

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 850**

51 Int. Cl.:

G01N 31/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010 PCT/US2010/061925**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011 WO11087869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10843598 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2517003**

54 Título: **Ensayo SRM/MRM de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (SPARC)**

30 Prioridad:

22.12.2009 US 289383 P

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

24.11.2017

73 Titular/es:

**EXPRESSION PATHOLOGY, INC. (100.0%)
9600 Medical Center Drive, Suite 300
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**KRIZMAN, DAVID, B.;
HEMBROUGH, TODD y
THYPARAMBIL, SHEENO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 850 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

Ensayo SRM/MRM de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (SPARC)

Introducción

5 Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína y que se denominará SPARC (por sus siglas en inglés), y cuya proteína también se puede denominar proteína 40 de membrana basal y Osteonectina. La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en una técnica de Monitorización de Reacciones Seleccionadas (SRM, por sus siglas en inglés) basada en espectrometría de masas, que también se puede denominar Monitorización de Reacciones Múltiples (MRM, por sus siglas en inglés), y se denominará SRM/MRM. Se describe el uso de uno de tales péptidos para el análisis cuantitativo SRM/MRM de la proteína SPARC.

10 Este ensayo SRM/MRM se puede utilizar para medir niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína SPARC y por lo tanto proporcionan un medio para medir la cantidad de la proteína SPARC en una preparación de proteína dada obtenida a partir de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

15 Más específicamente, el ensayo SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisado de proteínas preparadas a partir de células obtenidas a partir de muestras de tejido de pacientes, tales como tejido de pacientes con cáncer fijado con formalina. Los métodos de preparación de muestras de proteínas de tejido fijado con formalina se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.473.532, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Los métodos descritos en la Patente de EE.UU. N° 7.473.532 se pueden llevar a cabo convenientemente utilizando reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible a partir de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

20 La forma de tejidos más ampliamente y ventajosamente disponible de tejido de pacientes con cáncer es tejido fijado con formalina, embebido en parafina. La fijación con formaldehído/formalina de tejido extirpado quirúrgicamente es, de lejos, el método más común de conservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada para la práctica patológica estándar. Las soluciones acuosas de formaldehído se denominan formalina. La formalina del "100%" consiste en una solución saturada de formaldehído (esto es aproximadamente 40% en volumen o 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizante, normalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en la que se conserva el tejido es remojar el tejido entero durante periodos de tiempo prolongados (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra del 10%, seguido por embeber el tejido entero fijado en cera de parafina para almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Así, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido canceroso fijado con formalina serán los métodos más aceptados y utilizados para el análisis de tejido de pacientes con cáncer.

25 Los resultados del ensayo SRM/MRM se pueden utilizar para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína SPARC dentro de las muestras de tejido específico (p.ej., muestra de tejido canceroso) del paciente o sujeto de quien se recogió y conservó el tejido (muestra biológica). Esto no sólo proporciona información diagnóstica sobre el cáncer, sino que también permite que un médico u otro profesional médico determine la terapia apropiada para el paciente. Tal ensayo que proporciona información diagnóstica y terapéuticamente importante sobre los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra de paciente se denomina un ensayo de *diagnóstico acompañante*. Por ejemplo, tal ensayo se puede diseñar para diagnosticar el estadio o grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que es más probable que responda un paciente.

Compendio

35 El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el contenido de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

40 Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (SPARC) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de SPARC en un producto de digestión de proteínas líquido, soluble, diluible, preparado a partir de dicha muestra biológica humana mediante calentamiento y proteólisis en donde dicha detección y/o cuantificación se lleva a cabo utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína SPARC en dicha muestra; en donde el fragmento peptídico de SPARC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

45 En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicha digestión de proteínas antes de detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC.

50 En una realización, dicha digestión de proteínas comprende una digestión con proteasas.

En una realización, el tejido es tejido embebido en parafina.

En una realización, el tejido se obtiene a partir de un tumor.

5 En una realización, dicho nivel es un nivel relativo y la cuantificación de dicho fragmento peptídico de SPARC comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica diferente y separada.

10 En una realización, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de SPARC comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de SPARC en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos; y en donde el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.

En una realización, la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en la digestión de proteínas indica la presencia de proteína SPARC modificada o no modificada y una asociación con cáncer en el sujeto.

15 En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC, o el nivel de dicha proteína SPARC con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

20 En una realización, se combina la correlación de los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC, o el nivel de dicha proteína SPARC con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer, con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos procedentes de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

En una realización, el fragmento peptídico de SPARC es SEQ ID NO: 5.

25 Los ensayos descritos en la presente memoria miden niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos específicos no modificados de la proteína SPARC y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína SPARC. Ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados y restos de aminoácidos glicosilados que están presentes en los péptidos.

30 Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína SPARC se determinan mediante la metodología SRM/MRM, por ejemplo, comparando las áreas de pico distintivo SRM/MRM (por ejemplo, el área de pico distintivo o la intensidad de iones de fragmentos integrados) de un péptido de SPARC individual en diferentes muestras. Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de picos distintivos SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos de SPARC, donde cada péptido tiene su propio pico distintivo SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína SPARC en una muestra biológica con el contenido de proteína SPARC en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De este modo, se determina la cantidad de un péptido particular, o péptidos, de la proteína SPARC, y por lo tanto la cantidad de la proteína SPARC, en relación con el mismo péptido SPARC, o péptidos, a través de 2 o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para un péptido dado, o péptidos, de la proteína SPARC dentro de una única muestra comparando el área de pico distintivo para ese péptido mediante metodología SRM/MRM con el área de pico distintivo para otro péptido diferente, o péptidos de una proteína o proteínas diferentes, dentro de la misma preparación de proteínas de la muestra biológica. De este modo, se determina la cantidad de un péptido particular de la proteína SPARC, y por lo tanto la cantidad de la proteína SPARC, una respecto de la otra dentro de la misma muestra. Estas estrategias generan cuantificación de un péptido individual, o péptidos, de la proteína SPARC a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades como se determina por el área de pico son relativas entre sí, independientemente de las cantidades de peso-volumen o de peso-peso absolutas del péptido de SPARC en la preparación de proteínas de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre áreas de pico distintivo individuales entre diferentes muestras se normalizan con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede realizar a través de muchos péptidos de múltiples proteínas y de la proteína SPARC simultáneamente en una muestra única y/o a través de muchas muestras para obtener información sobre cantidades relativas de proteína, de un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

50 Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína SPARC se determinan, por ejemplo, mediante la metodología SRM/MRM, por la cual se compara el área de pico distintivo SRM/MRM de un péptido individual de la proteína SPARC en una muestra biológica con el área de pico distintivo SRM/MRM de un patrón interno añadido. En una realización de la invención, como se define en las reivindicaciones, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido exacto de SPARC que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Tales estándares internos marcados con isótopos se sintetizan de manera que cuando se analizan mediante espectrometría de masas, generan un pico distintivo SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinto del pico distintivo del péptido de SPARC nativo y que se puede utilizar como un pico de comparación. Así, cuando el patrón interno se añade a una preparación de proteínas de una muestra biológica en cantidades

conocidas y se analiza mediante espectrometría de masas, se compara el área de pico distintivo SRM/MRM del péptido nativo con el área de pico distintivo SRM/MRM del péptido patrón interno, y esta comparación numérica indica o la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de la proteína original de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para fragmentos peptídicos se muestran según la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos y, por consiguiente proteínas, simultáneamente en una muestra única y/o a través de muchas muestras para obtener información sobre cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

El método de ensayo SRM/MRM se puede utilizar para ayudar al diagnóstico del estadio de cáncer, por ejemplo, directamente en tejido derivado de paciente, tal como tejido fijado con formalina, y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería más ventajoso para su uso en el tratamiento de ese paciente. Se analiza el tejido canceroso que se retira de un paciente ya sea mediante cirugía, tal como para la eliminación terapéutica de tumores parciales o enteros, o a través de procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de enfermedad sospechosa, para determinar si una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas, están o no presentes en ese tejido de paciente. Además, el nivel de expresión de una proteína, o de múltiples proteínas, se puede determinar y comparar con un nivel "normal" o nivel de referencia encontrado en tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas encontradas en tejido sano se pueden derivar, por ejemplo, de los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Alternativamente, se pueden obtener niveles normales o de referencia para individuos con cáncer mediante análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer. También se pueden utilizar ensayos de niveles de proteína (p. ej., niveles de SPARC) para diagnosticar el estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de SPARC. Los niveles o cantidades de proteínas o péptidos se pueden definir como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o péptido determinado mediante el ensayo SRM/MRM. El nivel o cantidad se puede normalizar para totalizar el nivel o cantidad de proteína u otro componente en el lisado analizado (p. ej., expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramo de proteína). Además, el nivel o cantidad de una proteína o péptido se puede determinar en base al volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o cantidad de proteína o péptido como se determina mediante el ensayo SRM/MRM también se puede normalizar con el número de células analizadas. Así, la información referente a SPARC se puede utilizar para ayudar a determinar el estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína SPARC (o fragmento de péptidos de la proteína SPARC) con los niveles observados en tejidos normales. Una vez que se ha determinado la fase y/o grado del cáncer, y/o las características de expresión de la proteína SPARC, esa información se puede relacionar con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente tejido canceroso que se caracteriza por, por ejemplo, expresión anormal de la proteína o proteínas (p. ej., SPARC) que se ensayaron. Relacionar la información de un ensayo de proteína SPARC con una lista de agentes terapéuticos que se dirige específicamente, por ejemplo, a la proteína SPARC o células/tejido que expresan la proteína, define lo que se ha denominado un enfoque de medicina personalizado para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en la presente memoria constituyen el fundamento de un enfoque de medicina personalizada utilizando el análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente de decisiones de diagnóstico y tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1, partes A a C, muestra un ejemplo de un ensayo SRM/MRM de un solo péptido de la proteína SPARC realizada sobre lisados Liquid Tissue™ con cuantificación del péptido de SPARC conducido en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

Descripción detallada

En principio, se puede utilizar cualquier péptido predicho derivado de la proteína SPARC, preparado por ejemplo mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (p. ej., tripsina) como indicador alternativo para determinar la abundancia de proteína SPARC en una muestra que utiliza un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De manera similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contiene un resto de aminoácido en un sitio que se conoce por estar potencialmente modificado en la proteína SPARC también se podría utilizar potencialmente para ensayar el grado de modificación de la proteína SPARC en una muestra.

Los fragmentos peptídicos de SPARC se pueden generar mediante una variedad de medios que incluyen el uso del protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la Patente de EE.UU. 7,473,532. El protocolo y reactivos Liquid Tissue™ son capaces de producir muestras de péptidos adecuadas para el análisis espectroscópico de masas de tejido embebido en parafina fijado con formalina mediante digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/muestra biológica. En el protocolo Liquid Tissue™, el tejido/biológico se calienta en un tampón durante un periodo de tiempo prolongado (p. ej., desde aproximadamente 80°C a aproximadamente 100°C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas) para revertir o liberar la reticulación de proteínas. El tampón empleado es un tampón neutro, (p. ej., un tampón base Tris, o un tampón que contiene un detergente). Después del tratamiento térmico, la muestra de tejido/muestra biológica se trata con una o más proteasas, que incluye pero no se limita a tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para interrumpir el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y licuar dicha muestra (p. ej., un

periodo de tiempo de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37°C a 65°C). El resultado del calentamiento y de la proteólisis es un lisado de biomolécula líquido, soluble, diluible.

5 Sorprendentemente, se encontró que muchas secuencias peptídicas potenciales de la proteína SPARC son inadecuadas o ineficaces para el uso en ensayos SRM/MRM basados en espectrometría de masas por razones que no son inmediatamente evidentes. Como no fue posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo MRM/SRM, fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en lisados Liquid Tissue™ reales para desarrollar un ensayo SRM/MRM fiable y preciso para la proteína SPARC. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían ser, por ejemplo, difíciles de detectar por espectrometría de masas, ya que no se ionizan bien o producen fragmentos distintos de otras proteínas, los péptidos también pueden fallar para resolver bien en separación (p. ej., cromatografía líquida), o adherirse a envases de vidrio o plástico.

15 Los péptidos de SPARC que se encuentran en diversas realizaciones de esta descripción (p. ej., Tablas 1 y 2) se derivaron de la proteína SPARC mediante digestión con proteasa de todas las proteínas dentro de un lisado complejo Liquid Tissue™ preparado a partir de células obtenidas de tejido canceroso fijado con formalina. A menos que se indique lo contrario, en cada caso la proteasa era tripsina. El lisado Liquid Tissue™ se analizó luego mediante espectrometría de masas para determinar aquellos péptidos derivados de la proteína SPARC que se detectan y analizan mediante espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto preferido específico de péptidos para análisis de espectrometría de masas se basa en: 1) determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en análisis de espectrometría de masas de lisados Liquid Tissue™ y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y condiciones experimentales utilizadas en la preparación de un lisado Liquid Tissue™. Esta última propiedad se extiende no sólo a la secuencia de aminoácidos del péptido sino también a la capacidad de un resto de aminoácido modificado dentro de un péptido para sobrevivir en forma modificada durante la preparación de la muestra.

SEQ ID NO	Secuencia Peptídica
SEQ ID NO: 1	IHENEK
SEQ ID NO: 2	APLIPMEHCTTR
SEQ ID NO: 3	LHLDYIGPCK
SEQ ID NO: 4	LEAGDHPVELLAR
SEQ ID NO: 5	NVLVTLYER
SEQ ID NO: 6	DEDNLLTEK
SEQ ID NO: 7	YIPPCLDSELTEFPLR
SEQ ID NO: 8	FFETCDLDNDK
SEQ ID NO: 9	TFDSSCHFFATK

25

SEQ ID	Secuencia Peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de carga del precursor	m/z del precursor	Transición m/z	Tipo de ion
SEQ ID NO: 4	LEAGDHPVELLAR	1418,752	3	473,9240112	601,366	γ^5
			3	473,9240112	700,435	γ^6
			3	473,9240112	797,487	γ^7
			3	473,924	589,32	γ^{11}
			3	473,924	653,841	γ^{12}
SEQ ID NO: 5	NVLVTLYER	1105,613	2	553,8129883	681,3561	γ^5

			2	553,8129883	780,425	Y ⁶
			2	553,8129883	893,509	Y ⁷
SEQ ID NO: 3	LHLDYIGPCK	1157,59	2	579,802	680,343	Y ⁶
			2	579,802	795,37	Y ⁷
			2	579,802	908,454	Y ⁸
SEQ ID NO: 6	DEDNNLLTEK	1189,546	2	595,78	603,371	Y ⁵
			2	595,7800293	717,4136	Y ⁶
			2	595,7800293	831,4565	Y ⁷
			2	595,7800293	946,4835	Y ⁸

5 Los lisados de proteínas de células obtenidas directamente de tejido fijado con formalina (formaldehído) se prepararon utilizando los reactivos y el protocolo Liquid Tissue™ que implica la recogida de células en un tubo de ensayo mediante microdissección de tejidos seguido de calentamiento de las células en el tampón Liquid Tissue™ durante un período prolongado de tiempo. Una vez que la reticulación inducida por formalina ha sido afectada negativamente, las células/tejidos se digieren entonces hasta completarse de una manera predecible que utiliza una proteasa, como por ejemplo que incluye pero no se limita a la tripsina proteasa. Cada lisado de proteína se convierte en una colección de péptidos mediante digestión de polipéptidos intactos con la proteasa. Se analizó cada lisado Liquid Tissue™ (p. ej., mediante espectrometría de masas con trampa de iones) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos donde se presentaron los datos como identificación de tantos péptidos como se podían identificar mediante espectrometría de masas de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteína. Se emplea un espectrómetro de masas de trampa de iones u otra forma de un espectrómetro de masas que es capaz de realizar perfiles globales para la identificación de tantos péptidos como sea posible de un solo complejo de lisado de proteína/péptido. Sin embargo, los espectrómetros de masas de trampa de iones pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para conducir el perfil global de péptidos. Aunque el ensayo SRM/MRM se puede desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones o triple cuadrupolo, la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo SRM/MRM se considera a menudo una plataforma instrumental de triple cuadrupolo.

20 Una vez que se identificaron tantos péptidos como fue posible en un solo análisis MS de un solo lisado en las condiciones empleadas, entonces se recopiló esa lista de péptidos y se utilizó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados Liquid Tissue™, y la gran lista de péptidos se recopiló en un solo conjunto de datos. Ese tipo de conjunto de datos se puede considerar que representa los péptidos que se pueden detectar en el tipo de muestra biológica que se analizó (después de la digestión con proteasa) y, específicamente, en un lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica, e incluye así los péptidos para proteínas específicas, tales como por ejemplo la proteína SPARC.

30 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los péptidos trípticos de SPARC identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas del receptor SPARC incluyen uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más de los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, cada uno de los cuales se enumeran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido fijado con formalina, embebido en parafina. Así, cada uno de los péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (p. ej., uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más de los péptidos enumerados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con uno o más de los péptidos que se encuentran en la Tabla 2) son candidatos para uso en ensayo cuantitativo SRM/MRM para la proteína SPARC en muestras biológicas humanas, que incluye directamente en tejido de paciente fijado con formalina.

40 Los péptidos trípticos de SPARC enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados de múltiples lisados Liquid Tissue™ de múltiples tejidos diferentes fijados con formalina de diferentes órganos humanos que incluyen próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo SRM/MRM de la proteína SPARC en tejido fijado con formalina. Un análisis de datos adicional de estos experimentos indicó que no se observó preferencia por ningún péptido específico de ningún sitio específico del órgano. Así, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para llevar a cabo ensayos SRM/MRM de la proteína SPARC en un lisado Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado con formalina que procede de cualquier muestra biológica o de cualquier parte de

órgano en el cuerpo.

5 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de aquellos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más de aquellos péptidos enumerados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con los péptidos también encontrados en la Tabla 2) se ensayan mediante métodos que no se basan en espectroscopia de masas, que incluyen, pero no se limitan a, métodos inmunológicos (p. ej., Western blot o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información dirigida a la cantidad de péptido/s (absoluta o relativa), la información se puede emplear en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, que incluye indicar 10 (diagnosticar) la presencia de cáncer en un sujeto, determinar el estadio/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico, o determinar la terapéutica o régimen de tratamiento para un sujeto/paciente.

15 En realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones, las composiciones pueden comprender uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más u ocho o más de los péptidos de la Tabla 1. En algunas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, las composiciones comprenden uno o más, dos o más, o tres o más de los péptidos de la Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden incluir uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más péptidos que están marcados isotópicamente. Cada uno de los péptidos se puede marcar con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en: ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína SPARC, ya sean isótopos marcados o no, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (p. ej., un conjunto completo de péptidos trípticos). En algunas realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones, las composiciones no contienen uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más péptidos de SPARC, y particularmente péptidos que aparecen en la Tabla 1 o Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales deshidratados o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (p. 25 ej., acuosas), matrices o manchas.

Los péptidos trípticos de SPARC enumerados en la Tabla 1 incluyen aquellos detectados de múltiples lisados Liquid Tissue™ de múltiples tejidos diferentes fijados con formalina de diferentes órganos humanos que incluyen próstata, colon y mama. Cada uno de aquellos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo SRM/MRM de la proteína SPARC en tejido fijado con formalina. Un análisis de datos adicional de estos experimentos indicó que no se observó preferencia por ningún péptido específico de ningún sitio específico del órgano. Así, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para llevar a cabo ensayos SRM/MRM de la proteína SPARC en un lisado Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado con formalina que procede de cualquier muestra biológica o de cualquier parte de 30 órgano en el cuerpo.

Una consideración importante para llevar a cabo un ensayo SRM/MRM es el tipo de instrumento que se puede emplear en el análisis de los péptidos. Aunque los ensayos SRM/MRM se pueden desarrollar y realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones o triple cuadrupolo, la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo SRM/MRM se considera a menudo como una plataforma instrumental de triple cuadrupolo. Ese tipo de espectrómetro de masas se puede considerar el instrumento más adecuado para analizar un solo péptido diana aislado dentro de un lisado de proteína muy complejo que puede consistir en cientos de miles a millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas dentro de una célula. 40

Con el fin de implementar más eficazmente el ensayo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína SPARC, es deseable utilizar información además de la secuencia peptídica en el análisis. Esta información adicional se puede utilizar para dirigir e instruir el espectrómetro de masas (p. ej., un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo), para realizar el análisis correcto y enfocado de péptido/s diana específico, tal que el ensayo se pueda realizar de manera efectiva. 45

La información adicional sobre péptidos diana en general, y sobre péptidos de SPARC específicos, puede incluir uno o más de la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z y el tipo de ion de cada ion de transición. La información adicional de péptidos que se puede utilizar para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la proteína SPARC se muestra por ejemplo para cuatro (4) de los péptidos de SPARC de la lista en la Tabla 1 y se muestra en la Tabla 2. La información adicional similar descrita para estos cuatro (4) péptidos de SPARC mostrados por ejemplo en la Tabla 2 se puede preparar, obtener y aplicar al análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1. 50

El método descrito a continuación se utilizó para: 1) identificar péptidos candidatos de la proteína SPARC que se pueden utilizar para un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína SPARC, 2) desarrollar ensayo, o ensayos individuales SRM/MRM para el péptido diana de la proteína SPARC con el fin de correlacionar y 3) aplicar ensayos cuantitativos para el diagnóstico de cáncer y/o la elección de la terapia óptima. 55

Método de ensayo

1. Identificación de fragmentos peptídicos candidatos de SRM/MRM para la proteína SPARC.
 - a. Preparar un lisado de proteína Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina que utiliza

una proteasa o proteasas (que puede o no incluir tripsina), para digerir proteínas.

- 5 b. Analizar todos los fragmentos proteicos en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína SPARC, donde fragmentos peptídicos individuales no contienen modificaciones peptídicas tales como fosforilaciones o glicosilaciones.
- c. Analizar todos los fragmentos proteicos en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas de tandem de trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína SPARC que llevan modificaciones de péptidos tales como por ejemplo restos fosforilados o glicosilados.
- 10 d. Se pueden medir potencialmente todos los péptidos generados mediante un método de digestión específico de toda la proteína SPARC, de longitud completa, pero los péptidos preferidos utilizados para el desarrollo del ensayo SRM/MRM son aquellos que se identifican por espectrometría de masas directamente en un lisado de proteína Liquid Tissue™ complejo preparado de una muestra biológica fijada con formalina.
- 15 e. Los péptidos que se modifican específicamente (fosforilados, glicosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan, y así se detectan, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina, se identifican como péptidos candidatos para ensayar modificaciones de péptidos de la proteína SPARC.
2. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos de proteína SPARC.
- 20 a. El ensayo SRM/MRM en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo para fragmentos peptídicos individuales identificados en un lisado Liquid Tissue™ se aplica a péptidos de la proteína SPARC.
- 25 i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento peptídico para condiciones cromatográficas óptimas que incluye, pero no se limita a, electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cromatografía líquida en fase nano-inversa, cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- ii. Determinar la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor para cada péptido, el valor m/z del precursor para cada péptido, los iones de transición m/z para cada péptido y el tipo iónico de cada ión de transición para cada fragmento peptídico con el fin de desarrollar un ensayo SRM/MRM para cada péptido.
- 30 iii. El ensayo SRM/MRM se puede llevar a cabo utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo donde cada péptido tiene un pico distintivo SRM/MRM característico y único que define con precisión el único ensayo SRM/MRM realizado en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.
- 35 b. Realizar el análisis SRM/MRM de modo que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína SPARC que se detecta, en función del único área de pico distintivo SRM/MRM de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, puede indicar tanto la cantidad relativa como la absoluta de la proteína en un lisado de proteína particular.
- i. La cuantificación relativa se puede lograr mediante:
- 40 1. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína SPARC comparando el área de pico de distintivo SRM/MRM de un péptido de SPARC dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con el mismo área de pico distintivo SRM/MRM del mismo fragmento peptídico de SPARC en al menos un segundo, tercer, cuarto o más lisados Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas con formalina.
- 45 2. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína SPARC comparando el área de pico distintivo SRM/MRM de un péptido de SPARC dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con áreas de pico distintivo SRM/MRM desarrolladas de fragmentos peptídicos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área de pico distintivo SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento peptídico se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.
- 50 3. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína SPARC comparando el área de pico distintivo SRM/MRM para un péptido de SPARC dado con las áreas de pico distintivo SRM/MRM de otros fragmentos peptídicos derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada con formalina con el fin de
- 55

normalizar los niveles cambiantes de la proteína SPARC a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo diversas condiciones celulares.

- 5 4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a fragmentos peptídicos no modificados como a fragmentos peptídicos modificados de la proteína SPARC, donde las modificaciones incluyen pero no se limitan a fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan del mismo modo que la determinación de cantidades relativas de péptidos no modificados.
- 10 ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área de pico distintivo SRM/MRM para un fragmento peptídico dado de la proteína SPARC en una muestra biológica individual con el área de pico distintivo SRM/MRM de un patrón de fragmento peptídico interno añadido en el lisado de proteína de la muestra biológica.
- 15 1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico de la proteína SPARC que está siendo cuestionada. Este patrón se añade a una muestra en cantidades conocidas y se puede determinar el área del pico distintivo SRM/MRM tanto para el patrón de fragmento peptídico interno como para el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido por la comparación de ambas áreas de pico.
- 20 2. Esto se puede aplicar a fragmentos peptídicos no modificados y a fragmentos peptídicos modificados, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glicosilación y donde los niveles absolutos de péptidos modificados se pueden determinar de la misma manera que la determinación de niveles absolutos de péptidos no modificados.
- 25 3. Aplicar la cuantificación de fragmento peptídico al diagnóstico y tratamiento del cáncer.
- a. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína SPARC y demostrar que la asociación previamente determinada, así entendida en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína SPARC con el estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral del paciente está confirmada.
- 30 b. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína SPARC y demostrar la correlación con resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en donde esta correlación ya se ha demostrado en el campo o se puede demostrar en el futuro a través de estudios de correlación entre cohortes de pacientes y tejido de aquellos pacientes. Una vez que las correlaciones previamente establecidas o las correlaciones derivadas en el futuro son confirmadas mediante este ensayo, entonces el método de ensayo se puede utilizar para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

35 La Figura 1 muestra un ejemplo de un solo ensayo SRM/MRM realizado en lisados Liquid Tissue™ de tejido de cáncer fijado con formalina. Se desarrolló un ensayo SRM/MRM para un solo péptido para la cuantificación de la proteína SPARC en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Las características específicas y únicas de este péptido de SPARC (secuencia NVLVTLTYER) se desarrollaron mediante el análisis de todos los péptidos de SPARC tanto en una trampa de iones como en espectrómetros de masas triple cuadrupolo y se muestran en la

40 Figura 1A. Esta información incluye la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los valores de transición m/z del precursor y los tipos de iones de cada una de las transiciones identificadas. Esa información se debe determinar experimentalmente para cada uno de los péptidos de SRM/MRM candidatos directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina; porque, curiosamente, no todos los péptidos de la proteína SPARC se pueden detectar en tales lisados que utilizan SRM/MRM como se describe en

45 la presente memoria, que indica que los péptidos de SPARC no detectados no se pueden considerar péptidos candidatos para desarrollar un ensayo SRM/MRM para uso en cuantificación de péptidos/proteínas directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina.

50 Como se muestra en la Figura 1B, este ensayo SRM/MRM particular se realizó en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo. Se analizó un lisado de proteína control donde se conocía que el péptido estaba presente en grandes cantidades porque este lisado se preparó de un tumor de xenoinjerto de ratón que resultó de la inyección de una línea celular cancerosa derivada de humanos en un ratón desnudo. Así, este tumor de xenoinjerto fue el control positivo. La muestra experimental en este experimento era un lisado de proteína Liquid Tissue™ preparado de tejido de cáncer de mama humano patrón fijado con formalina, embebido en parafina. Los datos del ensayo indican la presencia del único pico distintivo SRM/MRM para este péptido de SPARC tanto en la muestra control (cromatógrafo superior) como en la muestra experimental (cromatógrafo inferior). Comparando el área de pico distintivo SRM/MRM entre estas 2 muestras genera medida cuantitativa relativa para la proteína SPARC entre 2 muestras biológicas diferentes.

55

La Figura 1C muestra la medición cuantitativa del péptido mencionado anteriormente a través de una colección de treinta (30) tejidos cancerosos fijados con formalina que utiliza un patrón interno para lograr la cuantificación

absoluta de la proteína SPARC a través de una cohorte de muestras de pacientes derivadas de cáncer. Estos datos indican cantidades absolutas de este péptido de SPARC en función de la cantidad molar del péptido por microgramo de lisado de proteína analizado. La evaluación de los niveles de proteína SPARC en tejidos basados en el análisis de tejido fijado con formalina derivado de pacientes puede proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéuticamente relevante sobre cada paciente en particular. En una realización, esta descripción describe un método para medir el nivel de la proteína SPARC en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de SPARC modificados o no modificados en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica que utiliza espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína SPARC modificada o no modificada en dicha muestra; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. En una realización relacionada, la cuantificación de uno o más fragmentos peptídicos de SPARC comprende determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos peptídicos de SPARC en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde cada uno de los fragmentos peptídicos de SPARC en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el patrón interno es un péptido patrón interno marcado isotópicamente, comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados entre ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

El método para medir el nivel de la proteína SPARC en una muestra biológica descrita en la presente memoria (o fragmentos peptídicos como sustitutos de los mismos) se puede utilizar como un indicador de diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de las mediciones del nivel de la proteína SPARC se pueden emplear para determinar el estadio/grado/estado de diagnóstico de un cáncer correlacionando (p. ej., comparando) el nivel de receptor SPARC encontrado en un tejido con el nivel de proteína encontrado en los tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

Lista de secuencias

- 25 <110> Expression Pathology Inc.
- <120> Ensayo SRM/MRM de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (SPARC)
- 30 <130> E 10022 EP
- <140> EP 10 843 598.3
- <141> 2010-12-22
- 35 <150> US 61/289,383
- <151> 22-12-2009
- <160>9
- 40 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211>6
- <212> PRT
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de SPARC
- 50 <400> 1
- lie His Glu Asn Glu Lys**
- 1 5**
- <210> 2
- <211> 12
- 55 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido de SPARC
- 60 <400> 2

ES 2 643 850 T3

	Ala	Pro	Leu	Ile	Pro	Met	Glu	His	Cys	Thr	Thr	Arg				
	1				5					10						
5	<210>3 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
10	<220> <223> Péptido de SPARC <400> 3															
	Leu	His	Leu	Asp	Tyr	Ile	Gly	Pro	Cys	Lys						
	1				5					10						
15	<210>4 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
20	<220> <223> Péptido de SPARC <400> 4															
	Leu	Glu	Ala	Gly	Asp	His	Pro	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg			
	1				5					10						
25	<210>5 <211>9 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
30	<220> <223> Péptido de SPARC <400>5															
	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Tyr	Glu	Arg							
	1				5											
35	<210>6 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
40	<220> <223> Péptido de SPARC <400> 6															
	Asp	Glu	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Thr	Glu	Lys						
	1				5					10						
45	<210> 7 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
50	<220> <223> Péptido de SPARC <400> 7															
	Tyr	Ile	Pro	Pro	Cys	Leu	Asp	Ser	Glu	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro	Leu	Arg
	1				5					10					15	
55	<210> 8															

ES 2 643 850 T3

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Péptido de SPARC

<400> 8
10 Phe Phe Glu Thr Cys Asp Leu Asp Asn Asp Lys
 1 5 10

<210>9
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> SP

20 <400>9
 Thr Phe Asp Ser Ser Cys His Phe Phe Ala Thr Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

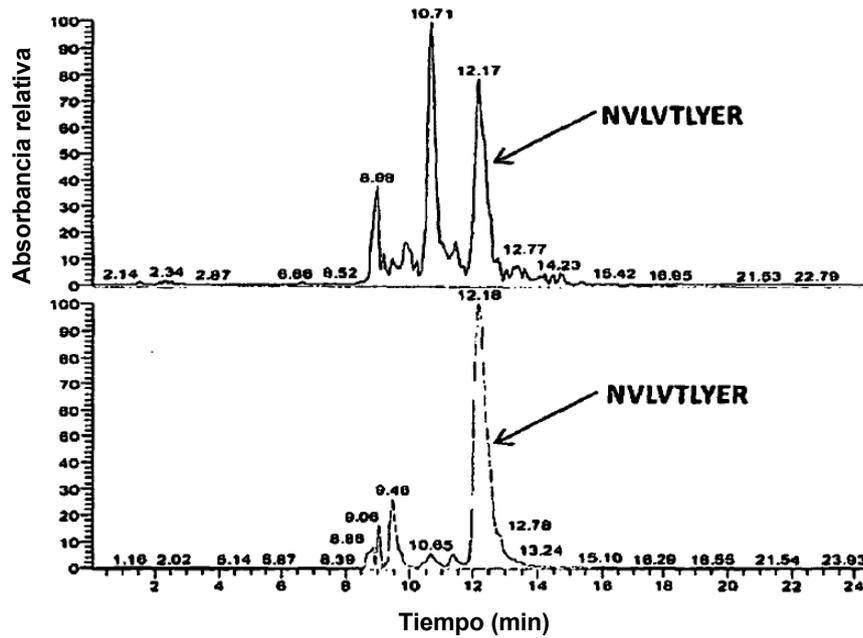
- 5 1. Un método para medir el nivel de la Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (SPARC) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de SPARC en un producto de digestión de proteínas diluible, soluble, líquido preparado a partir de dicha muestra biológica humana mediante calentamiento y proteólisis, en donde dicha detección y/o cuantificación se lleva a cabo utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína SPARC en dicha muestra; en donde el fragmento peptídico de SPARC se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión de proteínas antes de detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con proteasa.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tejido es tejido embebido en parafina.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tejido se obtiene de un tumor.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel es un nivel relativo y la cuantificación de dicho fragmento peptídico de SPARC comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica diferente y separada.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6, en donde la cuantificación dicho fragmento peptídico de SPARC comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en una muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de SPARC en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos; y en donde el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC en el producto de digestión de proteínas indica la presencia de proteína SPARC modificada o no modificada y una asociación con cáncer en el sujeto.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC, o el nivel de dicha proteína SPARC con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, en donde la correlación de los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de SPARC o el nivel de dicha proteína SPARC con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el fragmento peptídico de SPARC es la SEQ ID NO: 5.

Figura 1

A) Características que definen el pico distintivo SRM/MRM de este péptido de SPARC

Secuencia peptídica	Masa monoisotópica	Estado de carga del precursor	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
NVLVTLYER	1105,613	2	553,812988	681,3561	γ^5
		2	553,812988	780,425	γ^6
		2	553,812988	893,509	γ^7

B) Demostración de pico distintivo SRM/MRM para este péptido de SPARC en un lisado *Liquid Tissue* del tejido canceroso fijado con formalina



C) Cuantificación comparativa a través de una conorte de muestra de tejido canceroso fijado con formalina

