsina, o se puede automatizar, de forma conveniente, utilizando cualquiera de las herramientas de análisis de secuencia que se encuentran disponibles tanto de forma gratuita como comercial, por ejemplo, "CLC Protein Workbench" o el paquete Genetics Computer Group (GCG) de Wisconsin. Con referencia a la figura 1, la parte A representa un diagrama del polipéptido parental con N-terminal a la izquierda y C-terminal a la derecha. Después de la etapa de identificación, la secuencia de polipéptido parental es como se muestra en la parte B. Cada una de las pequeñas líneas verticales marcadas en la secuencia representa un punto de reconocimiento de endopeptidasa.

El siguiente paso es la selección de secuencias de péptidos del polipéptido parental, cuyas secuencias de péptidos se definen mediante los puntos de reconocimiento o de escisión de la endopeptidasa. En general, una secuencia de péptido definida por los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa es simplemente un péptido que tiene o está formado por la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental entre dos puntos de reconocimiento de la endopeptidasa, preferiblemente entre dos puntos de escisión de endopeptidasa, preferiblemente dos puntos vecinos de reconocimiento/escisión de la endopeptidasa. Con referencia a la figura 1, la parte C muestra las secuencias seleccionadas definidas por los puntos de escisión de endopeptidasa. Preferiblemente, la secuencia así seleccionada no incluye el punto de reconocimiento en su N-terminal. Preferiblemente, la secuencia así seleccionada comienza en el punto de corte, es decir, el primer aminoácido C-terminal del punto de corte es el primer aminoácido de cada secuencia de péptido así seleccionada. Por ejemplo, cuando la endopeptidasa es tripsina, el péptido seleccionado no incluirá un residuo de arginina o un residuo de lisina en su extremo N-terminal, pero comenzará con el primer aminoácido después de dicho residuo de Arg/Lis. Preferiblemente, el péptido así seleccionado llega hasta el punto de corte de la endopeptidasa en su C-terminal, es decir, el último aminoácido N-terminal de dicho punto de corte es el último aminoácido así seleccionado. Así, cuando la endopeptidasa es la tripsina, el C-terminal del péptido así seleccionado terminará en el último aminoácido de dicho punto de reconocimiento de la endopeptidasa ya que el punto de corte de la tripsina es inmediatamente posterior a su punto de reconocimiento. Por ejemplo, cuando la endopeptidasa es la tripsina, la secuencia así seleccionada terminará en un residuo de lisina o arginina.

El siguiente paso es añadir una extensión C-terminal a cada secuencia seleccionada.

- Cuando el punto de escisión y de reconocimiento terminan juntos, es decir, cuando la escisión tiene lugar inmediatamente después (es decir, C-terminal) el último aminoácido del punto de reconocimiento (por ejemplo ABCD / donde "/" indica el punto de corte o de escisión), entonces la adición de una extensión C-terminal incluye, preferiblemente, la adición de uno a cuatro aminoácidos al extremo C-terminal de cada secuencia seleccionada. Estos aminoácidos pueden ser cualquier aminoácido elegido por el operador. Preferentemente, estos aminoácidos no están compuestos de lisina ni arginina. Preferentemente, estos aminoácidos corresponden a los aminoácidos equivalentes del polipéptido parental.

- Cuando la escisión se produce en el punto de reconocimiento de la endopeptidasa o antes (es decir N-terminal) el primer aminoácido del punto de reconocimiento (por ejemplo, ABC/D, AB/CD, A/BCD o /ABCD, donde "/" indica el punto de corte o escisión), añadiendo preferiblemente una extensión C-terminal que incluye la adición de aminoácidos que componen el punto de reconocimiento (o el resto del mismo) para el C-terminal de dicho punto para cada secuencia seleccionada. Opcionalmente se pueden añadir otros aminoácidos si así se desea.

La extensión C-terminal se trata con más detalle a continuación.

Con referencia a la figura 1, la parte D muestra las secuencias de péptidos resultantes con extensiones C-terminal. En la parte D, la extensión C-terminal está representado por X(n), donde X significa cualquier aminoácido y n es un número entero de 1 a 6.

Con el fin de hacer el patrón de péptido de acuerdo con la invención, la secuencia del péptido seleccionada junto con su extensión C-terminal se sintetiza así como un único péptido contiguo. Preferiblemente, esto se lleva a cabo mediante cualquier procedimiento de síntesis química adecuado conocido en la técnica, tales como los usados en la sección de ejemplos.

#### *N-terminal del polipéptido parental*

Como resulta evidente de lo expuesto anteriormente, el N-terminal del polipéptido parental se define en un extremo por el propio N-terminal (es decir, el grupo NH<sub>2</sub> en el primer aminoácido del polipéptido parental) y en el otro extremo se va a definir mediante el primer punto de reconocimiento de endopeptidasa encontrado en el polipéptido parental. Para los fines de la presente invención, este péptido N-terminal se puede tratar exactamente como un péptido interno que se define mediante un punto de endopeptidasa en cada extremo tal y como se describió anteriormente. La extensión C-terminal se añade simplemente al C-terminal de este péptido como con cualquier otro péptido definido mediante dos puntos de endopeptidasa internos.

*C-terminal del polipéptido parental*

Como resulta evidente de lo expuesto anteriormente, el C-terminal del polipéptido parental tiene que tratarse de forma ligeramente diferente de los polipéptidos internos de los polipéptidos N-terminales que se pueden tratar de la misma manera que se describe anteriormente. Teniendo en cuenta el péptido C-terminal, esto se define en su extremo N-terminal mediante la aparición del último punto de endopeptidasa interna, y se define en su extremo C-terminal mediante el grupo COOH del último aminoácido del polipéptido parental. Claramente, es improbable que los aminoácidos C-terminal del polipéptido parental pudieran formar un punto de reconocimiento de la endopeptidasa, aunque es teóricamente posible que pudieran hacerlo. Sin embargo, para la mayoría de las proteínas, los aminoácidos C-terminal no forman un punto de reconocimiento de endopeptidasa. Por lo tanto, la adición de una extensión C-terminal más allá del C-terminal de la proteína no daría lugar a un patrón de péptido escindible útil para la espectrometría de masas, porque dicho péptido no se escindiría mediante una endopeptidasa, ya que no incluiría un punto de reconocimiento de la endopeptidasa. Por lo tanto, preferiblemente no se forma un patrón de péptido de acuerdo con la presente invención desde el extremo C-terminal del polipéptido parental. Por lo tanto, una secuencia de péptido definido por los puntos de reconocimiento/escisión de la endopeptidasa tal como se describe en el presente documento se refiere, preferiblemente, a una secuencia de péptido que está flanqueada en cada extremo por un punto de reconocimiento/escisión de la endopeptidasa, o está flanqueada en un extremo por el N-terminal del polipéptido parental y en el otro por un punto de endopeptidasa interna.

Es posible hacer un patrón de péptido de acuerdo con la presente invención desde el "extremo C-terminal del polipéptido parental. Esta situación se muestra en la figura 1, parte E. En esta situación, el péptido del extremo C-terminal definido en un extremo por el extremo C-terminal del polipéptido parental y en el otro por el último punto de reconocimiento de la endopeptidasa que se produce, se juntan con el segundo último péptido definido por los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa. Esta secuencia combinada, a continuación, se puede sintetizar y usar como un patrón de péptido interno dado que la escisión mediante la endopeptidasa objetivo se traducirá en el péptido C-terminal y sus péptidos inmediatamente vecinos siendo generados por la acción de la endopeptidasa. En esta realización, resulta ventajoso para asegurar que se incluye una etiqueta isotópica estable en, al menos, dos residuos de aminoácidos, siendo al menos uno de los cuales N-terminal del punto de reconocimiento de la endopeptidasa, y siendo al menos uno de ellos C-terminal de ese punto, por lo que después de la escisión de la endopeptidasa cada uno de los patrones de péptidos resultantes se marca y se puede identificar en el salida de la MS (EM).

Preferiblemente, los patrones de péptidos de acuerdo con la invención no se producen desde el extremo C-terminal extremo del polipéptido parental. Preferiblemente, los patrones de péptido de acuerdo con la presente invención se producen a partir de péptidos definidos en cada extremo por referencia a un punto de reconocimiento/escisión de la endopeptidasa interna, o de péptidos definidos en un extremo por el N-terminal extremo del polipéptido parental y en el otro por referencia a un punto de reconocimiento/escisión de la endopeptidasa.

Extensión C-terminal

La extensión C-terminal es una característica clave de los patrones de péptidos de la presente invención. Esta característica es fundamental para el control interno de la acción de la endopeptidasa. El término "extensión C-terminal" refleja la forma en la que la secuencia del patrón de péptido está diseñada, tal y como se trata en el presente documento, en esencia, la "extensión C-terminal" se refiere a aquellos aminoácidos del patrón de péptido que siguen al último residuo antes del punto de escisión C-terminal. Cabe señalar que la extensión C-terminal puede comprender en sí mismo aminoácidos derivados de la secuencia parental. Para el control interno de la acción de la endopeptidasa en muestras para análisis de la MS, es una característica esencial que los patrones de péptidos de la invención tienen una extensión C-terminal de, al menos, un aminoácido después del punto de escisión de la endopeptidasa, de modo que se pueden distinguir los iones escindidos y no escindidos. En uso, tras la incubación con la endopeptidasa afin, esta extensión C-terminal se escinde del resto del patrón de péptidos. La pérdida de esta extensión C-terminal se detecta por espectroscopía de masas y, por tanto, la acción de la endopeptidasa se controla internamente. Esta es una característica importante y ventajosa de la presente invención.

La longitud y/o composición de la extensión C-terminal se elige para permitir, en primer lugar, la discriminación entre los iones escindidos y no escindidos en el análisis de la MS y, en segundo lugar, para permitir la escisión eficaz por la endopeptidasa afin. En la práctica, una extensión C-terminal de cualquier aminoácido único es suficiente para permitir la discriminación entre los iones escindidos y no escindidos, ya que la pérdida de un residuo de aminoácidos conocido del ion detectado proporciona una diferencia de masa clara y fácil de distinguir entre las formas intactas y escindidas. Por lo tanto, la extensión C-terminal es preferiblemente de, al menos, un aminoácido de longitud. Con el fin de producir una escisión eficaz mediante la endopeptidasa, puede ser necesario elegir cuidadosamente la longitud y/o composición de la extensión C-terminal, prestando atención a los requisitos de la endopeptidasa de elección. En el caso de la tripsina, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que esta endopeptidasa puede tolerar una extensión C-terminal extremadamente corta con un único aminoácido. Sin embargo, pueden ser necesario que otras endopeptidasas requieran una extensión C-terminal más larga, o una composición específica. Por ejemplo, algunas endopeptidasas pueden requerir la presencia de aminoácidos más allá de su punto de corte y, en estas circunstancias, la extensión C-terminal del patrón de péptido incluye preferiblemente lo mismo.

En algunas realizaciones, puede ser posible que una endopeptidasa particular tenga un punto de reconocimiento que se extiende hasta el C-terminal del punto de escisión. Por ejemplo, el punto de reconocimiento puede ser ABCD/EFG donde '/' representa el punto de escisión. (Esto contrasta con la situación en la que el punto de escisión y el punto de reconocimiento co-finalizan como para la tripsina, por ejemplo, ABCD/). En esta situación (es decir, el punto de reconocimiento que se extiende al C-terminal del punto de escisión), el punto de reconocimiento claramente tiene que estar presente en el patrón de péptido con el fin de obtener una escisión eficaz. Por lo tanto, en esta realización, la extensión C-terminal puede elegirse para que forme parte del punto de reconocimiento más allá del punto de corte para su inclusión en el patrón de péptido. En otras palabras, la extensión C-terminal en realizaciones en las que el punto de reconocimiento de la endopeptidasa se extiende al C-terminal del punto de escisión se elige, preferiblemente, para que los aminoácidos presentes estén en el punto de reconocimiento C-terminal del punto de escisión. En esta realización puede ser que el patrón de péptido no necesite incluir cualquier aminoácido más allá del punto de reconocimiento, ya que la parte distal (C-terminal) de ese punto de reconocimiento forma la "extensión C-terminal", es decir, la parte que se pierde después de la acción de la endopeptidasa permitiendo, de este modo, la diferenciación de los iones de péptido escindidos y no escindidos.

En otras palabras, cuando la endopeptidasa es tripsina, los aminoácidos de extensión C-terminal deben ser preferiblemente la secuencia C a N del siguiente péptido triptico, por lo tanto, para la albúmina de la secuencia TCAVD del T7. En algunas realizaciones, la extensión C-terminal puede incluir una secuencia no relacionada con el péptido parental, como el hexapéptido NDCTTM con el que demostramos que, en términos de pruebas para la acción de la tripsina, la secuencia de la extensión C-terminal es extremadamente flexible. La extensión C-terminal, como una única extensión de aminoácido, puede ser cualquiera que no interfiera con la digestión de la endopeptidasa del patrón (como la tripsina).

Por lo tanto, el operador determinará, habitualmente, la extensión C-terminal con referencia a las orientaciones dadas anteriormente. Debe haber al menos un aminoácido largo. Debe ser suficientemente largo para fomentar la acción de la endopeptidasa, que se determina fácilmente mediante ensayo y error rutinario, si fuera necesario. Debe ser de una composición que fomente, o al menos no impida, la acción de la endopeptidasa que se podrá volver a determinar fácilmente mediante ensayo y error rutinario, si fuera necesario. Preferiblemente, la secuencia de la extensión C-terminal sigue la secuencia del polipéptido parental inmediatamente después del punto de escisión de la endopeptidasa.

La extensión C-terminal puede ser cualquier longitud adecuada, en particular con referencia a la orientación dada en el presente documento con respecto a las longitudes estándar de péptidos, por ejemplo la extensión C-terminal puede ser de 1 a 21 aminoácidos, de 1 a 15 aminoácidos, de 1 a 10 aminoácidos, de 1 a 9 aminoácidos, de 1 a 8 aminoácidos, de 1 a 7 aminoácidos, de 1 a 6 aminoácidos, o incluso menos. Cuando el punto de escisión de la endopeptidasa es C-terminal para el punto de reconocimiento de la endopeptidasa, preferiblemente la extensión C-terminal es de 1 a 6 aminoácidos, más preferiblemente la extensión C-terminal es de 1 a 5 aminoácidos; preferiblemente, estos de 1 a 5 aminoácidos son, o se seleccionan entre, TCVAD o NDCT, preferiblemente TCVAD. Al seleccionar menos de 5 aminoácidos, se seleccionan preferiblemente en la dirección N a C terminal de las secuencias dadas. Preferiblemente, la extensión C-terminal es de 1 a 5 aminoácidos; preferiblemente, la extensión C-terminal es de 1 a 4 aminoácidos; preferiblemente, la extensión C-terminal es de 1 a 3 aminoácidos; preferiblemente, la extensión C-terminal es de 1 o 2 aminoácidos; preferiblemente, la extensión C-terminal es 1 aminoácido, esto tiene la ventaja de minimizar la longitud del péptido mientras conserva la capacidad de control para la acción endopeptidasa. Preferiblemente, la extensión C-terminal no contiene cisteína. Si la extensión C-terminal contiene cisteína, preferiblemente no es el residuo de aminoácido terminal. Si la extensión C-terminal contiene cisteína, preferiblemente hay al menos más aminoácidos C-terminal de la última cisteína que se produce.

#### Longitudes de péptido

Debido a la naturaleza del análisis de espectrometría de masas, los péptidos más cortos son más deseables. Los péptidos cortos tienen la ventaja de ser más baratos y más fáciles de hacer, fáciles de manejar y más manejables. En general, que sean más corto es mejor por estas razones. Sin embargo, el péptido debe ser de suficiente longitud para que su detección en la MS produzca una información significativa acerca de la identidad del polipéptido parental. Si el péptido es demasiado corto, por ejemplo, sólo dos o tres aminoácidos, entonces es probable que se produzca una secuencia tan corta en muchos polipéptidos candidatos posibles y, por lo tanto, la detección de un péptido tan corto puede no ser eficaz para indicar la presencia del polipéptido parental en la muestra. Por lo tanto, el patrón de péptido de la invención debe ser suficientemente largo para permitir que funcione como un identificador del polipéptido parental. En la práctica, un péptido de aproximadamente 8 aminoácidos o más típicamente identificará de forma única el polipéptido parental a partir del cual se deriva. Así, los patrones de péptidos de la invención son, preferiblemente, de al menos 8 aminoácidos de longitud.

Preferiblemente, el patrón de péptido es al menos de 4 aminoácidos, preferiblemente al menos de 5 aminoácidos, preferiblemente al menos de 6 aminoácidos, preferiblemente al menos de 7 aminoácidos, preferiblemente al menos de 8 aminoácidos, preferiblemente al menos de 9 aminoácidos, preferiblemente al menos de 10 aminoácidos, preferiblemente al menos de 12 aminoácidos o incluso más.

Las longitudes del péptido dadas en este documento se refieren preferiblemente a la longitud de todo el patrón de péptido, es decir, que incluyen cualquiera de los aminoácidos de extensión C-terminal que puede haberse añadido al diseño de la secuencia de dicho patrón de péptido.

5 Como se señaló anteriormente, los péptidos más largos son, técnicamente, más difíciles de fabricar e incrementan el coste y la mano de obra del proceso. Por lo tanto, en general, se prefieren los péptidos más cortos. Preferiblemente, el patrón de péptido de la invención es de 100 aminoácidos o menos, preferiblemente de 50 aminoácidos o menos, preferiblemente de 30 aminoácidos o menos, preferiblemente de 28 aminoácidos o menos, preferiblemente de 26 aminoácidos o menos, preferiblemente de 25 aminoácidos o menos, preferiblemente de 24 aminoácidos o menos, preferiblemente de 23 aminoácidos o menos, preferiblemente de 22 aminoácidos o menos, preferiblemente de 21 aminoácidos o menos, preferiblemente de 20 aminoácidos o incluso menos.

10 Por lo tanto, los patrones de péptidos preferidos según la invención combinan una longitud suficiente para identificar de forma única el polipéptido parental junto con una longitud total restringida que les permite ser producidos de forma barata y eficiente. Por estas razones, los patrones de péptidos de acuerdo con la invención son, preferiblemente, de 6 a 26 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 8 a 24 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 10 a 22 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 12 a 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente de 14 a 18 aminoácidos de longitud, preferiblemente de unos 16 aminoácidos de longitud. La mayoría de las longitudes preferidas (y rangos) se muestran en la sección de ejemplos.

15 En una realización preferida de la invención, la etapa de selección de secuencias de péptidos a partir de la secuencia del polipéptido parental de interés definido mediante los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa incluye además la etapa de selección de los fragmentos más cortos de la endopeptidasa de esa proteína de interés, preferiblemente los fragmentos más cortos de al menos cinco aminoácidos de longitud, preferiblemente los fragmentos más cortos de al menos 8 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, los patrones de péptidos definidos por los puntos de reconocimiento de la endopeptidasa se seleccionan entre las secuencias de péptidos más cortas así definidas.

20 Al seleccionar una secuencia de patrones de péptidos de un polipéptido parental (por ejemplo, albúmina), se pueden aplicar otros criterios ventajosos.

25 Uno de esos criterios se refiere a si el péptido es único/informativo para un polipéptido diana como la albúmina. Esto puede ser un factor de la complejidad de la secuencia o la frecuencia de ocurrencia de tales secuencias de péptidos en la muestra que se analiza, por ejemplo, los péptidos correspondientes a secuencias repetidas con frecuencia serían menos adecuados que las secuencias "raras" que son más propensas a ser únicas para la proteína diana y, por tanto, de mayor valor informativo si se detecta.

Otro de dichos criterios se refiere al nivel de ionización inicial; cuanto mayores son los iones doblemente cargados, más sensible será el sistema y/o mejor será la fragmentación.

35 Otro de esos criterios se refiere a la capacidad de generar una exploración de iones de producto razonable y/o seleccionar una transición de alta sensibilidad (MRM).

Por lo general, un péptido de 4-24 aminoácidos cumplirá los criterios señalados anteriormente. La determinación de si se cumplen o no esos criterios puede hacerla un operador experto de acuerdo con las indicaciones que figuran en el presente documento.

#### Endopeptidasas

40 Las endopeptidasas preferidas son aquellas que tienen un punto de reconocimiento definido. En especial, se prefieren las endopeptidasas tales como la tripsina o la endopeptidasa V8. La preferida es la tripsina. La tripsina tiene la ventaja de ser el patrón de la industria para la preparación de péptidos (a veces conocido como fragmentos de péptidos "internos") a partir de polipéptidos o proteínas más grandes, para el análisis de espectrometría de masas. La tripsina también tiene la ventaja de cortarse con frecuencia dentro de una secuencia de polipéptido dada, de forma que las pequeñas secuencias de péptidos es probable que se definan mediante la aparición de sus puntos de reconocimiento en el polipéptido parental de interés.

#### Polipéptidos de interés

50 El polipéptido de interés será cualquier polipéptido que se quiera detectar por espectrometría de masas. Habitualmente los polipéptidos de interés son aquellos que se pueden encontrar en los fluidos corporales de un paciente tales como suero, saliva u orina. El preferido es la albúmina. En particular, la invención encuentra una aplicación en la provisión de patrones de péptidos para utilizarlos como ayuda en el diagnóstico de la albuminuria.

#### Muestra

Preferiblemente, la muestra incluye el polipéptido objetivo a 1000 mg/litro o menos, preferiblemente a 100 mg/litro o menos, preferiblemente a 25 mg/litro o menos, preferiblemente a 1 mg/litro o menos. El polipéptido objetivo preferido

es el de una concentración de aproximadamente 25-1000mg/litro. Cuando el polipéptido objetivo es la albúmina, preferiblemente está presente en aproximadamente 1 mg/litro. Es evidente que la preparación de disoluciones al nivel apropiado es asunto del operador.

5 A modo de ilustración, la muestra puede incluir o estar formada por plasma. Cuando la muestra es plasma, y el polipéptido objetivo es la albúmina, el polipéptido objetivo está presente en una concentración inicial de 40 g/l (40.000 mg/l). Por lo tanto, sería adecuada una disolución inicial de 1:40. Es evidente, que cuando el polipéptido diana es una proteína de menor concentración, por ejemplo proteína de unión de retinol, entonces la disolución inicial óptima puede ser menor que, por ejemplo, 1:5.

10 Preferiblemente, los patrones de péptidos de la presente invención se aplican a las muestras con una concentración final de ensayo de aprox. 10 a 20 umol/litro. Los valores preferidos se dan en la sección de ejemplos.

La concentración del patrón interno es preferiblemente equivalente o superior a la concentración media del péptido que se desea medir. Por lo tanto, los valores dados en ejemplos de 10 a 20 mmol/l son típicamente conveniente para medir con precisión la concentración de péptido, después de la digestión triptica.

#### Marca

15 La marca es preferentemente una marca isotópica estable. Esto conduce a una diferencia de masa entre el patrón de péptido y el péptido no marcado de una composición de aminoácidos idéntica derivado del polipéptido objetivo en la muestra.

Preferiblemente se marcan los residuos de arginina y/o lisina.

#### Otras aplicaciones

20 La invención encuentra su aplicación en el análisis de MS de polipéptidos/proteínas. Esto puede ser cualitativo o cuantitativo. La detección de biomarcadores mediante MS, genotipación (es decir, la detección de polimorfismos de proteínas y la inferencia del genotipo de la misma), y cualquier otra aplicación de MS relacionada se benefician del uso de los patrones de péptidos y procedimientos de la presente invención. La MS en tándem ('MSMS') para el análisis de péptidos y las tecnologías de MS relacionadas son bien conocidas por las personas expertas en la técnica.

25 La invención encuentra su aplicación en la medición cuantitativa de los biomarcadores clínicamente significativos usando espectrometría de masas-espectrometría de masas por electrospray (MSMS).

30 El análisis utilizando péptidos cargados individualmente típicamente permite el análisis en un intervalo de masa de 0-2000 daltons (m/z) en una máquina típica. Las máquinas más sofisticadas pueden proporcionar un rango de 0 a 3000 daltons (m/z). En los procedimientos de análisis de acuerdo con la presente invención, se prefiere utilizar el análisis de péptido doblemente cargado. Esto proporciona beneficios tales como una mejor fragmentación y también se amplía ventajosamente el rango de masas viable del análisis, por ejemplo duplicándolo. Por lo tanto, mediante el análisis de péptidos doblemente cargados, se puede obtener un intervalo de masa de 0-4000 daltons (m/z) en una máquina típica, o 0-6000 daltons (m/z) en las máquinas más sofisticadas. Así, la invención se puede aplicar usando péptidos doblemente cargados para el análisis MRM, lo que supone un rango de masa potencial de 6.000 daltons.

35 La invención encuentra su aplicación en la referencia de corriente para la medición cuantitativa de péptidos de biomarcadores de proteínas utilizando la digestión de la proteasa (por ejemplo tripsina).

40 Los patrones de péptidos de la invención no necesitan corresponder de forma precisa con el péptido objetivo a detectar. Por ejemplo, los patrones de péptidos basados en la albúmina T6 se pueden utilizar como patrones de péptidos para el análisis de cualquier otro péptido, como los péptidos no-T6.

45 Es un beneficio de la invención que la eficacia de digestión se pueda comprobar internamente (controlar) en la misma muestra que se analiza. Por supuesto, en algunas aplicaciones las secuencias de patrones de péptidos se pueden digerir más rápidamente que la proteína entera. Esto es de esperar por motivos puramente termodinámicos. En consecuencia, el patrón de péptido no siempre controlará la eficacia de la digestión cuantitativa; sin embargo, la digestión del patrón de péptido es una prueba importante de la eficacia de la digestión, es decir, de que se ha producido una digestión eficaz. Este control proporciona una indicación ventajosa de que ha producido la digestión, y que ha ocurrido una digestión consistente. Este control proporciona de forma ventajosa un control para la reproducibilidad.

50 Para aplicaciones cuantitativas, se ensayan preferiblemente al menos tres péptidos por proteína. Esto tiene la ventaja de evitar la confusión de los resultados debido a los efectos de polimorfismos de proteínas.

Preferiblemente, se ensayan al menos dos transiciones por péptido, preferiblemente, se ensayan al menos tres transiciones por péptido.

Preferiblemente, los patrones de péptidos de la invención se derivan de regiones conservadas del polipéptido parental de interés.

La presente invención puede aplicarse de forma ventajosa a la determinación de polimorfismos genéticos. En esta realización, preferiblemente se analizan los péptidos derivados de la región polimórfica. Las características de un péptido que tiene un polimorfismo de aminoácidos determinado se pueden predecir, y la presencia o ausencia de estas especies se puede utilizar para inferir si el sujeto del que se toma la muestra es homocigótico o heterocigótico para un alelo particular. Típicamente, esto se llevará a cabo cuantitativamente de manera que una proporción de 100 a 0 indicaría la homocigosis para el primer alelo, una proporción de 50 a 50 indicaría heterocigosis, y una relación de 0 a 100 indicaría la homocigosis para el segundo alelo. Por otra parte, la observación de una relación de 0 (es decir, la ausencia) de un alelo particular puede proporcionar información útil al indicar que el sujeto no posee ese alelo, incluso si no se interroga a otros posibles alelos en ese momento.

La MSMS ha demostrado ser eficaz en la identificación de las variantes de las proteínas que son responsables de distintas enfermedades genéticas tales como la anemia de células falciformes. El procedimiento de identificación de variantes de proteínas implica el conocimiento de la secuencia del gen de la utilización normal y variante de la digestión enzimática de la proteína y el centrado en fragmentos específicos que contienen variantes.

La invención se puede aplicar de manera útil a las aplicaciones de multiplexación. En este escenario, se pueden incluir múltiples patrones de péptidos derivados de múltiples polipéptidos parentales en la misma muestra, o en el mismo kit. Esto tiene la ventaja de permitir el control interno y la normalización para la detección de múltiples especies de proteínas objetivo a partir de una sola muestra.

Como alternativa, los patrones de péptido que tienen la misma secuencia de aminoácidos se pueden utilizar en aplicaciones de multiplexación, tales como multiplexación de concentración (véase más adelante). En esta realización, los péptidos difieren con respecto al marcado de isótopos estables. Esto puede ser una diferencia de grado (por ejemplo, misma marca, diferentes números de átomos por péptido) o una diferencia cualitativa (por ejemplo, diferentes marcas de isótopos estables utilizados en 2 péptidos diferentes de la misma secuencia). Mientras las masas finales de los péptidos escindidos difieren para permitir la diferenciación, el modo particular de lograr esta variación es cuestión del operador.

Una aplicación de multiplexación adicional se produce para los patrones en múltiples concentraciones diferentes. En esta realización, los diferentes patrones de péptido de acuerdo con la invención se incluirían en los patrones o kits de la invención a diferentes concentraciones. Esto tiene la ventaja de permitir que las muestras y el giro de las diferentes concentraciones de las especies objetivo se controlen mediante la adición de una sola parte alícuota del patrón de péptido o mezcla. Esto se debe a que la espectrometría de masa efectiva de la muestra tiene que ser diluida para dejar un polipéptido objetivo dentro de un intervalo de concentración particular, para facilitar la detección. Si al principio no se conoce la concentración del polipéptido objetivo en la muestra, entonces la dosificación de la muestra de la concentración apropiada de patrón de péptido puede ser difícil. Mediante la inclusión de diferentes patrones de péptidos a diferentes concentraciones, la misma muestra se podría diluir en muchos órdenes de magnitud y el operador podría simplemente seleccionar el patrón de péptido de la concentración/disolución apropiada con el fin de controlar esa muestra particular de forma retrospectiva. Esto tiene la ventaja de no tener que determinar la concentración inicial del polipéptido objetivo para la detección antes de la dosificación de la muestra con el patrón de péptido. Por lo tanto, esto elimina el derroche del análisis 'de prueba' al permitir que múltiples concentraciones de proteína objetivo se puedan controlar mediante la administración de una dosis única de patrones de péptidos.

Será evidente para un lector experto que la operación de la invención se ha descrito en el modo "C-terminal" para facilitar la comprensión. Claramente, esto podría revertirse/invertirse y la invención podría realizarse en modo "N-terminal". En este escenario, el experto simplemente ajustaría la construcción de los péptidos/procedimientos de acuerdo con los principios establecidos en ella. Por ejemplo, en el modo N-terminal la escisión sería N-terminal, los péptidos tendrían extensiones N-terminales, el aminoácido N-terminal se eliminaría mediante escisión, controlando así la digestión, la marca de isótopos estables se realizaría de manera C-terminal del punto de escisión para ser conservada por el patrón de péptido escindido y así sucesivamente. La reversión/inversión de esta manera está dentro de las capacidades del experto en vista de la orientación proporcionada en el presente documento.

La invención se describe ahora a modo de ejemplo. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes, sino que son de naturaleza ilustrativa. En los ejemplos, se hace referencia a las siguientes figuras.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama.

Las figuras 2 a 10 muestran gráficos. La Figura 11 muestra una gráfica de dispersión.

La Figura 12 muestra un gráfico.

### Ejemplos

**Ejemplo 1: Digestión de patrón de péptidos y análisis de MS**

Los inventores han sintetizado un péptido marcado con isótopos estables (la lisina C-terminal U-13C6, U-15N2 marcada) que nos permite medir cuantitativamente el péptido T6 de albúmina humana (LVNEVTEFAK\*). Esto es para la comparación (no forma parte de la invención) y no nos proporciona ninguna información sobre la digestión.

- 5 Sin embargo, si utilizamos un patrón de péptido de acuerdo con la presente invención, como el LVNEVTEFAK\*T (T es el primer aminoácido de T7) esto requiere la digestión para liberar LVNEVTEFAK\*, proporcionando información sobre la digestión y corrigiendo la supresión de iones.

Los inventores probaron péptidos incluyendo hasta 5 de los primeros aminoácidos de T7 para ver cómo son de necesarios. El análisis del punto activo de la tripsina sugiere que necesitamos sólo la de un aminoácido. Incluso si añadimos una extensión C-terminal de hasta 6 aminoácidos, la síntesis es relativamente simple y barata (a diferencia de la producción por expresión de la proteína). Esto se puede aplicar a cualquier análisis de proteínas.

*Procedimiento*

Los inventores han demostrado esto con el péptido T6 de albúmina como modelo. La secuencia de aminoácidos del péptido T6 de albúmina humana es LVNEVTEFAK. Hemos producido el péptido T6 y entre 1 y 5 de los aminoácidos T7, es decir,

- 15 LVNEVTEFAKT (péptido 1)  
 LVNEVTEFAKTC (péptido 2)  
 LVNEVTEFAKTCV (péptido 3)  
 LVNEVTEFAKTCVA (péptido 4)  
 20 LVNEVTEFAKTCVAD (péptido 5)

Además, Los inventores han obtenido el péptido T6 y el péptido T6 + 1 sintetizados con lisina marcada con 6 átomos de carbono 13 y 2 átomos de nitrógeno 15, es decir, LVNEVTEFAK\* (péptido 7) y LVNEVTEFAK\*T (péptido 8).

En el primer experimento se probó la hipótesis de que el péptido LVNEVTEFAKT se escinde en LVNEVTEFAK mediante tripsina de forma tan eficientemente como los péptidos más largos. Usando LVNEVTEFAK\* como péptidos de patrón interno (1-5, y 8) se digirieron utilizando el protocolo estándar. Los resultados fueron concluyentes: los péptidos 1, 3, 4 y 5 demostraron una señal equivalente para LVNEVTEFAK usando 3 MRM diferentes. La digestión triptica del péptido 8 no demostró ninguna señal para el LVNEVTEFAK pero la señal del LVNEVTEFAK\* se incrementó en la cantidad esperada. La sorpresa fue con el péptido 2, LVNEVTEFAKTC, donde no había prácticamente ninguna señal para el LVNEVTEFAK (¿formación de disulfuro?). Esto implica que cualquier péptido de patrón interno, donde la cistina es el aminoácido N-terminal precisará además el siguiente aminoácido para ser eficaz.

El segundo experimento fue para demostrar la función del patrón interno en un ensayo real. El material del patrón de albúmina humana se diluyó en un rango de 25 1000 mg/l y se digirió utilizando nuestro protocolo estándar. El LVNEVTEFAK\*T se añadió a todas las muestra como patrón interno y la relación de isótopos, LVNEVTEFAK/LVNEVTEFAK\*, se representó frente a la concentración de albúmina. Se observó una linealidad excelente para el péptido T6 utilizando las 3 transiciones. Los péptidos T31, T34 y T70 se incluyeron utilizando la señal del LVNEVTEFAK\* y, como se esperaba, los resultados fueron peores. El mismo experimento se repitió con plasma humano diluido inicialmente en una proporción 1:40 (aproximadamente 1 g/l) y después se diluyó como el patrón anterior. Las líneas son prácticamente superponibles.

**Ejemplo 2: MS con los patrones de péptidos de la invención**

En este ejemplo se demuestra la cuantificación de proteínas de la disolución del isótopo estable utilizando el marcado de isótopos estables de péptidos.

Un problema es que los péptidos marcados de isótopos estables equivalentes a los péptidos naturales liberados por digestión triptica de una proteína (ejemplo péptido T6 de la albúmina) se corregirán para la supresión de iones y la eficiencia de la fragmentación, pero no para la eficacia de la digestión triptica.

Según la invención, la adición de aminoácidos de secuencia natural al isótopo estable marcado de arginina/lisina C-terminal corregirá la eficacia de la digestión triptica, la supresión de iones y la eficiencia de la fragmentación del péptido

Hay que hacer notar que la lisina/arginina C-terminal están etiquetadas, la carga tenderá a localizarse con la lisina/arginina y los fragmentos de iones del producto de la serie y de la cuantificación conservarán la marca de isótopos estables.

Este ejemplo investiga si la adición de un único aminoácido para la arginina/lisina marcada de isótopo estable en el extremo C-terminal de un péptido normalmente liberada mediante tripsina es suficiente para corregir la eficacia de la digestión triptica, la supresión de iones y la eficiencia de la fragmentación del péptido.

- 5 Cabe señalar que el aumento del número de aminoácidos secuenciales y/o aminoácidos no secuenciales también va a funcionar, pero de acuerdo con la invención, la longitud del patrón de péptido se reduce ventajosamente, lo que proporciona ventajas tales como menor coste, menor complejidad, recuperación más fácil y otros.

*Experimento para determinar el número de aminoácidos requeridos siguiendo el punto de digestión de la tripsina para su digestión.*

	Péptidos	Peso moles	Concentración (g/l)	Concentración (mmol/l)	Concentración del ensayo (µmol/l)
1	LVNEVTEFAKT	1249,7	1	0,800	16,0
2	LVNEVTEFAKTC	1352,6	1	0,739	14,8
3	LVNEVTEFAKTCV	1451,7	1	0,689	13,8
4	LVNEVTEFAKTCVA	1522,8	1	0,657	13,1
5	LVNEVTEFAKTCVAD	1637,8	1	0,611	12,2
6	LVNEVTEFAKNDCTTM	1813,8	0,5	0,276	11,0
8	LVNEVTEFAK*T	1257,7	0,5	0,398	15,9
Patrón interno	LVNEVTEFAK*	1156,6	1	0,865	17,3

- 10 K \* es lisina marcada con 13 átomos de carbono 6 y 15 átomos de nitrógeno 2.

Los péptidos 1, 2, 3, 4, 5 y el patrón interno se diluyeron a c.1mg/l (en base a los proveedores de peso indicados, NB 100% no péptido) con agua desionizada

Los péptidos 6 y 8 resultaron difíciles de disolver, concentración final c. 500 µg/l Los péptidos se almacenaron a -80°C en alícuotas de 2ml

- 15 Los péptidos, 1 mg/l, se diluyeron a 1:50 con agua desionizada y 500µg/l a 1:25 para el experimento

*Ensayo*

50µl de péptidos 1-6 y 8 (la muestra en blanco fue agua desionizada) + 50µl patrón interno

Añadir 10µl de acetonitrilo y 10µl de ácido fórmico al 1%, mezcla de vórtice y dejar durante 5 minutos

Añadir 6µl de bicarbonato de amonio 1M y 5µl de tripsina (5 mg/l), mezcla de vórtice y centrifugar (6s)

- 20 Incubar a 37 ° C durante 30 minutos y añadir 500µl de disolvente HPLC (acetonitrilo: agua (1:1) con un 0,025% de ácido fórmico)

Mezcla de vórtice y trasladar a una placa de polipropileno de un pozo de profundidad 96

Volumen de la muestra, 5µl; velocidad de flujo, 500µl/min

Columna de protección de teicoplanina de cromatografía

- 25 Ionización del péptido genérico de los parámetros de la MSMS e ión doblemente cargado T6 de fragmentación del ión doblemente cargado m/z 575,4 y patrón interno m/z 579,4

Iones del producto (m/z): Normas 937,4, 823,4, 694,4 del patrón interno (m/z): 945,4, 831,4, 702,4 (150ms/MRM)

Resultados

ES 2 526 923 T3

Nombre/ID de muestra	Analito	Área del pico del analito (recuento)	Proporción de área	Área del pico de IS (recuento)	Área del pico del analito/ $\mu\text{mol/l}$ de péptido (AP)	Área del pico AP/IS
Muestra de blanco	T6 694	212	0,00165	128000		
1	T6 694	124000	1,01000	122000	7748	0,064
2	T6 694	1350	0,01040	130000	91	0,001
3	T6 694	84500	0,66900	126000	6133	0,049
4	T6 694	68000	0,53300	127000	5178	0,041
5	T6 694	92500	0,72800	127000	7575	0,060
6	T6 694	51000	0,39500	129000	4625	0,036
8	T6 694	149	0,00062	238000		
Muestra de blanco	T6 823	93	0,00204	45800		
1	T6 823	49400	1,13000	43900	3087	0,070
2	T6 823	469	0,01020	46000	32	0,001
3	T6 823	32100	0,68700	46800	2330	0,050
4	T6 823	26900	0,58300	46100	2048	0,044
5	T6 823	37700	0,80000	47200	3087	0,065
6	T6 823	19900	0,42200	47200	1805	0,038
8	T6 823	62	0,00074	83000		
Muestra de blanco	T6 937	101	0,00078	130000		
1	T6 937	144000	1,13000	128000	8998	0,070
2	T6 937	1760	0,01380	128000	119	0,001
3	T6 937	94600	0,71200	133000	6867	0,052
4	T6 937	81600	0,58800	139000	6213	0,045
5	T6 937	109000	0,80200	136000	8926	0,066
6	T6 937	56800	0,42600	133000	5151	0,039
8	T6 937	147	0,00058	253000		

Además, los resultados se presentan en las figuras 2 a 10.

Área del patrón interno

5	T6 694	T6 823	T6 937
	Media (Muestra en blanco, 1-6)	127000	46143 132429
	IS + péptido 8	23800	83000 253000

Proporción 1,87 1,80 1,91

Por lo tanto se demuestra que sólo se requiere la adición de un único aminoácido C-terminal (es decir, una extensión C-terminal de un sólo 1 aminoácido) para la digestión.

5 Se muestra que con la adición de un aminoácido la liberación del péptido objetivo es al menos tan buena como con 3, 4, 5 y 6 aminoácidos dentro de los límites del experimento (la concentración de péptido inicial no se mide físicamente).

10 La adición de más de un aminoácido en la secuencia (es decir, la extensión C-terminal de 2 a 5 o 6 aminoácidos o incluso más) o el uso de un conjunto de no-secuencia de aminoácidos (es decir, la secuencia de la extensión C-terminal no se basa en aminoácidos correspondientes del polipéptido original) también puede ser utilizado por el operador.

Cabe señalar que con cisteína como péptido C-terminal la digestión está limitada. Así, preferiblemente, la cisteína no es el péptido C-terminal. Sin desear estar obligado por la teoría, este efecto puede deberse a la formación de enlaces/interferencia de unión del disulfuro.

15 La adición de péptido 8, el patrón interno preferido para corregir la eficiencia de la digestión triptica, la supresión de iones y la fragmentación los de péptidos, indica una recuperación total, dentro de los límites del experimento.

Las señales para los 3 MRMs son, como era de esperar, diferentes, pero son consistentes entre los péptidos.

El patrón interno utilizado en este experimento (sin que la extensión C-terminal forme parte de la invención para fines de comparación solamente) no puede corregir la eficiencia de la digestión triptica, pero sí la supresión de iones y fragmentación del péptido (columna I).

20 Así es, se muestra que, de conformidad con la presente invención un patrón de péptido como LVNEVTEFAK \* T es la secuencia de péptido consistente más simple que corregirá para la eficiencia de la digestión triptica, la supresión de iones y la fragmentación. En este ejemplo, se evaluaron estos criterios en el contexto del péptido T6 de la albúmina.

25 El marcado de isótopos estables de péptidos tripticos de la arginina/lisina C-terminal además de al menos otro aminoácido (normalmente el siguiente aminoácido secuencial) como la extensión C-terminal se demuestra como principio general.

Se pueden emplear otras enzimas proteolíticas (preferiblemente endopeptidasas) de la misma manera, ajustándolas para su punto de escisión/secuencia de reconocimiento según sea necesario.

**Ejemplo 3: Aplicación al análisis de péptidos no coincidentes**

30 Los patrones de péptidos de la invención no necesitan corresponderse de forma precisa con el péptido objetivo a detectar. Por ejemplo, los patrones de péptidos basados en el péptido de albúmina T6 se han demostrado en los ejemplos anteriores en el análisis del propio péptido de albúmina T6. Sin embargo, los patrones de péptidos basado en T6 encuentran su aplicación en el análisis de cualquier otro péptido, ya que proporcionan la misma información de control interno, independientemente del péptido objetivo en el que se centre en la interpretación de los resultados. En particular, en este ejemplo los patrones de péptido basados en T6 de la invención se utilizan en el análisis de otros péptidos, por ejemplo los péptidos T31, T34, T70 o cualquier otro péptido de interés. Esto se aplica igualmente para utilizar como patrones de péptidos convencionales o como patrones de péptidos internos.

**Ejemplo 4: Medición cuantitativa de albúmina plasmática mediante el análisis basado en péptidos**

Cuantificación del péptido T6 (LVNEYTEFAK) por espectroscopía de masas de electrospray-espectroscopía de masas de cromatografía líquida de disolución de isótopos estable

40 Patrón interno de isótopos estables, LVNEYTEFAK\*T (véase más arriba para el marcado)

Precisión y datos comparativos

Experimento 1. Precisión interensayo de la MSMS, plasma ensayado 6 veces

45 Experimento 2. Muestra en blanco, patrón de albúmina (82,2mg/l), controles de albúmina plasmática de Dade Behring (L, M, H) y se midieron 36 muestras de plasma anónimas en una nefelometría láser Dade Behring BN Prospec (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y por MSMS

Plasma diluido 1:100 con agua desionizada

Patrón interno, LVNEVTEFAK\*T (c.500µg/l) diluido 1:50 con agua desionizada

Ensayo

50µl muestra en blanco/patrón + 50µl de patrón interno

Añadir 10µl de acetonitrilo y 10µl de ácido fórmico al 1%, mezcla de vórtice y dejar durante 5 minutos

Añadir 6µl de bicarbonato de amonio 1M y 10µl de tripsina (5 mg/l), mezcla de vórtice y centrifugar (6s)

5 Incubar a 37 °C durante 30 minutos y añadir 250µl de disolvente fluido (acetonitrilo:agua (1:1) con un 0,025% de ácido fórmico)

Mezcla de vórtice y trasladar a una placa de polipropileno de un pozo de profundidad 96

Volumen de la muestra, 5µl; velocidad de flujo, 500µl/min

Cromatografía Chirobiotic T columna de 100 x 2,1mm con una columna de protección de 2cm x 4,0mm (Advanced Separation Technologies, Congleton, Reino Unido)

10 Ionización del péptido genérico de los parámetros de la MSMS e ión doblemente cargado T6 de fragmentación del ión doblemente cargado m/z 575,4 y patrón interno m/z 579,4 Iones del producto (m/z): Patrón interno (m/z) 937,4, 823,4, 694,4: 945,4, 831,4, 702,4 (150ms/MRM)

Nota: se incluyeron las adquisiciones de MRM adicionales (de 150ms cada una) para el péptido T31 (m/z 337,3/416,3), el péptido T34 (m/z 441,0/680,5), el péptido T70 (m/z 501,2/587,5) y el péptido T6 (m/z 575,4/937,4)

15 Resultados

Los resultados NB se calculan dividiendo el área del analito entre el área del patrón interno equivalente, la relación isotópica (IR). Sólo se presentan datos para el péptido T6 (m/z 575,4/937,4, 579,4/945,4). Los datos comparables se obtuvieron para las transiciones menos sensibles en el péptido T6

Experimento de precisión:

20 La media de la concentración de albúmina 43,3 g/l, CV 4,51% (véase la precisión ALB y la comparación de datos que se presenta a continuación y las figuras 11 y 12)

Experimento de comparación

Los valores de control Dade Behring eran, albúmina plasmática (g/l):

	Control	Res BN Prospec	Res MSMS	Res MSMS Media	Inter esper (l fabricante)
25	L	29,8	30,0, 31,8	30,9	26,3 - 35,5
	M	42,7	52,4, 45,1	48,8	39,6 - 53,6
	H	58,7	68,2, 75,8	72,0	55,6 - 75,3

(véase la precisión ALB y la comparación de datos que se presenta a continuación y las figuras 11 y 12)

30 En promedio, la concentración calculada de albúmina en plasma calculada mediante disolución de isótopos estables del péptido T6 era 3 g/l (intervalo 36,9 a -10,8 g/l) mayor que la medida por el inmunoensayo de nefelómetro láser de Dade Behring (véase el gráfico de diferencia de la figura 11)

La correlación fue altamente significativa, r=0,6888 (véase el gráfico de correlación de la figura 12)

35 La medición de la albúmina plasmática utilizando una disolución de isótopos estables (LVNEVTEFAK\*T) del péptido T6 demostró una precisión del 4,5%. Esto está de acuerdo con los datos presentados en los ejemplos anteriores. No se presentan los datos equivalentes de ensayos basados en inmunoensayo o fijación de tinte, pero un 5% se considera razonable. Tenga en cuenta los rangos de los valores de control de ancho (ver arriba) indicados para el inmunoensayo Dade Behring.

40 Dada la especificidad del procedimiento de MSMS de disolución de isótopos estables y el uso de la industria de diagnóstico de los procedimientos de MSMS de disolución de isótopos estables como procedimientos de referencia, el rendimiento del inmunoensayo podría considerarse decepcionante. No se aplica fácilmente el procedimiento del patrón de "oro". El inmunoensayo Dade Behring se tomó como el procedimiento de referencia para la comparación. Sin desear estar obligado por la teoría, cabe señalar que los dos procedimientos miden cosas diferentes.

45 Los inventores presentaron la primera comparación directa de la medición de la MSMS de disolución de un isótopo estable basado en péptido de una proteína clínicamente de diagnóstico con un inmunoensayo clínico establecido. Los resultados indican que la medición MSMS utilizando el concepto de la invención (es decir, isótopos estables de péptido más 1-6 aminoácidos, en este ejemplo un aminoácido, como patrón interno) es precisa y clínicamente útil.

Como un medio de medición de proteínas clínicamente de diagnóstico, el sistema de MSMS ofrece una capacidad de multiplexación significativa que puede resultar más valiosa que la facilidad de uso percibida de los sistemas de inmunoensayo y fijación de tinte. Por lo tanto se demuestra la utilidad y el rendimiento de la invención. Las gráficas de correlación (Figura 12) y diferencia (Figura 11) se determinaron utilizando los datos marcados (asterisco):

Nombre de la muestra de correlación	Tipo de muestra	Nombre del pico de analito	Concentración calculada de T6 de albúmina (g/l)	Albúmina BN Prospec (g/l)	Diferencia
Muestra de blanco	Patrón	T6 de albúmina			
Patrón Alb 82 g/l	Patrón	T6 de albúmina	79,4	82,0*	-2,6
DB LQC	Desconocido	T6 de albúmina	30,0	29,8*	0,2
DB MQC	Desconocido	T6 de albúmina	52,4	42,7*	9,7
DB HQC	Desconocido	T6 de albúmina	68,2	58,7*	9,5
P1	Desconocido	T6 de albúmina	40,1	43,3*	-3,2
P2	Desconocido	T6 de albúmina	38,7	38,8*	-0,1
P3	Desconocido	T6 de albúmina	32,9	39,3*	-6,4
P4	Desconocido	T6 de albúmina	32,2	38,4*	-6,2
P5	Desconocido	T6 de albúmina	43,2	37,2*	6,0
P6	Desconocido	T6 de albúmina	49,6	41,1*	8,5
P7	Desconocido	T6 de albúmina	31,2	35,3*	-4,1
P8	Desconocido	T6 de albúmina	57,5	46,6*	10,9
P9	Desconocido	T6 de albúmina	47,7	42,8*	4,9
P10	Desconocido	T6 de albúmina	32,0	28,0*	4,0
P11	Desconocido	T6 de albúmina	37,6	40,3*	-2,7
P12	Desconocido	T6 de albúmina	52,3	41,3*	11,0

ES 2 526 923 T3

Nombre de la muestra de correlación	Tipo de muestra	Nombre del pico de analito	Concentración calculada de T6 de albúmina (g/l)	Albúmina BN Prospec (g/l)	Diferencia
P13	Desconocido	T6 de albúmina	37,8	39,4*	-1,6
P14	Desconocido	T6 de albúmina	32,4	43,2*	-10,8
P15	Desconocido	T6 de albúmina	45,7	46,7*	-1,0
P16	Desconocido	T6 de albúmina	60,5	43,3*	17,2
P17	Desconocido	T6 de albúmina	43,4	38,4*	5,0
P18	Desconocido	T6 de albúmina	36,9	40,8*	-3,9
P19	Desconocido	T6 de albúmina	53,3	43,4*	9,9
P20	Desconocido	T6 de albúmina	41,6	38,3*	3,3
P21	Desconocido	T6 de albúmina	46,1	40,8*	5,3
P22	Desconocido	T6 de albúmina	40,6	44,1*	-3,5
P23	Desconocido	T6 de albúmina	37,8	34,5*	3,3
P24	Desconocido	T6 de albúmina	46,7	38,7*	8,0
P25	Desconocido	T6 de albúmina	39,5	38,1*	1,4
P26	Desconocido	T6 de albúmina	35,3	41,8*	-6,5
P27	Desconocido	T6 de albúmina	37,1	39,4*	-2,3
P28	Desconocido	T6 de albúmina	76,5	39,6*	36,9
P29	Desconocido	T6 de albúmina	47,3	40,6*	6,7
P30	Desconocido	T6 de albúmina	40,8	40,5*	0,3
P31	Desconocido	T6 de albúmina	38,8	43,0*	-4,2
P32	Desconocido	T6 de albúmina	34,9	39,5*	-4,6
P33	Desconocido	T6 de albúmina	42,1	41,1*	1,0
P34	Desconocido	T6 de albúmina	55,2	41,6*	13,6
P35	Desconocido	T6 de albúmina	48,0	42,9*	5,1
P36	Desconocido	T6 de albúmina	50,4	44,3*	6,1
Muestra de blanco	Patrón	T6 de albúmina			
Patrón Alb 82 g/l	Patrón	T6 de albúmina	84,6	Media 82,0	3,1
DB LQC	Desconocido	T6 de albúmina	31,8	29,8	
DB MQC	Albúmina desconocida	T6	45,1	42,7	
DB HQC	Desconocido	T6 de albúmina	75,8	58,7	

## ES 2 526 923 T3

Precisión interensayo

Muestra de plasma diluido 1:100 seis disoluciones separadas

		Concentración calculada (g/l)
5		46,0
		41,2
		44,4
		41,8
		41,8
		44,6
10	Media	43.3
	DS	1,95
	CV%	4.51

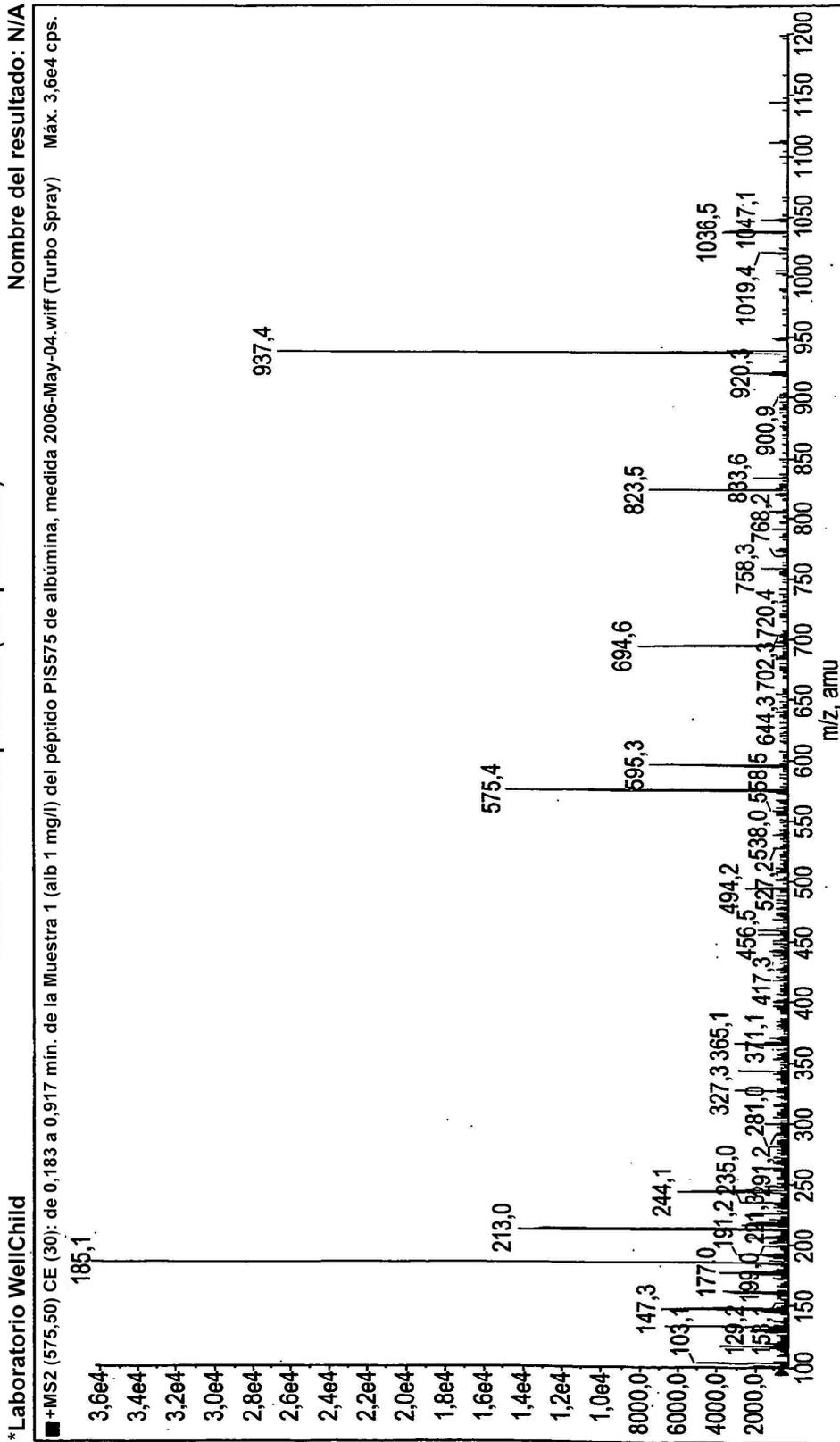
15 Diversas modificaciones y variaciones de los aspectos y realizaciones descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del ámbito de la presente invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con las realizaciones preferentes, deberá comprenderse que la invención, de acuerdo con sus reivindicaciones, no debería limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en este u otros campos relacionados están incluidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de un patrón de péptido para espectrometría de masas comprendiendo dicho procedimiento
  - 5 (a) la identificación de los puntos de escisión de la endopeptidasa en una secuencia de polipéptido parental de interés;
  - (b) la selección de secuencias de péptido a partir de dicho polipéptido parental que son definidos mediante los puntos de escisión de endopeptidasa de la etapa (a),
  - (c) la adición de una extensión C-terminal a cada secuencia seleccionada,
  - 10 en la que si el punto de escisión de endopeptidasa es C-terminal para su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende de 1 a 6 aminoácidos,
  - en la que si el punto de escisión de endopeptidasa es N-terminal para su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende dicha secuencia de reconocimiento,
  - 15 en la que si el punto de escisión de endopeptidasa está dentro de su secuencia de reconocimiento entonces la extensión C-terminal comprende el resto de dicha secuencia de reconocimiento de C-terminal para el punto de escisión; y
  - (d) la síntesis de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos extendida de la etapa (c).
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los aminoácidos 1 a 6 de la etapa (c) son idénticos a los aminoácidos 1 a 6 que siguen inmediatamente al punto de reconocimiento de la endopeptidasa en la
  - 20 secuencia del polipéptido de interés
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los aminoácidos 1 a 6 aminoácidos de la etapa (c) son de 1 a 5 aminoácidos y dichos 1 a 5 aminoácidos son TCVAD.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la síntesis del péptido es por
  - 25 medios químicos.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dicho péptido está marcado con isótopo estable.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que dicho isótopo es carbono 13 y/o nitrógeno 15.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dicha endopeptidasa en una
  - 30 endopeptidasa única.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dicha endopeptidasa es seleccionada el grupo que consiste en tripsina y V8.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la endopeptidasa mencionada es tripsina.
10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido parental es
  - 35 albúmina.
11. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LVNEVTEFAKT, LVNEVTEFAKTC, LVNEVTEFAKTCV, LVNEVTEFAKTCVA, y LVNEVTEFAKTCVAD.



Péptido T6 de albúmina humana  
 Ión doblemente cargado m/z 575,4  
 Medida del ión del producto (no optimizada)



Hora de impresión: 11:29:14  
 Fecha de impresión: 5 de septiembre de 2006

FIG. 2

Series de péptidos sintetizados – sin péptidos no marcados añadidos

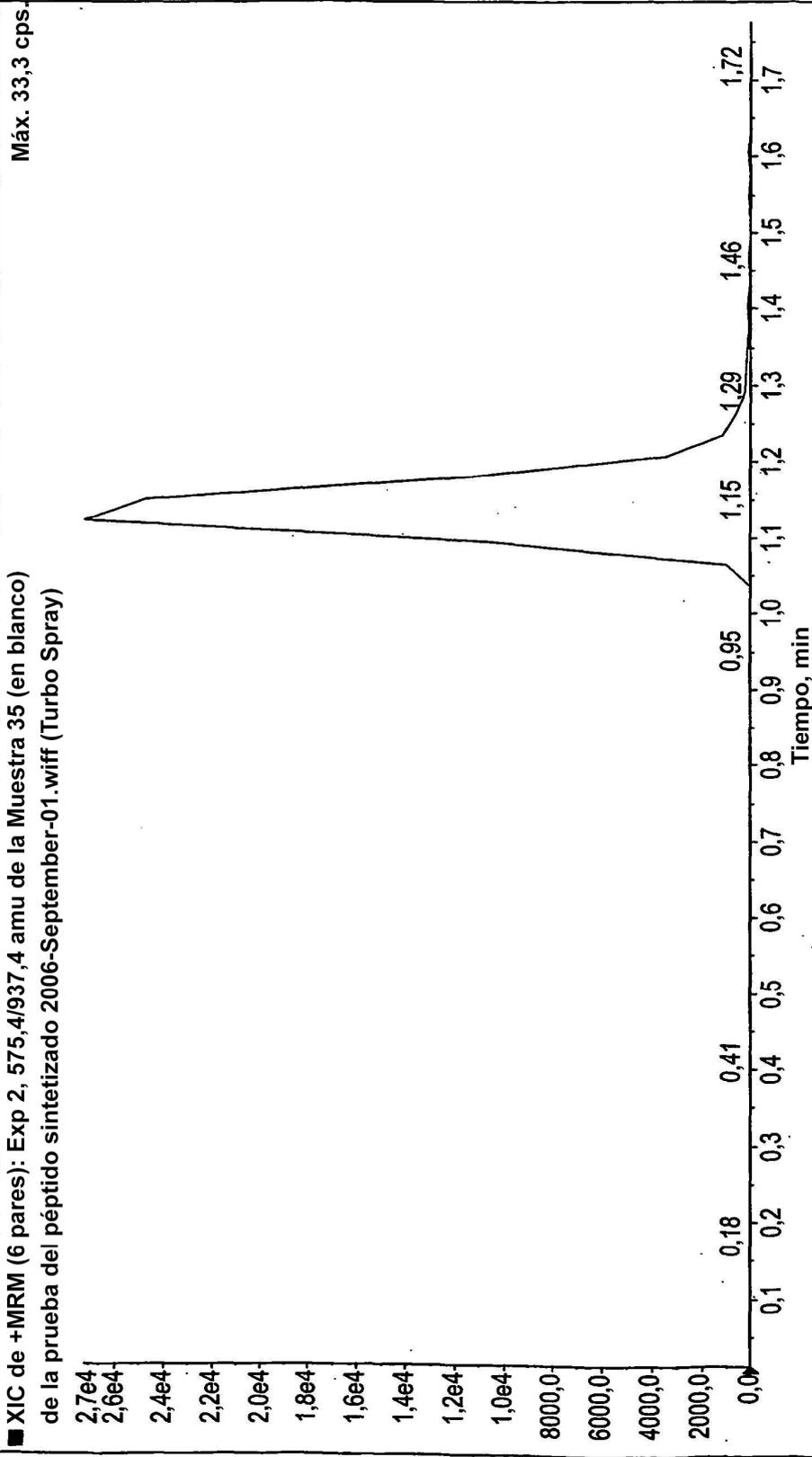
Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

MRM m/z 579,4/945,4 (rojo – pico marcado)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A



Hora de impresión: 08:53:13

Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

FIG. 3

Series de péptidos sintetizados – LVNEVTEFAKT

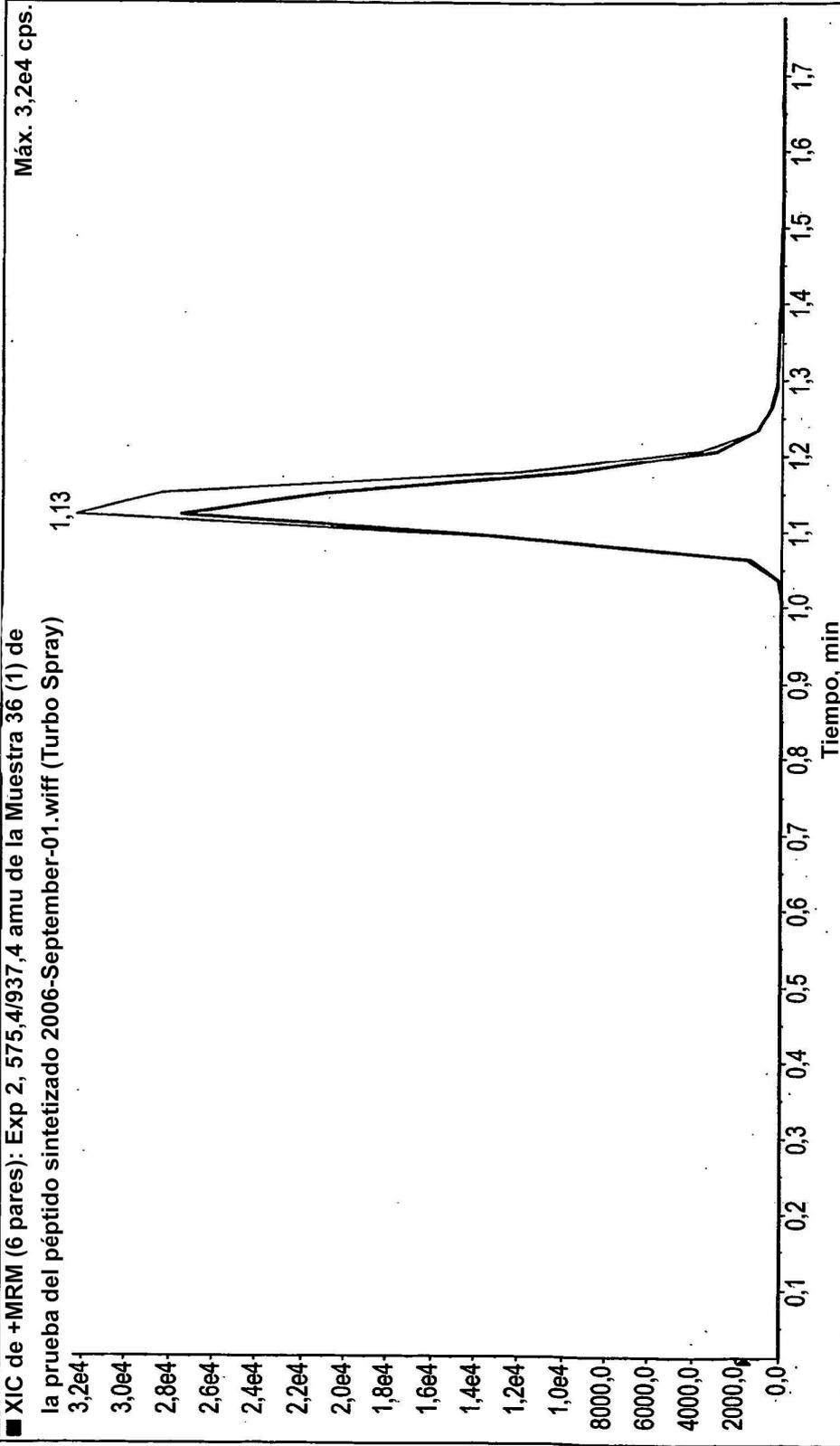
Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul – pico más alto)

MRM m/z 579,4/945,4 (rojo)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A



Hora de impresión: 09:06:04

Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

FIG. 4

Series de péptidos sintetizados – LVNEVTEFAKTC

Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

MRM m/z 579,4/945,4 (rojo – pico más alto)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A

Máx. 460,0 cps.

■ XIC de +MRM (6 pares): Exp 2, 575,4/937,4 amu de la Muestra 37 (2) de la prueba del péptido sintetizado 2006-September-01.wiff (Turbo Spray)

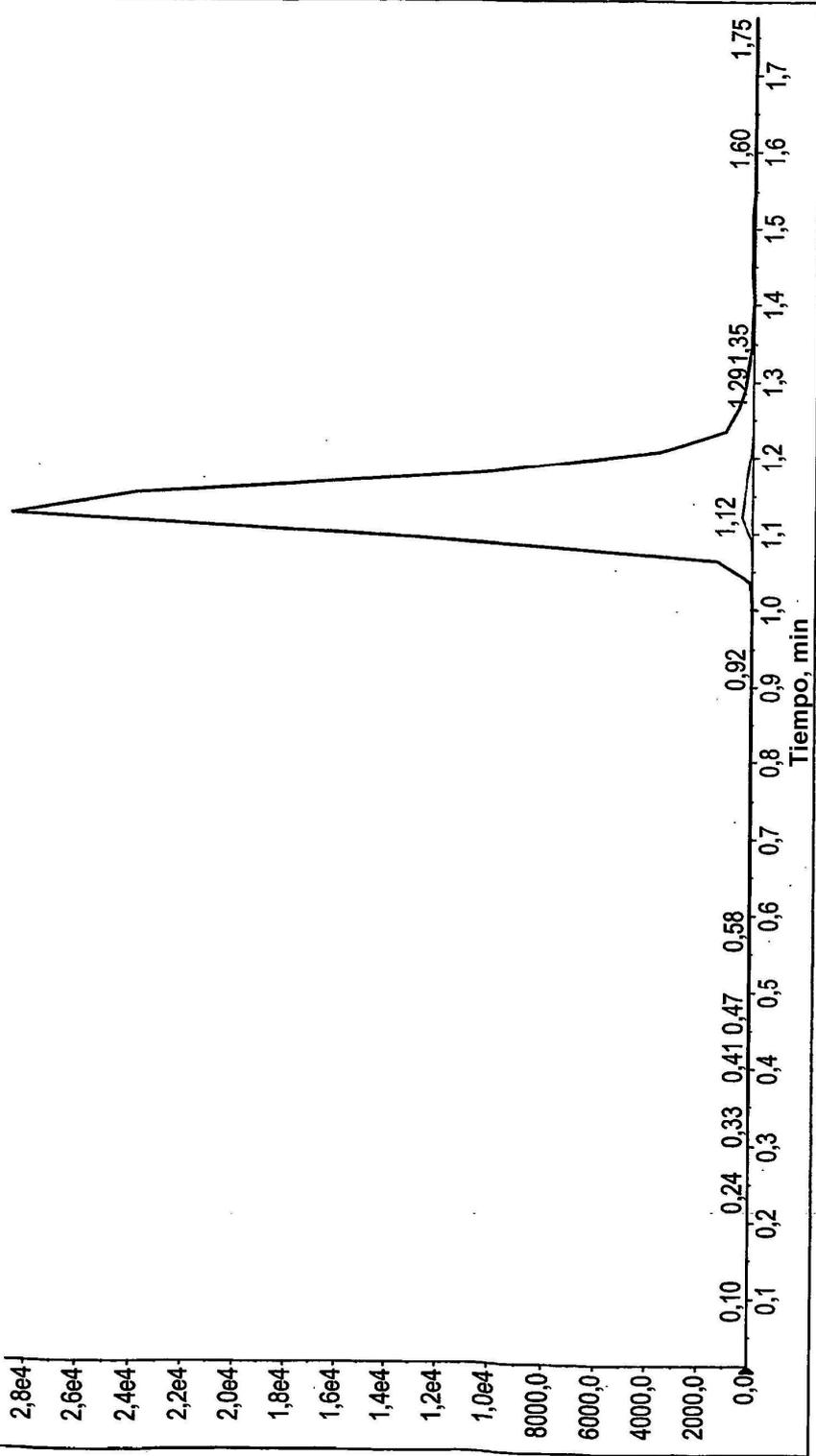


FIG. 5

Hora de impresión: 09:08:27  
 Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

Series de péptidos sintetizados – LVNEVTEFAKTCV

Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

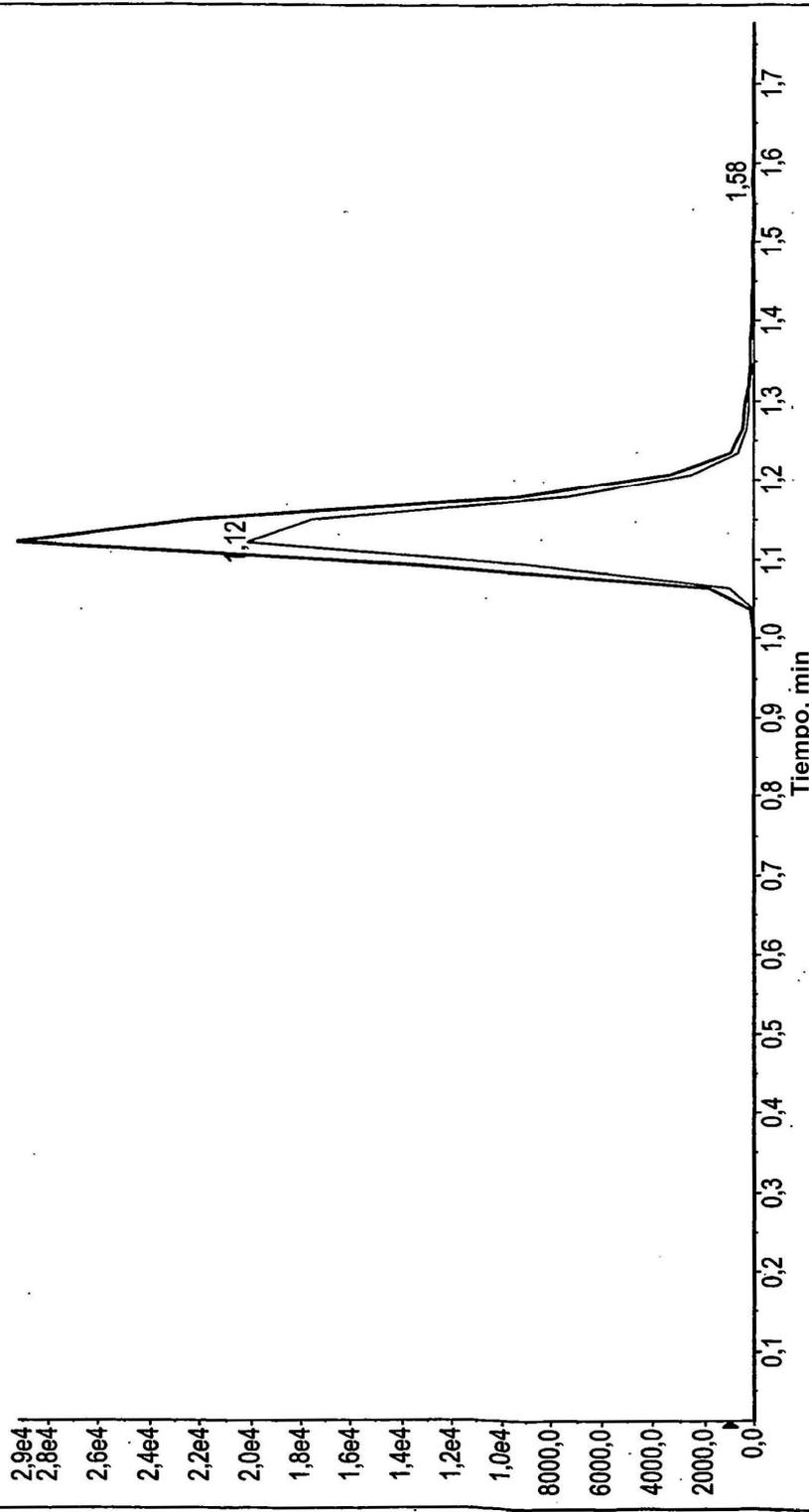
MRM m/z 579,4/945,4 (rojo – pico más alto)

Nombre del resultado: N/A

Máx. 2,0e4 cps.

\*Laboratorio WellChild

■ XIC de +MRM (6 pares): Exp 2, 575,4/937,4 amu de la Muestra 38 (3) de la prueba del péptido sintetizado 2006-September-01.wiff (Turbo Spray)



Hora de impresión: 09:11:08

Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

FIG. 6

Series de péptidos sintetizados – LVNEVTEFAKTCVA

Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

MRM m/z 579,4/945,4 (rojo – pico más alto)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A

Máx. 1,7e4 cps.

■ XIC de +MRM (6 pares): Exp 2, 575,4/937,4 amu de la Muestra 39 (4) de la prueba del péptido sintetizado 2006-September-01.wiff (Turbo Spray)

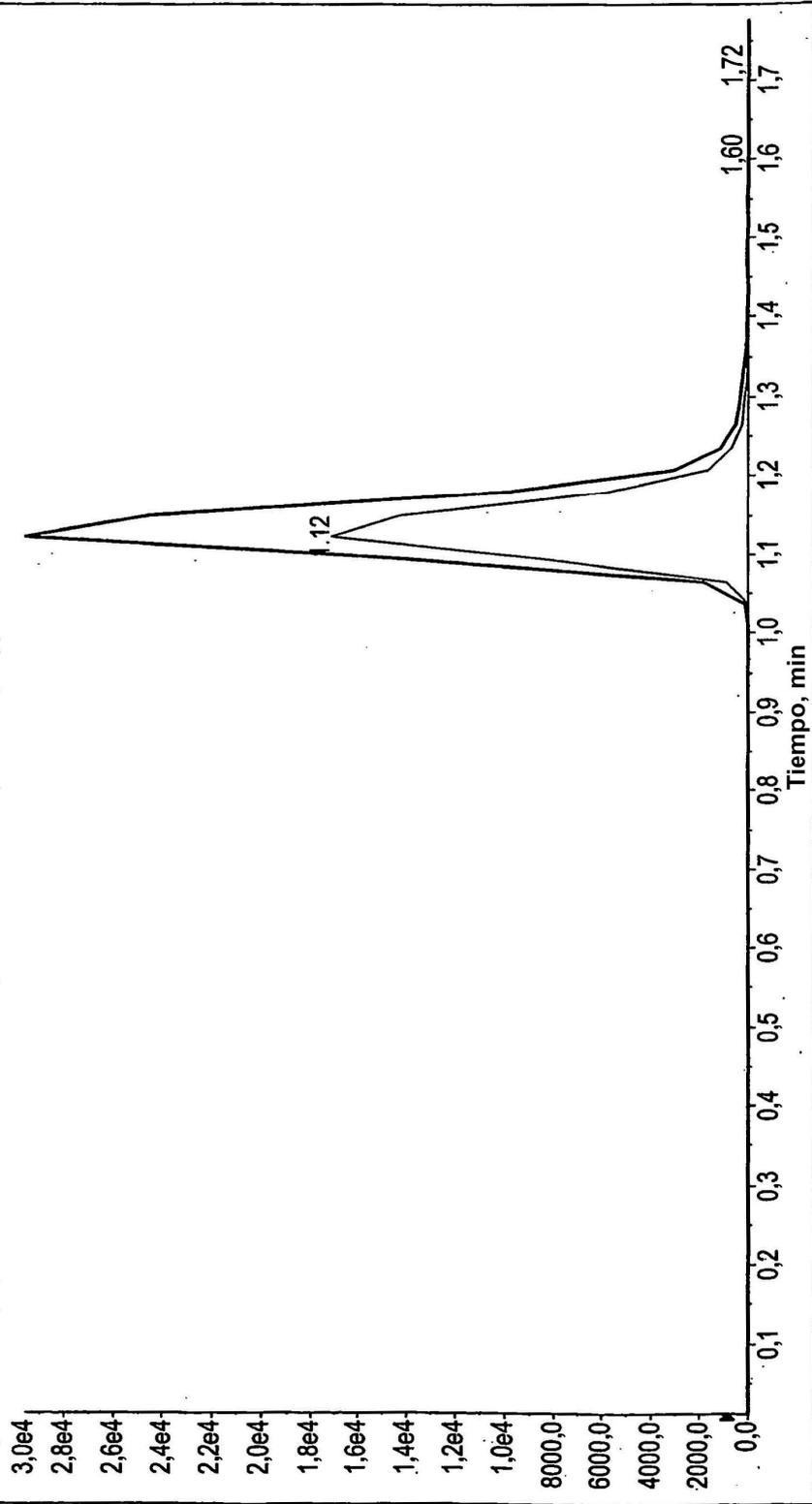


FIG. 7

Hora de impresión: 09:12:32

Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

Series de péptidos sintetizados - LVNEVTEFAKTCVAD

Patrón interno LVNEVTEFAK\*

MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

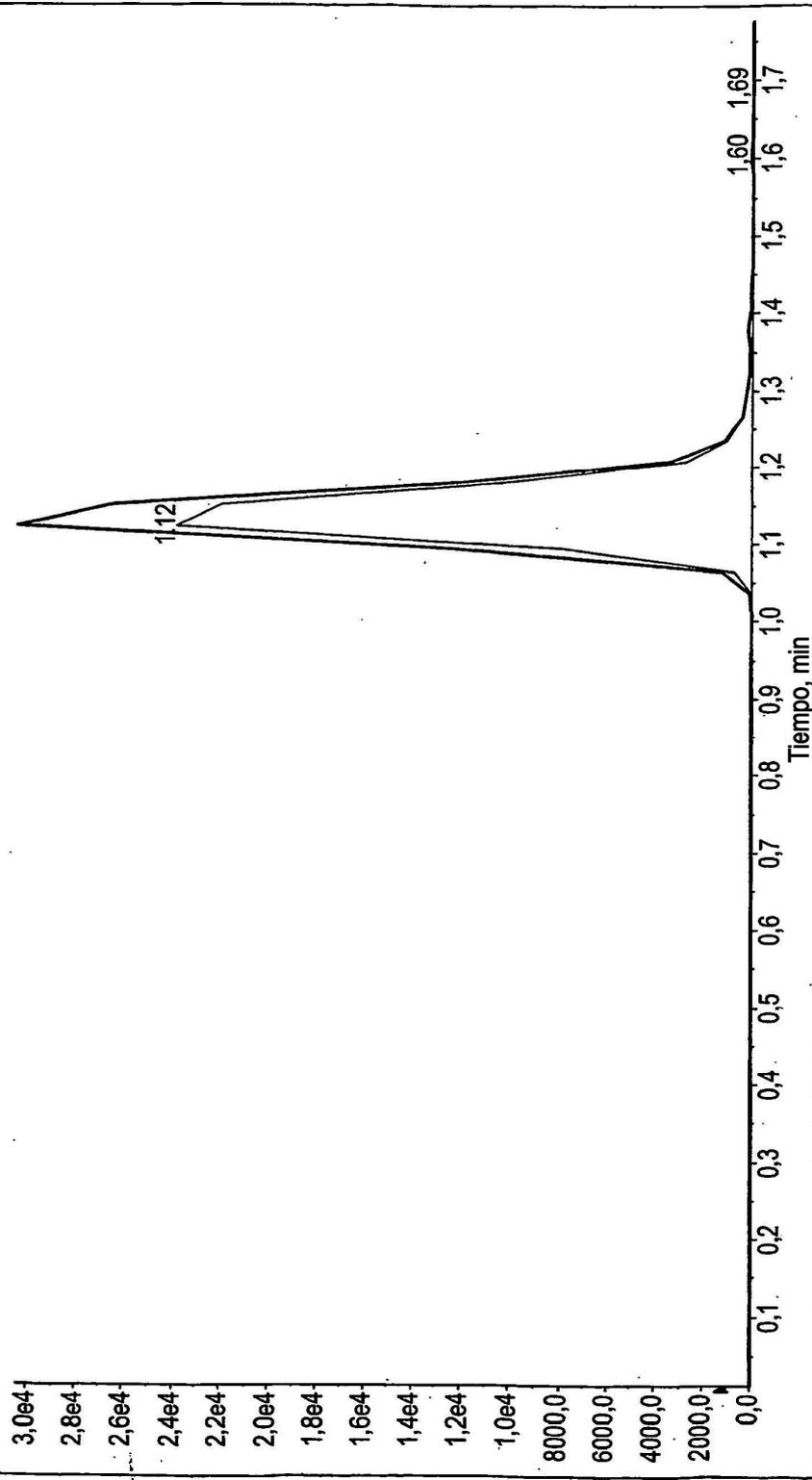
MRM m/z 579,4/945,4 (rojo - pico más alto)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A

Máx. 2,4e4 cps.

■ XIC de +MRM (6 pares): Exp 2, 575,4/937,4 amu de la Muestra 40 (5) de la prueba del péptido sintetizado 2006-September-01.wiff (Turbo Spray)



Hora de impresión: 09:13:58

Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

FIG. 8

Series de péptidos sintetizados - LVNEVTEFAKNDCTTM

Patrón interno LVNEVTEFAK\*

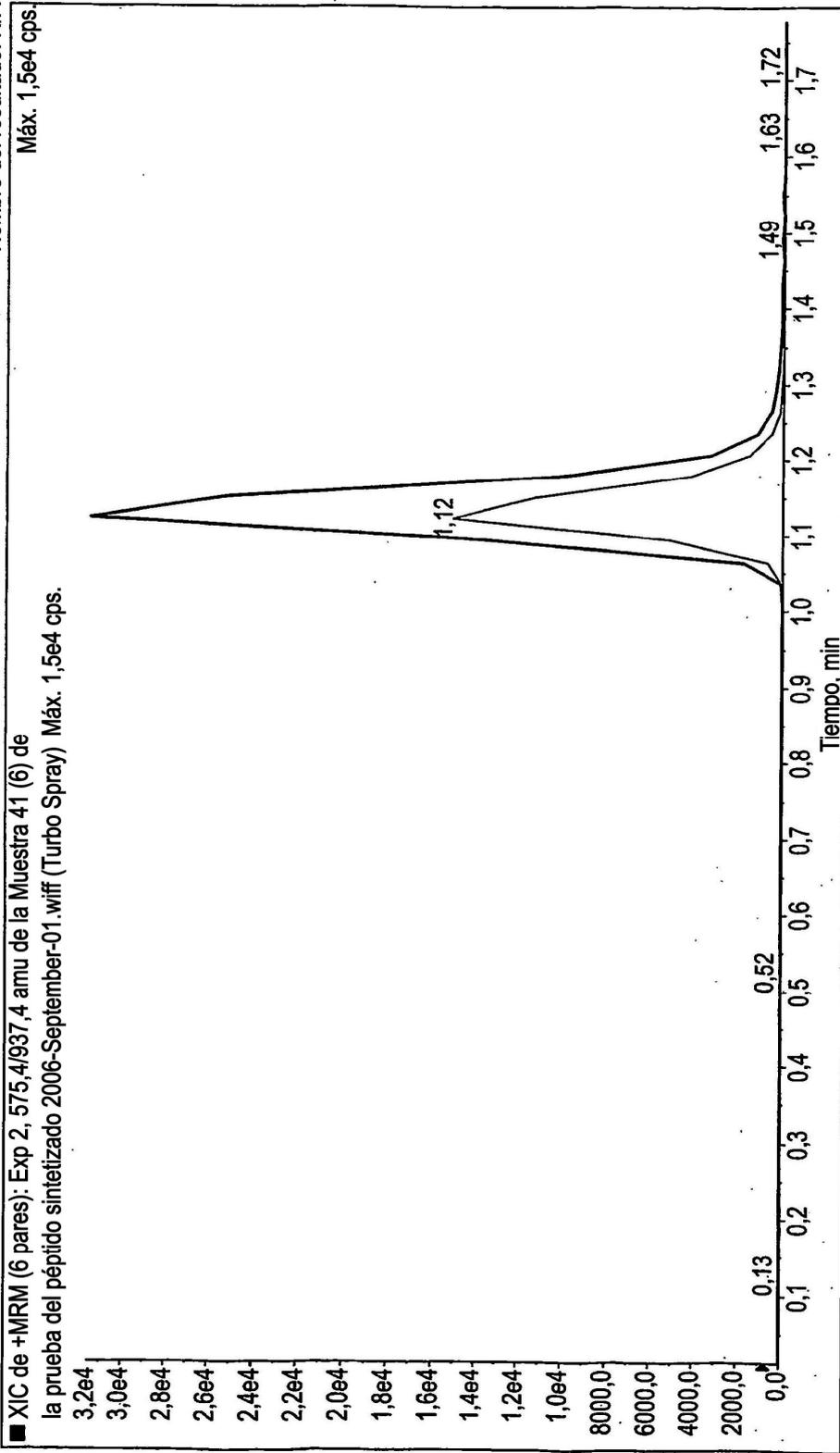
MRM m/z 575,4/937,4 (azul)

MRM m/z 579,4/945,4 (rojo - pico más alto)

\*Laboratorio WellChild

Nombre del resultado: N/A

Máx. 1,5e4 cps.



■ XIC de +MRM (6 pares): Exp 2, 575,4/937,4 amu de la Muestra 41 (6) de la prueba del péptido sintetizado 2006-September-01.wiff (Turbo Spray) Máx. 1,5e4 cps.

Hora de impresión: 09:15:35  
 Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

FIG. 9

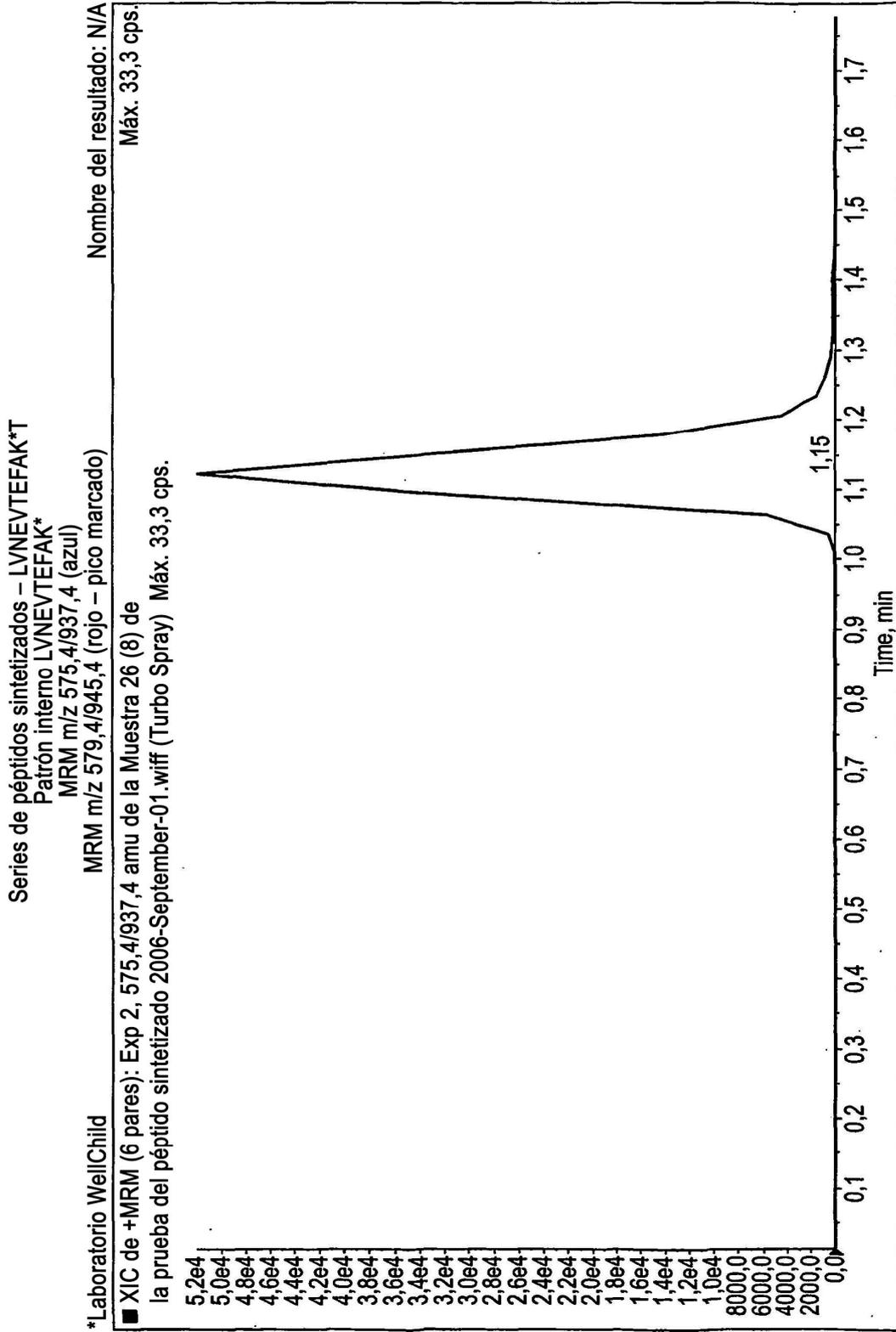


FIG. 10

Hora de impresión: 09:16:57  
Fecha de impresión: 18 de septiembre de 2006

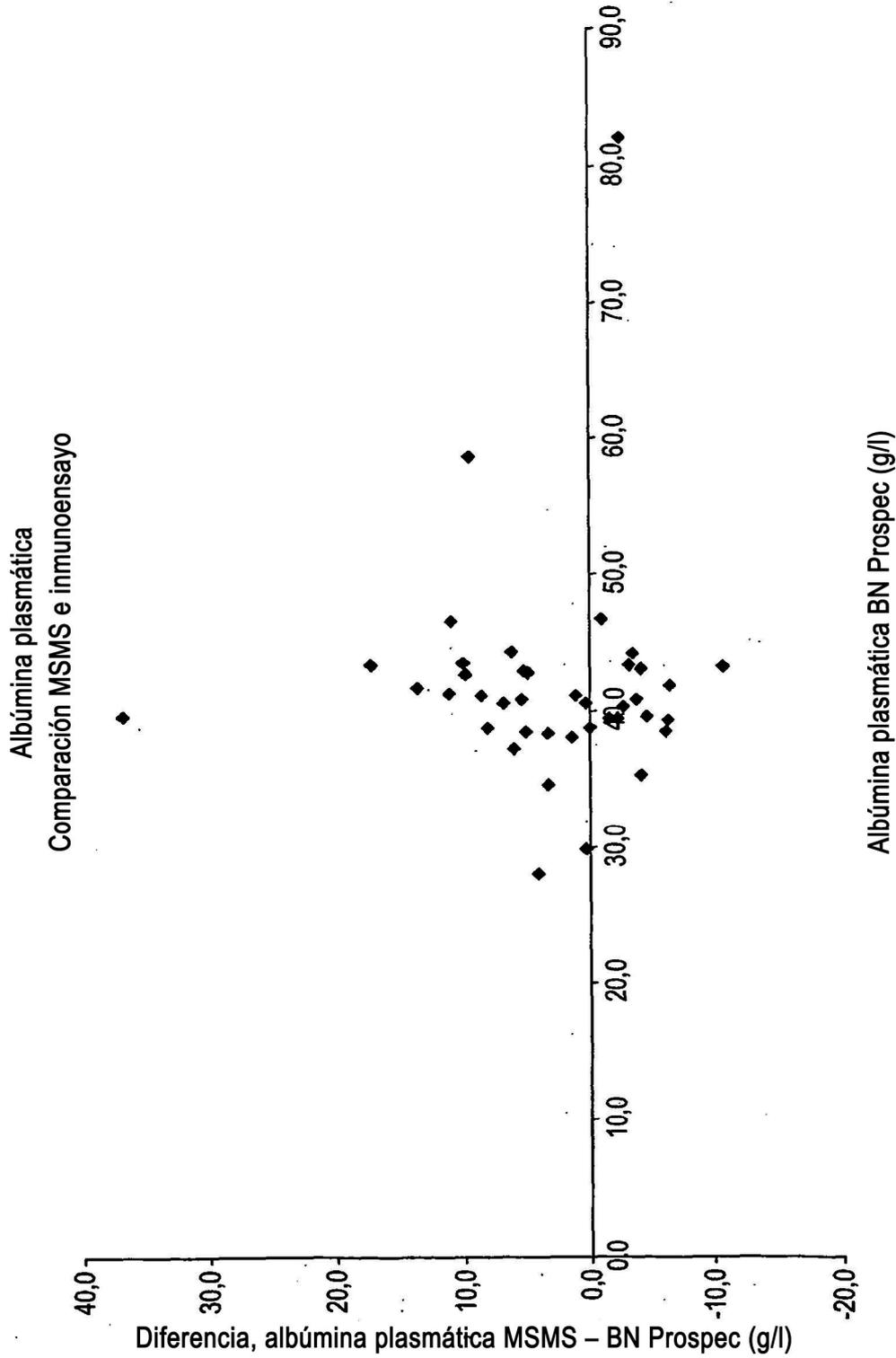


FIG. 11

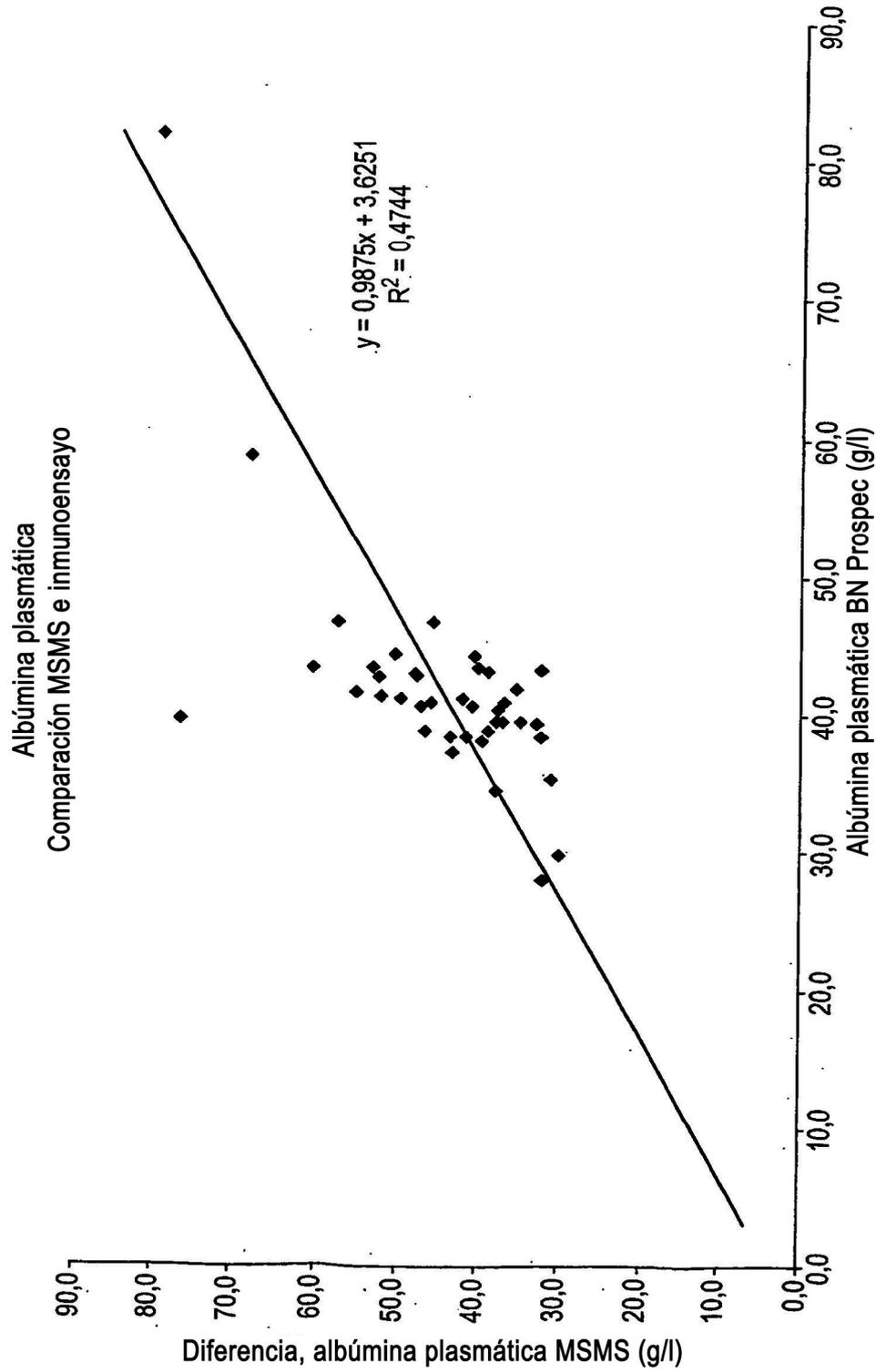


FIG. 12