

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 104**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/483** (2006.01)

**G01N 30/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2011 PCT/US2011/045960**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12016182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2011 E 11813272 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2601519**

54 Título: **Ensayo para controlar una reacción seleccionada con c-Src**

30 Prioridad:

**30.07.2010 US 369411 P**

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

**16.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KRIZMAN, DAVID, B.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 655 104 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 para controlar una reacción seleccionada con c-Src

## Introducción

5 Se proporcionan péptidos específicos que se derivan de subsecuencias de la proteína c-Src, también conocida como CSK y a la que se denominará Src. Se proporcionan características específicas sobre cada péptido, que incluyen la secuencia del péptido y los iones de fragmentación/transición para un análisis fiable, preciso y homogéneo en un análisis espectrométrico de masas. También se describe el uso de estos péptidos en el control de una reacción seleccionada ("Selected Reaction Monitoring", SRM) basada en la espectrometría de masas, que también puede denominarse como ensayo de control de reacciones múltiples ("Multiple Reaction Monitoring", MRM). Este ensayo SRM puede emplearse para medir los niveles cuantitativos relativos o absolutos de uno o más péptidos específicos procedentes de la proteína Src y, por tanto, proporciona un medio para medir la cantidad de la proteína Src mediante espectrometría de masas en una preparación de proteínas concreta obtenida a partir de una muestra biológica.

15 De modo más específico, el ensayo SRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisados de proteínas preparadas a partir de células obtenidas de muestras de tejido de pacientes, tales como el tejido de un paciente con cáncer fijado en formol. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de un tejido fijado en formol se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.473.532, cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. Los métodos descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.473.532 pueden llevarse a cabo de modo conveniente empleando los reactivos Liquid Tissue® disponibles en Expression Pathology, Inc. (Rockville, MD).

20 Los resultados del ensayo SRM pueden emplearse para correlacionar niveles cuantitativos precisos de la proteína Src con el cáncer específico del paciente del cual se tomó el tejido. Esto no solo proporciona información de diagnóstico acerca del cáncer, sino que también permite que un médico u otro profesional sanitario determine la terapia apropiada para el paciente. Este ensayo que proporciona información importante desde el punto de vista del diagnóstico acerca de los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra de un paciente se denomina un ensayo de diagnóstico de acompañamiento. Por ejemplo, este ensayo puede diseñarse para que diagnostique el estadio o el grado de un cáncer y determinar cuál será el agente terapéutico o el desarrollo de la terapia al que el paciente responda con un resultado positivo con la máxima probabilidad.

25 Los ensayos descritos en la presente miden los niveles relativos o absolutos de péptidos específicos no modificados procedentes de la proteína Src y también pueden medir los niveles relativos o absolutos de péptidos específicos modificados procedentes de la proteína Src. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos aminoácidos fosforilados y restos aminoácidos glicosilados que estén presentes en los péptidos.

30 Los niveles cuantitativos relativos de la proteína Src se determinan mediante la metodología SRM, en la que el área del pico cromatográfico (o la altura del pico si los picos tienen una resolución suficiente) de un péptido individual, o de múltiples péptidos, procedentes de la proteína Src en una muestra biológica se compara con el área del pico cromatográfico determinada para el mismo péptido, o péptidos, de Src idénticos, empleando la misma metodología en una o más muestras biológicas adicionales y diferentes. De esta forma, la cantidad de un péptido concreto, o péptidos, procedentes de la proteína Src y, por tanto, la cantidad de la proteína Src, se determina con relación al mismo péptido, o péptidos, de Src, a través de 2 o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, puede determinarse la cuantificación relativa para un péptido concreto, o péptidos, procedentes de la proteína Src dentro de una única muestra comparando el área del pico cromatográfico para este péptido mediante la metodología SRM, con el área del pico cromatográfico para otro péptido, o péptidos, diferentes procedentes de una proteína, o proteínas, diferentes, dentro de la misma preparación de proteínas procedente de la muestra biológica. De esta forma, la cantidad de un péptido concreto procedente de la proteína Src y, por tanto, la cantidad de la proteína Src, se determina con relación a otro dentro de la misma muestra. Estas estrategias generan la cuantificación de un péptido individual, o péptidos, procedentes de la proteína Src con respecto a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras, en las que las cantidades, determinadas mediante el área del pico cromatográfico, son relativa entre sí, independientemente de las cantidades absolutas de peso a volumen o de peso a peso de los péptidos de Src en la preparación de proteínas procedente de la muestra biológica. Los datos de cuantificación relativa acerca de las áreas de los picos cromatográficos individuales entre diferentes muestras se normalizan a la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa puede realizarse a través de muchos péptidos simultáneamente en una única muestra y/o a través de muchas muestras para obtener información con respecto a las cantidades relativas de proteínas, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

35 40 45 50 55 Los niveles cuantitativos absolutos de la proteína Src se determinan mediante la metodología SRM, en la que el área del pico cromatográfico de un péptido individual procedente de la proteína Src en una muestra biológica se compara con el área del pico cromatográfico de un patrón interno sembrado, en la que el patrón interno es una versión sintética de los mismos péptidos de Src exactos que contienen uno o más restos aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. El patrón interno se sintetiza de modo que, cuando se analiza mediante espectrometría de masas, genera una firma de pico cromatográfico predecible y constante que es diferente y está diferenciado de la

firma de pico cromatográfico del péptido de Src nativo. Así, cuando el patrón interno se siembra en una preparación de proteínas procedentes de una muestra biológica en cantidades conocidas y se analiza mediante espectrometría de masas, la firma del área del pico cromatográfico del péptido nativo se compara con la firma del área del pico cromatográfico del péptido de patrón interno, y esta comparación numérica indica la molaridad absoluta o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de proteínas original procedente de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para los fragmentos peptídicos se muestran según la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta puede realizarse a través de muchos péptidos y, por tanto, proteínas, simultáneamente en una única muestra y/o a través de muchas muestras para obtener información con respecto a las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes de muestras individuales.

Los métodos de ensayo pueden emplearse para ayudar en el diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido obtenido del paciente, tal como tejido fijado en formol, y para ayudar a determinar el agente terapéutico y la estrategia terapéutica que serían más ventajosos para su uso en el tratamiento de ese paciente. El tejido de cáncer que se retira de un paciente mediante cirugía, tal como la retirada terapéutica de tumores parciales o enteros, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o la ausencia de la enfermedad sospechada, se analiza para determinar si está o no presente una proteína, o proteínas, específicas y qué forma de las proteínas está presente en este tejido del paciente. Además, el nivel de expresión de la proteína, o proteínas, puede determinarse y compararse con un nivel de referencia o "normal" que se encuentra en un tejido sano o en un tejido que muestra un estadio/grado diferente del cáncer. Esta información después puede emplearse para asignar un estadio o grado a un cáncer específico y puede hacerse corresponder con una estrategia para tratar al paciente basada en los niveles determinados de las proteínas específicas. La correspondencia de la información específica acerca de los niveles de la proteína Src, determinada mediante un ensayo SRM, con una estrategia de tratamiento que se basa en los niveles de estas proteínas en células cancerosas obtenidas del paciente define lo que se ha denominado como una estrategia de medicina personalizada para tratar una enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en la presente constituyen los cimientos de una estrategia de medicina personalizada mediante el uso del análisis de las proteínas procedentes del tejido del propio paciente como fuente para tomar decisiones de diagnóstico y tratamiento. Yi Chen *et al.*, *Journal of proteome research* (2010), 9, 4215-4227 describen la cuantificación de los componentes de señalización de beta-catenina en líneas celulares de cáncer de colon, secciones de tejidos y células tumorales microdisecionadas empleando la espectrometría de masas para controlar reacciones.

### Descripción detallada

En principio, puede emplearse cualquier péptido predicho derivado de la proteína Src, por ejemplo, mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina), como indicador sustituto para determinar la abundancia de la proteína Src en una muestra empleando un ensayo SRM basado en la espectrometría de masas. De modo similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contenga un resto aminoácido en un sitio que se sabe que puede estar potencialmente modificado en la proteína Src también puede emplearse potencialmente para ensayar el grado de modificación de la proteína Src en una muestra. Sin embargo, de modo sorprendente, los presente inventores han descubierto que muchas secuencias peptídicas potenciales no resultan adecuadas o son ineficaces para su uso en ensayos SRM basados en la espectrometría de masas. Por ejemplo, los péptidos pueden ser difíciles de detectar mediante espectrometría de masas o pueden ser inestables en las condiciones empleadas para obtener los péptidos a partir de la proteína de origen. Esto resulta ser especialmente el caso cuando se ensayan lisados de proteínas preparados a partir de tejido fijado en formol empleando el protocolo Liquid Tissue® proporcionado en la patente de EE. UU. 7.473.532. De forma inesperada, se ha descubierto que resulta ventajoso identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados preferidos en los lisados reales de Liquid Tissue® para desarrollar un ensayo SRM fiable y preciso para la proteína Src. Los péptidos modificados y no modificados preferidos para su uso en los métodos de espectrometría de masas descritos en la presente (por ejemplo, SRM) incluyen identificar la presencia (o la ausencia) y/o la cantidad de proteínas en tejidos fijados en formol, que en lo sucesivo se denominan péptidos optimizados.

En general, los péptidos proceden de la proteína Src en el transcurso de la digestión con proteasas de las proteínas dentro de un lisado complejo de Liquid Tissue® preparado a partir de células procedentes del tejido fijado en formol de un paciente. Los lisados de Liquid Tissue® después se analizan mediante espectrometría de masas para determinar los péptidos derivados de la proteína Src que preferiblemente son detectados y analizados mediante espectrometría de masas (es decir, los péptidos modificados y no modificados preferidos optimizados). Los resultados se emplean para identificar un subconjunto específico de péptidos preferidos seleccionados por su idoneidad en el análisis de espectrometría de masas. El procedimiento empleado permite la determinación experimental de péptidos o fragmentos peptídicos que se ioniza con mayor eficacia y que proporcionan datos adecuados para identificar y cuantificar los iones de fragmentos peptídicos de transición resultantes en una preparación de Liquid Tissue® procedente del tejido fijado en formol de un paciente. Estos resultados después pueden compararse con los resultados obtenidos mediante un análisis de espectrometría de masas de la proteína recombinante que se ha digerido con la misma proteasa, o proteasas, para confirmar la existencia de los péptidos preferidos u optimizados y sus fragmentos de transición resultantes.

Además de su idoneidad en el análisis de espectrometría de masas, la capacidad de las versiones marcadas de los péptidos preferidos (o, más específicamente, optimizados) para soportar las condiciones empleadas en los

protocolos de preparación de Liquid Tissue® es un determinante importante para saber cuáles son los péptidos preferidos (u optimizados cuando se emplea un tejido fijado en formol) para el análisis cualitativo o cuantitativo de tejidos mediante espectrometría de masas (por ejemplo, SRM). Esta última propiedad depende no solo de la secuencia de aminoácidos del péptido, sino también de la capacidad de un resto modificado dentro de un péptido para sobrevivir en forma modificada durante la preparación de la muestra. El método de ensayo descrito a continuación puede emplearse para identificar los péptidos procedentes de la proteína Src que son preferidos u optimizados para identificar y cuantificar la expresión o la modificación de proteínas en muestras de pacientes y, de modo más específico, en muestras de pacientes procedentes de tejido fijado en formol, mediante un ensayo SRM basado en la espectrometría de masas.

## 10 Método de ensayo para la identificación de péptidos procedentes de la proteína Src

1. Identificación de un fragmento peptídico preferido (u optimizado), o de fragmentos peptídicos preferidos (u optimizados), para la proteína Src

a. Se trata la proteína Src purificada con los reactivos y el protocolo Liquid Tissue® emplean una proteasa o proteasas (que pueden o no incluir tripsina) para digerir la proteína Src. Se analizan algunos (por ejemplo, 10, 20, 30 o 40%), la mayoría (por ejemplo, más del 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98 o 99%) o todos los fragmentos de proteína resultantes mediante una espectrometría de masas en tándem y se identifican todos los fragmentos peptídicos procedentes de la proteína Src, en los que los fragmentos peptídicos individuales no contienen ninguna modificación del péptido, tal como fosforilaciones o glicosilaciones.

b. Se prepara un lisado de proteínas de Tissue® a partir de una muestra biológica fijada en formol empleando la misma proteasa, o proteasas, utilizadas cuando se prepara la proteína Src purificada (que pueden o no incluir tripsina) para digerir la mayoría o todas las proteínas. Se analizan algunos, la mayoría o todos los fragmentos de proteína resultantes procedentes de algunas, la mayoría o todas la proteínas en la mezcla mediante una espectrometría de masas en tándem y se identifican algunos, la mayoría o todos los fragmentos peptídicos específicamente procedentes de la proteína Src, en los que los fragmentos peptídicos individuales no contienen ninguna modificación del péptido, tal como fosforilaciones o glicosilaciones. Se analizan algunos, la mayoría o todos los fragmentos de proteína resultantes procedentes de algunas, la mayoría o todas las proteínas mediante una espectrometría de masas en tándem y se identifican algunos, la mayoría o todos los fragmentos peptídicos procedentes de la proteína Src que portan modificaciones en el péptido, tales como, por ejemplo, restos fosforilados o glicosilados.

c. Algunos, la mayoría o todos los péptidos generados mediante un método de digestión específico a partir de la proteína Src entera de longitud completa pueden medirse potencialmente, pero los péptidos preferidos son los que se identifican mediante espectrometría de masas a partir del análisis de las proteínas purificadas y que también se identifican directamente en un lisado de proteínas complejo de Liquid Tissue® preparado a partir de una muestra biológica histopatológicamente fijada (por ejemplo, pueden medirse péptidos optimizados cuando el tejido está fijado en formol).

Los péptidos que están modificados postraduccionalmente, y sus características específicas de fragmento, pueden considerarse los péptidos preferidos u optimizados y se ensayan cuando los niveles relativos de los péptidos modificados se determinan de la misma manera en que se determinan las cantidades relativas de los péptidos no modificados para la proteína Src.

2. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos procedentes de la proteína Src

a. Se realiza un ensayo de control de reacciones seleccionadas ("Selected Reaction Monitoring", SRM), o también conocido como ensayo de control de múltiples reacciones ("Multiple Reaction Monitoring", MRM), en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para cada fragmento peptídico individual preferido u optimizado identificado en un lisado de Liquid Tissue® procedente de la proteína Src y este puede desarrollarse como sigue:

i. Se determina el tiempo de retención para cada fragmento peptídico de Src para al menos un método de fraccionamiento adecuado que incluye, pero no se limita a la electroforesis en gel, la cromatografía líquida, la electroforesis capilar, la cromatografía de separación isoelectrica, la cromatografía líquida en fase nanoinvertida, la cromatografía líquida de alta resolución, o la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

ii. Se identifican los iones de transición de los fragmentos adecuados para controlar uno o más fragmentos peptídicos basándose en la mayor proporción de señal a ruido y/o en la menor desviación estándar entre análisis por duplicado realizados en muestras de Liquid Tissue® preparadas a partir de tejido histopatológicamente fijado (por ejemplo, tejidos fijados en formol).

b. Se realiza un análisis SRM/MRM de modo la cantidad del fragmento peptídico, o péptidos, de la proteína Src que se detecta, como una función del área del pico específico (o la altura cuando sea apropiado) a partir de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, refleja la cantidad relativa y absoluta de la proteína en un lisado de Liquid Tissue® concreto.

5 i. La cuantificación relativa se logra: comparando el área del pico (por ejemplo, electroforético, cromatográfico, etc.) para un fragmento peptídico con el área del pico del mismo fragmento peptídico, u otros fragmentos peptídicos procedentes de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, en la que la comparación del área del pico cromatográfico entre las muestras para un fragmento peptídico se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

Puede realizarse una comparación de la separación del área del pico para un fragmento peptídico concreto con la separación de las áreas de los picos procedentes de otros fragmentos peptídicos derivados de proteínas diferentes dentro de la misma muestra, para normalizar los niveles cambiantes de una proteína a los niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo diversas condiciones (por ejemplo, condiciones celulares).

10 La cuantificación relativa puede aplicarse a fragmentos peptídicos no modificados y a fragmentos peptídicos modificados, en los que las modificaciones incluyen, pero no se limitan a la fosforilación y/o la glicosilación, y en los que los niveles relativos de los péptidos modificados se determinan de la misma manera en que se determinan las cantidades relativas de los péptidos no modificados.

15 ii. Se logra la cuantificación absoluta de un péptido concreto comparando el área del pico para un fragmento peptídico concreto en una muestra biológica individual con el área del pico de un patrón interno de fragmento peptídico sembrado en el lisado de proteínas procedente de la muestra biológica. El análisis del péptido concreto y del patrón sembrado en la muestra puede realizarse de modo simultáneo. El patrón interno puede ser una versión marcada (por ejemplo, una versión sintética marcada) que consiste en la secuencia de aminoácidos exacta del fragmento peptídico que se está interrogando. El patrón marcado se siembra en una muestra en cantidades conocidas, y puede determinarse el área del pico cromatográfico para el patrón interno de fragmento peptídico y para el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas de los picos y derivando la cantidad absoluta del péptido nativo por comparación con la cantidad absoluta del patrón de péptido sembrado. La cuantificación absoluta puede aplicarse a fragmentos peptídicos no modificados y a fragmentos peptídicos modificados, en los que las modificaciones incluyen, pero no se limitan a la fosforilación y/o la glicosilación, y en los que los niveles absolutos de los péptidos modificados pueden determinarse de la misma manera en que se determinan los niveles absolutos de los péptidos no modificados.

20

25

3. Cuantificación de fragmentos peptídicos asociados para el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer

a. Se realiza la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína Src y se asocian los resultados con el estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral de un paciente; y/o

30 b. Se realiza la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína Src y se correlacionan con estrategias de tratamiento específicas y diferentes, habiéndose demostrado, o pudiendo demostrarse en el futuro, que esta correlación se correlaciona con los resultados de diversas estrategias de tratamiento mediante estudios de correlación a través de cohortes de pacientes y de tejidos procedentes de estos pacientes. Tras haber confirmado las correlaciones previamente establecidas mediante este ensayo, o tras haber establecido nuevas correlaciones, el método de ensayo puede emplearse para asociar los resultados cuantitativos para la proteína Src en el tejido del paciente con una estrategia de tratamiento más eficaz para el paciente.

35

**Tabla 1: Secuencias peptídicas y características específicas de c-Src**

| SEQ ID      | Secuencia peptídica    | Masa monoisotópica | Estado de carga del precursor | Precursor, m/z | Producto de transición, m/z | Tipo de ion |
|-------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| SEQ ID NO:1 | GPSAAFAPAAAEPK         | 1284,65828         | 2                             | 642,83         | 1043,55                     | y11         |
|             |                        |                    | 2                             | 642,83         | 972,51                      | y10         |
|             |                        |                    | 2                             | 642,83         | 901,48                      | y9          |
|             |                        |                    | 2                             | 642,83         | 754,41                      | y8          |
|             |                        |                    | 2                             | 642,83         | 683,37                      | y7          |
| SEQ ID NO:2 | AGPLAGGVTTFFVALY DYESR | 2087,0444          | 3                             | 696,35         | 832,35                      | y6          |
|             |                        |                    | 3                             | 696,35         | 669,28                      | y5          |
|             |                        |                    | 3                             | 696,35         | 554,26                      | y4          |
|             |                        |                    | 3                             | 696,35         | 391,19                      | y3          |
|             |                        |                    | 3                             | 696,35         | 262,15                      | y2          |

ES 2 655 104 T3

|             |                 |            |   |         |         |     |
|-------------|-----------------|------------|---|---------|---------|-----|
|             |                 |            | 2 | 1044,03 | 1115,54 | y9  |
|             |                 |            | 2 | 1044,03 | 1016,47 | y8  |
|             |                 |            | 2 | 1044,03 | 945,43  | y7  |
|             |                 |            | 2 | 1044,03 | 832,35  | y6  |
|             |                 |            | 2 | 1044,03 | 669,28  | y5  |
| SEQ ID NO:3 | TETDLSFK        | 940,4622   | 2 | 470,73  | 839,41  | y7  |
|             |                 |            | 2 | 470,73  | 710,37  | y6  |
|             |                 |            | 2 | 470,73  | 609,32  | y5  |
|             |                 |            | 2 | 470,73  | 494,30  | y4  |
|             |                 |            | 2 | 470,73  | 381,21  | y3  |
| SEQ ID NO:4 | LLLNAENPR       | 1039,58947 | 2 | 520,30  | 813,42  | y7  |
|             |                 |            | 2 | 520,30  | 700,34  | y6  |
|             |                 |            | 2 | 520,30  | 586,29  | y5  |
|             |                 |            | 2 | 520,30  | 386,21  | y3  |
|             |                 |            | 2 | 520,30  | 272,17  | y2  |
| SEQ ID NO:5 | GTFLVR          | 692,40899  | 2 | 346,71  | 534,34  | y4  |
|             |                 |            | 2 | 346,71  | 387,27  | y3  |
|             |                 |            | 2 | 346,71  | 346,71  | y2  |
|             |                 |            | 2 | 346,71  | 175,12  | y1  |
| SEQ ID NO:6 | GAYCLSVSDFDNAK  | 1489,66277 | 2 | 773,85  | 1095,53 | y10 |
|             |                 |            | 2 | 773,85  | 982,45  | y9  |
|             |                 |            | 2 | 773,85  | 895,42  | y8  |
|             |                 |            | 2 | 773,85  | 796,35  | y7  |
|             |                 |            | 2 | 773,85  | 709,32  | y6  |
| SEQ ID NO:7 | LDSGGFYITSR     | 1215,60043 | 2 | 608,30  | 987,49  | y9  |
|             |                 |            | 2 | 608,30  | 786,41  | y6  |
|             |                 |            | 2 | 608,30  | 639,35  | y5  |
|             |                 |            | 2 | 608,30  | 476,28  | y4  |
|             |                 |            | 2 | 608,30  | 363,20  | y3  |
| SEQ ID NO:8 | TQFNSLQQLVAYYSK | 1789,91193 | 3 | 597,31  | 843,46  | y7  |
|             |                 |            | 3 | 597,31  | 730,38  | y6  |
|             |                 |            | 3 | 597,31  | 631,31  | y5  |
|             |                 |            | 3 | 597,31  | 560,27  | y4  |
|             |                 |            | 3 | 597,31  | 397,21  | y3  |
|             |                 |            | 2 | 895,46  | 1099,58 | y9  |

ES 2 655 104 T3

|              |               |            |   |        |         |    |
|--------------|---------------|------------|---|--------|---------|----|
|              |               |            | 2 | 895,46 | 730,38  | y6 |
|              |               |            | 2 | 895,46 | 631,31  | y5 |
|              |               |            | 2 | 895,46 | 560,27  | y4 |
|              |               |            | 2 | 895,46 | 397,21  | y3 |
| SEQ ID NO:9  | HADGLCHR      | 908,41554  | 2 | 483,22 | 828,38  | y7 |
|              |               |            | 2 | 483,22 | 757,34  | y6 |
|              |               |            | 2 | 483,22 | 642,31  | y5 |
|              |               |            | 2 | 483,22 | 472,21  | y3 |
|              |               |            | 2 | 483,22 | 175,12  | y1 |
| SEQ ID NO:10 | GSLLDLFLK     | 892,51385  | 2 | 446,76 | 748,46  | y6 |
|              |               |            | 2 | 446,76 | 635,38  | y5 |
|              |               |            | 2 | 446,76 | 522,29  | y4 |
|              |               |            | 2 | 446,76 | 407,27  | y3 |
|              |               |            | 2 | 446,76 | 147,11  | y1 |
| SEQ ID NO:11 | AANILVGENLVCK | 1343,73515 | 2 | 700,88 | 1031,56 | y9 |
|              |               |            | 2 | 700,88 | 918,47  | y8 |
|              |               |            | 2 | 700,88 | 819,40  | y7 |
|              |               |            | 2 | 700,88 | 406,21  | y3 |
|              |               |            | 2 | 700,88 | 307,14  | y2 |
| SEQ ID NO:12 | VADFGLAR      | 848,46248  | 2 | 424,73 | 749,39  | y7 |
|              |               |            | 2 | 424,73 | 678,36  | y6 |
|              |               |            | 2 | 424,73 | 563,33  | y5 |
|              |               |            | 2 | 424,73 | 416,26  | y4 |
|              |               |            | 2 | 424,73 | 246,16  | y2 |
| SEQ ID NO:13 | LIEDNEYTAR    | 1223,59026 | 2 | 612,30 | 997,42  | y8 |
|              |               |            | 2 | 612,30 | 868,38  | y7 |
|              |               |            | 2 | 612,30 | 753,35  | y6 |
|              |               |            | 2 | 612,30 | 510,27  | y4 |
|              |               |            | 2 | 612,30 | 347,20  | y3 |
| SEQ ID NO:14 | LIEDNE(pY)TAR | 1303,55659 | 2 | 652,28 | 1077,39 | y8 |
|              |               |            | 2 | 652,28 | 948,35  | y7 |
|              |               |            | 2 | 652,28 | 833,32  | y6 |
|              |               |            | 2 | 652,28 | 590,23  | y4 |
|              |               |            | 2 | 652,28 | 347,20  | y3 |
| SEQ ID NO:15 | WTAPEAALYGR   | 1234,6215  | 2 | 617,81 | 947,49  | y9 |

ES 2 655 104 T3

|              |                 |            |   |        |         |     |
|--------------|-----------------|------------|---|--------|---------|-----|
|              |                 |            | 2 | 617,81 | 876,46  | y8  |
|              |                 |            | 2 | 617,81 | 579,32  | y5  |
|              |                 |            | 2 | 617,81 | 508,29  | y4  |
|              |                 |            | 2 | 617,81 | 395,20  | y3  |
| SEQ ID NO:16 | SDVWSFGILLTELTK | 1809,96329 | 2 | 905,49 | 1088,66 | y10 |
|              |                 |            | 2 | 905,49 | 918,55  | y8  |
|              |                 |            | 2 | 905,49 | 805,47  | y7  |
|              |                 |            | 2 | 905,49 | 692,38  | y6  |
|              |                 |            | 2 | 905,49 | 591,33  | y5  |

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un método para medir los niveles de la proteína c-Src en una muestra biológica humana, que comprende detectar al menos un fragmento peptídico procedente de c-Src en un digerido de proteínas, preparado a partir de dicha muestra biológica, empleando la espectrometría de masas; y calcular los niveles de la proteína c-Src en dicha muestra, en el que dicha muestra es un tejido fijado en formol procedente de un tumor primario o secundario, en el que dicho fragmento peptídico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7, y en el que dichos niveles medidos de la proteína c-Src se seleccionan independientemente de un nivel relativo o un nivel cuantitativo absoluto.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho digerido de proteínas comprende un digerido con proteasas, preferiblemente un digerido con tripsina.
- 3.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende además la etapa de fraccionar dicho digerido de proteínas antes de detectar dichos péptidos.
- 15 4.- El método de la reivindicación 3, en el que dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cromatografía líquida en fase nanoinversa, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de separación isoelectrica y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- 20 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además comparar una cantidad de un fragmento peptídico de c-Src seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7 en una muestra con la cantidad del mismo fragmento peptídico de c-Src en una muestra biológica diferente y separada procedente de un tumor o tumores primarios y/o secundarios diferentes y separados.
- 25 6.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho fragmento peptídico de c-Src se cuantifica comparando una cantidad de dicho fragmento peptídico de c-Src con un péptido de patrón interno de cantidad conocida, en el que el péptido en la muestra biológica y el péptido de patrón interno se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7.
- 30 7.- El método de la reivindicación 6, en el que el péptido de patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.
- 8.- Un método para determinar el estadio, el grado o el estado de diagnóstico de un cáncer en un sujeto humano, que comprende medir los niveles de la proteína c-Src en una muestra biológica procedente del sujeto mediante la detección de al menos un fragmento peptídico procedente de c-Src en un digerido, preparado a partir de dicha muestra biológica, empleando la espectrometría de masas; y calcular los niveles de la proteína c-Src en dicha muestra, en el que dicha muestra es un tejido fijado en formol procedente de un tumor primario o secundario, en el que dicho fragmento peptídico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7, y en el que dichos niveles medidos de la proteína c-Src se seleccionan independientemente de un nivel relativo o un nivel cuantitativo absoluto, y correlacionar las cantidades detectadas y cuantificadas de los fragmentos peptídicos de c-Src con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 35 9.- El método de la reivindicación 8, en el que la detección y la cuantificación de los fragmentos peptídicos de c-Src para indicar el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer pueden combinarse con la detección y la cuantificación de otros péptidos procedentes de otras proteínas en modo de múltiplex, de forma que, cuando se combinan, proporcionan más información acerca del estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 40 10.- Un método para seleccionar un tratamiento terapéutico para un sujeto humano que padece cáncer basado en el nivel cuantificado de c-Src en una muestra biológica procedente de dicho sujeto, que comprende: medir los niveles de la proteína c-Src en una muestra biológica procedente del sujeto mediante la detección de al menos un fragmento peptídico procedente de c-Src en un digerido, preparado a partir de dicha muestra biológica, empleando la espectrometría de masas; y calcular los niveles de la proteína c-Src en dicha muestra, en el que dicha muestra es un tejido fijado en formol procedente de un tumor primario o secundario, en el que dicho fragmento peptídico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7, en el que dichos niveles medidos de la proteína c-Src se seleccionan independientemente de un nivel relativo o un nivel cuantitativo absoluto, y el tratamiento terapéutico se selecciona basándose en el nivel cuantificado de c-Src en dicha muestra.
- 45 11.- El método de la reivindicación 10, en el que la detección y la cuantificación de los fragmentos peptídicos de c-Src pueden combinarse con la detección y la cuantificación de otros péptidos procedentes de otras proteínas en modo de múltiplex, de forma que la decisión del tratamiento acerca del agente o agentes y/o de la cantidad de dicho agente o agentes utilizados para el tratamiento se basa en niveles específicos de los fragmentos peptídicos de c-Src en combinación con otros péptidos/proteínas en la muestra biológica.
- 50 12.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho digerido de proteínas de dicha muestra biológica se prepara mediante las etapas de (a) calentar una composición que comprende una muestra biológica fijada en formol y un tampón de reacción a una temperatura de 80 °C a 100 °C durante un periodo de tiempo de 10 minutos a 4 horas para revertir o liberar el entrecruzamiento de las proteínas en dicha muestra biológica, y (b) tratar la composición
- 55

- 5 resultante con una cantidad eficaz de una enzima proteolítica seleccionada del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina y endoproteinasa Lys-C durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37 °C a 65 °C para romper el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y para licuar dicha muestra, produciendo con ello un lisado de biomoléculas diluible, soluble y líquido que es adecuado para el análisis de las proteínas, en el que el contenido en proteínas del lisado es representativo del contenido total en proteínas de dicha muestra biológica.