

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 125**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/US2012/058815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052710**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12838494 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2764082**

54 Título: **Ensayo SRM/MRM para medir el nivel de la proteína receptor 2 de efrina tipo A**

30 Prioridad:

**04.10.2011 US 201161543106 P**

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

**19.06.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 673 125 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 para medir el nivel de la proteína receptor 2 de efrina tipo A

**Introducción**

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de la proteína receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina.

10 Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína receptor 2 de efrina tipo A (denominadas en este documento EPHA2). La secuencia de péptidos y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en un ensayo de Monitoreo de Reacción Seleccionada (SRM) basado en espectrometría de masas, que también se puede denominar un ensayo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM). Dichos ensayos se denominan en este documento SRM/MRM. Se describe el uso de péptidos para el análisis cuantitativo de SRM/MRM de la proteína EPHA2.

15 Este ensayo SRM/MRM se puede usar para medir niveles cuantitativos relativos o absolutos de uno o más de los péptidos específicos de la proteína EPHA2. Esto proporciona un medio para medir la cantidad de proteína EPHA2 en una preparación de proteína dada obtenida a partir de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

20 Más específicamente, el ensayo SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras de lisado de proteínas complejas preparadas a partir de células adquiridas a partir de muestras de tejidos de pacientes, tales como tejido de pacientes con cáncer fijado con formalina. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de tejido fijado con formalina se describen en la patente de los Estados Unidos N° 7.473.532. Los métodos descritos en la patente de Estados Unidos N° 7.473.532 se pueden llevar a cabo convenientemente usando los reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible en OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

25 La forma más amplia y ventajosamente disponible de tejidos de pacientes con cáncer es un tejido fijado con formalina, embebido en parafina. La fijación de formaldehído/formalina del tejido extirpado quirúrgicamente es, de lejos, el método más común para conservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada para la práctica de patología estándar. Las soluciones acuosas de formaldehído se conocen como formalina. La formalina "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 estabilizador, generalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en que se conserva el tejido es remojando todo el tejido durante largos períodos de tiempo (de 8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra al 10%, seguido de incrustación del tejido entero fijo en cera de parafina durante mucho tiempo de almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente.

30 Por lo tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido de cáncer fijado en formalina serán los métodos más aceptados y ampliamente utilizados para el análisis del tejido del paciente con cáncer.

35 Los resultados del ensayo SRM/MRM pueden usarse para correlacionar niveles cuantitativos precisos y exactos de la proteína EPHA2 dentro de las muestras de tejido específicas (p. ej., una o más muestras de tejido canceroso) del paciente o sujeto del que se obtuvo el tejido (muestra biológica) recogido y preservado. Esto no solo proporciona información de diagnóstico sobre el cáncer, sino que también permite a un médico u otro profesional médico determinar la terapia adecuada para el paciente. Por ejemplo, un ensayo de este tipo puede diseñarse para diagnosticar la etapa o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que el paciente responda con mayor probabilidad. Tal ensayo, que proporciona información diagnóstica y terapéuticamente importante sobre los niveles de expresión de proteína en un tejido enfermo u otra muestra de paciente, se denomina ensayo de diagnóstico complementario.

El documento EP 1 891 446 B1 se refiere a métodos para la caracterización de enzimas usando ligandos enzimáticos unidos a soportes sólidos.

- 45 El documento US 2010/098628 A1 se refiere a la identificación de proteínas de membrana asociadas con el linfoma no Hodgkin de células B y varios otros cánceres que tienen utilidad como marcadores y para el tratamiento de dichos cánceres.

**Compendio**

50 El problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante el objeto de la reivindicación independiente adjunta; las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la proteína receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un péptido del fragmento de EPHA2 en una digestión de proteasa de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína

EPHA2 en dicha muestra; en donde el péptido del fragmento EPHA2 es el péptido de la SEQ ID NO: 1, y en el que dicha cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.

5 En una realización, el método comprende adicionalmente la etapa de fraccionar dicha digestión de proteasa antes de detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida en fase nano-invertida, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

En una realización, dicha digestión con proteasa de dicha muestra biológica se prepara mediante el protocolo Liquid Tissue™.

En una realización, dicho producto de digestión de proteasa comprende un producto de digestión de tripsina.

10 En una realización, dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas de trampa de iones, espectrometría de masas triple cuadrupolar, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI, y/o espectrometría de masas de tiempo de vuelo, y en el que el modo de espectrometría de masas utilizado es el Monitoreo de Reacción Seleccionado (SRM), Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) y/o monitorización múltiple de reacciones seleccionada (mSRM), o cualquier combinación de las mismas.

En una realización, el tejido fijado con formalina es tejido embebido en parafina.

En una realización, dicho tejido se obtiene de un tumor.

En una realización, el método comprende además cuantificar dicho péptido del fragmento EPHA2.

20 En una realización, la cuantificación del péptido del fragmento EPHA2 comprende comparar una cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido del fragmento EPHA2 en una muestra biológica diferente y separada.

En una realización, la cuantificación de dicho péptido del fragmento EPHA2 comprende determinar la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en dicha muestra biológica en comparación con un péptido estándar interno marcado isotópicamente que tiene la misma secuencia de aminoácidos.

25 En una realización, dicho péptido estándar interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados entre  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o combinaciones de los mismos.

En una realización, la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en la digestión de proteína indica la presencia de proteína EPHA2 modificada o no modificada y una asociación con cáncer en el sujeto.

30 En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2, o la cantidad de dicha proteína EPHA2 con la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

35 En una realización, correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 no modificado, o la cantidad de dicha proteína EPHA2 con la etapa/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 multiplex para proporcionar información adicional sobre la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

40 En una realización, el método comprende además seleccionar, para el sujeto a partir del cual se obtuvo dicha muestra biológica, un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 o la cantidad de proteína EPHA2.

En una realización, el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células cancerosas que expresan la proteína EPHA2.

45 Los ensayos descritos en este documento miden niveles relativos o absolutos de péptidos no modificados específicos de la proteína EPHA2 y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína EPHA2. Los ejemplos de modificaciones incluyen residuos de aminoácidos fosforilados (por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina y fosfoteonina) y residuos de aminoácidos glicosilados (por ejemplo, restos de asparagina glicosilados) que están presentes en los péptidos.

50 Los niveles cuantitativos relativos de la proteína EPHA2 se determinan mediante la metodología SRM/MRM, por ejemplo, comparando áreas de pico de firma SRM/MRM (por ejemplo, el área de pico de firma o la intensidad de ión fragmento integrado) de un péptido EPHA2 individual en diferentes muestras. Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de pico de firma SRM/MRM para múltiples péptidos de firma EPHA2, donde cada péptido tiene su

propio pico específico de firma SRM/MRM, para determinar el contenido relativo de proteína EPHA2 en una muestra biológica con el contenido de proteína EPHA2 en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta manera, la cantidad de un péptido particular, o péptidos, de la proteína EPHA2, y por lo tanto la cantidad de la proteína EPHA2, se determina con relación al mismo péptido EPHA2, o péptidos, a través de 2 o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, la cuantificación relativa puede determinarse para un péptido dado, o péptidos, de la proteína EPHA2 en una sola muestra comparando el área del pico característico para ese péptido mediante la metodología SRM/MRM con el área del pico característico para otro y diferente péptido, o péptidos, de una proteína diferente, o proteínas, dentro de la misma preparación de proteína de la muestra biológica. De esta manera, la cantidad de un péptido particular de la proteína EPHA2 y, por lo tanto, la cantidad de la proteína EPHA2, se determina, una con relación a otra, dentro de la misma muestra. Estos enfoques generan la cuantificación de un péptido individual, o péptidos, de la proteína EPHA2 a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades determinadas por el área del pico son relativas una a la otra, independientemente del peso absoluto a cantidades de volumen o peso a peso del péptido EPHA2 en la preparación de proteína a partir de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre áreas de pico de firma individuales entre muestras diferentes 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 la proteína EPHA2 simultáneamente en una única muestra y/o en muchas muestras para obtener información sobre cantidades relativas de proteína, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

Los niveles cuantitativos absolutos de la proteína EPHA2 se determinan mediante, por ejemplo, la metodología SRM/MRM mediante la cual se compara el área de pico de firma SRM/MRM de un péptido individual de la proteína EPHA2 en una muestra biológica con el área de pico de firma SRM/MRM de un "patrón interno enriquecido" agregado exógenamente. En una realización, el estándar interno es una versión sintética del mismo péptido EPHA2 exacto que contiene uno o más residuos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Los patrones internos isotópicos marcados adecuados se sintetizan de manera que, cuando se analizan por espectrometría de masas, cada patrón genera un pico de firma SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinto del pico de firma del péptido EPHA2 nativo y que puede usarse como un pico comparador. Por lo tanto, cuando el patrón interno se agrega en una cantidad conocida en una preparación de proteína de una muestra biológica y se analiza por espectrometría de masas, el área de pico de firma SRM/MRM del péptido nativo de la muestra se puede comparar con el área del pico de firma SRM/MRM del péptido patrón interno. Esta comparación numérica proporciona la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de proteína original de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para fragmentos de péptidos se muestran de acuerdo con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos y, por lo tanto, proteínas, simultáneamente en una sola muestra y/o en muchas muestras para obtener información sobre las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes enteras de muestras individuales.

El método de ensayo SRM/MRM puede usarse para ayudar al diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido derivado del 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. El tejido canceroso que se extrae de un paciente mediante cirugía, tal como la eliminación terapéutica de tumores parciales o enteros, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad sospechosa, se analiza para determinar si una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas, están presentes en ese tejido del paciente. Además, el nivel de expresión de una proteína, o proteínas múltiples, se puede determinar y comparar con un nivel "normal" o de referencia encontrado en el tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas que se encuentran en el tejido sano pueden derivarse, 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 el análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer.

Los ensayos de niveles de proteína (por ejemplo, niveles de EPHA2) también pueden usarse para diagnosticar la etapa de cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de EPHA2. 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 determinada por el ensayo SRM/MRM. El nivel o cantidad puede normalizarse para totalizar el nivel o la cantidad de proteína u otro componente en el lisado analizado (por ejemplo, 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 según se determina mediante el ensayo SRM/MRM también se puede normalizar con respecto al número de células analizadas. La información con respecto a EPHA2 puede, por lo tanto, usarse para ayudar a determinar la etapa o el grado de un cáncer al correlacionar el nivel de la proteína EPHA2 (o fragmentos de péptidos de la proteína EPHA2) con los niveles observados en tejidos normales.

Una vez que se han determinado el estadio y/o el grado y/o las características de expresión de la proteína EPHA2 del cáncer esa información puede combinarse con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente el tejido canceroso que se caracteriza, por ejemplo, por la expresión anormal de la proteína o proteína(s) (por ejemplo, EPHA2) que se ensayaron. La información coincidente de un ensayo de proteína EPHA2 a una lista de agentes terapéuticos que se dirige específicamente a, por ejemplo, la proteína EPHA2 o las células/tejido que expresan la proteína, define lo que se ha denominado un enfoque de

medicina personalizada para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en este documento forman la base de un enfoque de medicina personalizada mediante el uso de análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente de decisiones de diagnóstico y tratamiento.

### Descripción detallada

5 En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína EPHA2, preparado, por ejemplo, digiriendo con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina), se puede usar como informante sustituto para determinar la abundancia de proteína EPHA2 en una muestra usando un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De forma similar, cualquier secuencia de péptido predicha que contenga un residuo de aminoácido en un sitio que se sabe que está potencialmente modificado en la proteína EPHA2 también se puede usar para analizar el grado de modificación de la proteína EPHA2 en una muestra.

10 Los péptidos con fragmentos de EPHA2 pueden generarse mediante una variedad de formas que incluyen el uso del protocolo Liquid Tissue™ descrito, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 7.473.532. El protocolo y los reactivos de Liquid Tissue™ producen muestras de péptidos adecuadas para el análisis espectroscópico de masas a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina mediante digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/biológica. Los reactivos y protocolos adecuados también están disponibles comercialmente en OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

15 En el protocolo Liquid Tissue™, la muestra de tejido/biológica se calienta en un tampón durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, de aproximadamente 80°C a aproximadamente 100°C durante un período 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, (por ejemplo, un tampón basado en Tris, o un tampón que contiene un detergente). Después del tratamiento térmico, la muestra de tejido/biológica se trata con una o más proteasas, que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para romper el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y licuar la muestra. Las condiciones ejemplares para el tratamiento con proteasa son de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas a una temperatura de aproximadamente 37°C a aproximadamente 65°C). Ventajosamente, se emplean endoproteasas, y particularmente combinaciones de dos o tres endoproteasas, usadas ya sea simultánea o secuencialmente, para licuar la muestra. Por ejemplo, combinaciones adecuadas de proteasas pueden incluir, pero sin limitación, combinaciones de tripsina, endoproteinasa Lys-C y quimiotripsina, tales como tripsina y endoproteinasa Lys-C. El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado de biomoléculas líquido, soluble y diluible. Ventajosamente, este lisado líquido está libre de materia sólida o particulada que se puede separar del lisado por centrifugación.

20 Sorprendentemente, se descubrió que muchas secuencias de péptidos potenciales de la proteína EPHA2 son inadecuadas o ineficaces para su uso en ensayos de 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 de MRM/SRM, fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en lisados de Liquid Tissue™ para desarrollar un ensayo SRM/MRM fiable y preciso para la proteína EPHA2. Si bien no se desea estar sujeto a ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían, por ejemplo, ser difíciles de detectar mediante espectrometría de masas porque no se ionizan bien, o producen fragmentos que no son distintos de los generados a partir de otras proteínas. Los péptidos también pueden fallar al resolverse bien en la separación (por ejemplo, cromatografía líquida), o pueden adherirse a artículos de vidrio o plástico, lo que conduce a resultados erróneos en el ensayo EM/MRM.

25 Los péptidos EPHA2 encontrados en esta descripción (por ejemplo, Tablas 1 y 2 a continuación) se derivaron de la proteína EPHA2 por digestión con proteasas de todas las proteínas dentro de un lisado Liquid Tissue™ complejo preparado a partir de células adquiridas a partir de tejido de cáncer fijado con formalina. A menos que se indique lo contrario, en cada caso, la proteasa era tripsina. El lisado Liquid Tissue™ se analizó a continuación mediante espectrometría de masas para determinar los péptidos derivados de la proteína EPHA2 que se detectan y analizan mediante espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto preferido específico de péptidos para el 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 de Liquid Tissue™, y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y a las condiciones experimentales usadas en la preparación de un lisado Liquid Tissue™. Esta última propiedad se extiende no solo a la secuencia de aminoácidos del péptido sino también a la capacidad de un residuo de aminoácido modificado dentro de un péptido para sobrevivir en la forma modificada durante la preparación de la muestra.

30 Los lisados de proteínas de células adquiridas directamente a partir de tejido fijado con formalina (formaldehído) se prepararon usando los reactivos y el protocolo Liquid Tissue™. Esto implica recolectar células en un tubo de muestra a través de una microdissección de tejido seguido del calentamiento de las células en el tampón Liquid Tissue™ durante un período de tiempo prolongado. Una vez que la reticulación inducida por formalina se ha visto afectada negativamente, los tejidos/células se digieren a continuación de manera predecible usando una proteasa, tal como tripsina. El experto en la materia reconocerá que pueden usarse otras proteasas, y en particular, endoproteasas en lugar de, o además de, tripsina. Cada lisado de proteína se usó para preparar una colección de

péptidos por digestión de polipéptidos intactos con proteasa o una combinación de proteasas. Cada lisado Liquid Tissue™ se analizó (por ejemplo, mediante espectrometría de masas con trampa de iones) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos donde los datos se presentaron como la identificación de tantos péptidos como pudieron identificarse por espectrometría de masas de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteína. Puede emplearse un espectrómetro de masas de trampa de iones u otra forma de un espectrómetro de masas que sea capaz de realizar un perfil global para la identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un único lisado de proteína/péptido complejo. Los espectrómetros de masas de trampa de iones pueden, sin embargo, ser los mejores tipos de espectrómetro de masas actualmente disponibles para realizar el perfil global de péptidos. Aunque el ensayo SRM/MRM puede desarrollarse y realizarse en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluyendo un MALDI, trampa de iones o triple cuadrupolo, una plataforma de instrumentos ventajosa para el ensayo SRM/MRM a menudo se considera una plataforma de instrumento de triple cuadrupolo.

Una vez que se identificaron tantos péptidos como era posible en un único análisis de espectrometría de masas de un único lisado en las condiciones empleadas, se cotejó esa lista de péptidos y se utilizó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados de Liquid Tissue™, y la gran lista de péptidos se recopiló en un solo conjunto de datos. El conjunto de datos resultante representa los péptidos que se pueden detectar en el tipo de muestra biológica que se analizó (después de la digestión con proteasas) y específicamente en un lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica y, por lo tanto, incluye péptidos para proteínas específicas, tales como, por ejemplo, la proteína EPHA2.

Los péptidos trípticos de EPHA2 identificados como útiles en la determinación de las cantidades absolutas o relativas del receptor de EPHA2 incluyen uno o ambos péptidos de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, las secuencias de cada uno de los cuales se muestran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido embebido en parafina fijado a formalina. Por lo tanto, cualquiera de los péptidos individualmente o ambos péptidos en combinación encontrados en la Tabla 1 son candidatos para su uso en el ensayo cuantitativo SRM/MRM para la proteína EPHA2 en muestras biológicas humanas, incluyendo directamente en tejido de paciente fijado con formalina. La Tabla 2 muestra información adicional con respecto a los péptidos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia de péptidos
SEQ ID NO: 1	TASVSINQTEPPK
SEQ ID NO: 2	IDTIAPDEITVSSDFEAR

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia peptídica	Mono Isotópica	Carga precursor	m/z precursor	Transición m/z	Tipo ión
SEQ ID NO: 1	TASVSINQTFPPK	1370,7	2	686,359	813,41	y7
			2	686,359	926,494	y8
			2	686,359	1013,526	y9
			2	690,366	821,424	y7
			2	690,366	934,508	y8
			2	690,366	1021,54	y9
SEQ ID NO: 2	IDTIAPDEITVSSDFEAR	1977,95	2	989,984	811,358	y7
			2	989,984	910,426	y8
			2	989,984	1011,474	y9
			2	989,984	1124,558	y10

			2	989,984	1253,6	y11
			2	989,984	1368,627	y12
			2	989,984	1465,68	y13

Los péptidos trípticos de EPHA2 enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados a partir de múltiples lisados de Liquid Tissue™ de múltiples diferentes tejidos fijados con formalina de diferentes órganos humanos, incluidos próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos es útil para el ensayo cuantitativo SRM/MRM de la proteína EPHA2 en tejido fijado con formalina. El análisis adicional de datos de estos experimentos indicó que no se observa preferencia para ningún péptido específico de ningún sitio específico del órgano. Por lo tanto, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos de SRM/MRM de la proteína EPHA2 en un lisado Liquid Tissue™ a partir de cualquier tejido fijado en formalina que se origina de cualquier muestra biológica o de cualquier sitio de órgano en el cuerpo. Los péptidos en la Tabla 1, o ambos de estos péptidos se analizan mediante métodos que no se basan en espectroscopía de masas, que incluyen, pero no se limitan a, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia de Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información dirigida a la cantidad del(de los) péptido(s) (absolutos o relativos), la información puede emplearse en cualquiera de los métodos descritos en este documento, incluyendo indicar (diagnosticar) la presencia de cáncer en un sujeto, determinar la etapa/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico o determinar la terapéutica o el régimen de tratamiento para un sujeto/paciente.

La presente descripción incluye composiciones que comprenden tanto un péptido individualmente como ambos de los péptidos en la Tabla 1, como se caracteriza adicionalmente en la Tabla 2. Las composiciones pueden comprender tanto un péptido individualmente como ambos péptidos en combinación, en los que uno o ambos péptidos están marcados isotópicamente. Cada uno de los péptidos puede marcarse con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en: <sup>18</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>34</sup>S, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína EPHA2, tanto si están isotópicamente marcadas como no, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (p. ej., un conjunto completo de péptidos trípticos). Es posible que las composiciones no contengan ambos péptidos en combinación de EPHA2, y particularmente péptidos que aparecen en la Tabla 1 o la Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales secos o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosas), matrices o transferencias.

Una consideración 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 pueden desarrollarse y realizarse en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluyendo un MALDI, trampa de iones o triple cuadrupolo, la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo SRM/MRM a menudo se considera una plataforma de instrumento de triple cuadrupolo. Ese tipo de espectrómetro de masas puede considerarse el instrumento más adecuado para analizar un solo péptido objetivo aislado dentro de un lisado de proteína muy complejo que puede consistir en cientos de miles o millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas dentro de una célula.

Con el fin de implementar de forma más eficiente el ensayo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína EPHA2, es deseable utilizar información además de la secuencia peptídica en el análisis. Esa información adicional se puede usar para dirigir e instruir al espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo) para realizar el análisis correcto y enfocado de péptido(s) diana(s) específico(s) de manera que el ensayo pueda realizarse de manera efectiva.

La información adicional sobre péptidos diana en general, y sobre péptidos EPHA2 específicos, puede incluir una 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 del péptido adicional que se puede usar para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la proteína EPHA2 se muestra en la Tabla 2 para los dos (2) péptidos EPHA2 de la lista en la Tabla 1.

El método descrito a continuación se usó para: 1) identificar péptidos candidatos de la proteína EPHA2 que se usaron para un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína EPHA2, 2) desarrollar el ensayo individual o los ensayos SRM/MRM para los péptidos diana de la proteína EPHA2, y 3) aplicar ensayos cuantitativos para el diagnóstico del cáncer y/o la elección de la terapia óptima.

#### Método de ensayo

##### 1. Identificación de péptidos del fragmento candidato SRM/MRM para la proteína EPHA2

- a. Preparar un lisado de proteínas Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formalina usando una o varias proteasas (que pueden incluir o no tripsina) para digerir las proteínas
- b. Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en

tándem de trampa de iones e identificar todos los péptidos fragmentos de la proteína EPHA2, donde los péptidos de fragmentos individuales no contienen ninguna modificación peptídica, tales como fosforilaciones o glicosilaciones

5 c. Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de trampa de iones e identificar todos los fragmentos de péptidos de la proteína EPHA2 que llevan modificaciones de péptidos, tales como, por ejemplo, residuos fosforilados o glicosilados

10 d. Todos los péptidos generados por un método de digestión específico de la proteína EPHA2 entera de longitud completa pueden medirse potencialmente, pero los péptidos preferidos para el desarrollo del ensayo SRM/MRM son aquellos que se identifican por espectrometría de masas directamente en un lisado complejo de proteínas Liquid Tissue™ preparado a partir de una muestra biológica fijada con formalina

e. Los péptidos que se modifican específicamente (fosforilados, glucosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan y 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 analizar modificaciones peptídicas de la proteína EPHA2

15 2. Ensayo de espectrometría de masa para péptidos de fragmento de proteína EPHA2

a. El ensayo SRM/MRM en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para péptidos de fragmentos individuales identificados en un lisado Liquid Tissue™ se aplica a los péptidos de la proteína EPHA2

20 i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un péptido fragmento para condiciones óptimas de cromatografía que incluyen, entre otros, 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 de iones de cada ion de transición para cada péptido fragmento para desarrollar un ensayo SRM/MRM para cada péptido.

25 iii. El ensayo de SRM/MRM puede realizarse entonces utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo donde cada péptido tiene un pico característico y único de firma SRM/MRM que define con precisión el único ensayo SRM/MRM tal como se realiza en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

30 b. Realizar un análisis SRM/MRM para que la cantidad del péptido fragmento de la proteína EPHA2 que se detecta, en función del área exclusiva del pico de firma SRM/MRM de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, pueda 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:

35 1. La determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína EPHA2 comparando el área de pico de firma SRM/MRM de un péptido EPHA2 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina al mismo área de pico de firma SRM/MRM del mismo péptido fragmento EPHA2 en al menos un segundo, tercero, cuarto o más lisados Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas con formalina

40 2. La determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína EPHA2 comparando el área de pico de firma SRM/MRM de un péptido EPHA2 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina con las áreas de pico de firma SRM/MRM desarrolladas a partir de fragmentos de péptidos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área del pico de la firma SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento de péptido se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

45 3. La determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína EPHA2 comparando el área del pico de firma SRM/MRM para un péptido EPHA2 dado con las áreas del pico de firma SRM/MRM de otros péptidos fragmentos derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada con formalina para normalizar los niveles cambiantes de la proteína EPHA2 a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.

50 4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a péptidos de fragmentos no modificados como a péptidos fragmentos modificados de la proteína EPHA2, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glucosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera que determinar cantidades relativas de péptidos no modificados.

ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área del pico de firma

SRM/MRM para un péptido fragmento dado de la proteína EPHA2 en una muestra biológica individual con el área de pico de firma SRM/MRM de un patrón de péptido de fragmento interno introducido en el lisado de proteína de la muestra biológica

5 1. El patrón interno es una versión sintética marcada del péptido fragmento de la proteína EPHA2 que se está analizando. Este patrón se agrega a una muestra en cantidades conocidas, y el área del pico de firma SRM/MRM puede determinarse para el patrón del péptido fragmento interno y el péptido fragmento nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas de pico

10 2. Esto se puede aplicar a péptidos de fragmentos no modificados y péptidos de fragmentos modificados, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles absolutos de péptidos modificados pueden determinarse de la misma manera que la determinación de niveles absolutos de péptidos no modificados.

3. Aplicar la cuantificación de péptidos de fragmentos al diagnóstico y tratamiento del cáncer

15 a. Realizar una cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles peptídicos fragmentados de la proteína EPHA2 y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, como se entiende en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína EPHA2 en la etapa/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral del paciente

20 b. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles peptídicos fragmentados de la proteína EPHA2 y demostrar la correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en donde esta correlación ya se ha demostrado en el campo o puede demostrarse en el futuro mediante estudios de correlación entre cohortes de pacientes y el tejido de esos pacientes. Una vez que las correlaciones establecidas anteriormente o las correlaciones derivadas en el futuro se confirman con este ensayo, el método de ensayo se puede utilizar para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

25 La evaluación de los niveles de proteína EPHA2 en tejidos en base al análisis de tejidos derivados de pacientes fijados con formalina puede proporcionar información de diagnóstico, de pronóstico y terapéuticamente relevante sobre cada paciente en particular. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método es un método para medir el nivel de la proteína EPHA2 en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más péptidos de fragmento de EPHA2 modificados o no modificados en una digestión de proteína preparada a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína EPHA2 modificada o no modificada en dicha muestra; y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. En una realización relacionada de la invención como se define en las reivindicaciones, la cuantificación de uno o más péptidos fragmento EPHA2 comprende determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmento EPHA2 en una muestra biológica en comparación con una cantidad conocida de un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, donde cada uno de los péptidos fragmento EPHA2 en la muestra biológica se comparan con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, el patrón interno es un péptido patrón interno marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados entre  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o combinaciones de los mismos.

40 De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, el método para medir el nivel de la proteína EPHA2 en una muestra biológica descrita en la presente memoria (o fragmentos de péptidos como sustitutos del mismo) se puede usar como un indicador de diagnóstico del cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de las mediciones del nivel de la proteína EPHA2 pueden emplearse para determinar la etapa/grado/estado de diagnóstico de un cáncer al correlacionar (por ejemplo, comparar) el nivel de proteína EPHA2 encontrada en un tejido con el nivel de esa proteína que se encuentra en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

45 Otras realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dicha digestión de proteína comprende una digestión de proteasa. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de suero, una muestra de ascitis, una muestra de esputo, fluido linfático, una muestra de saliva, una célula o un tejido sólido.

50 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tejido es tejido embebido en parafina.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tejido se obtiene de un tumor.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tumor es un tumor primario. 1) el tumor es un tumor secundario.

55 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.

**Listado de secuencias**

<110> Expression Pathology Inc

<120> Ensayo SRM/MRM para la proteína receptor 2 Tipo A de efrina

<130> 01152.8027.WO00

5 <150> US 61/543,106

<151> 2011-10-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

```

    Thr Ala Ser Val Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys
    1           5           10

```

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

    Ile Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu
    1           5           10           15

```

```

    Ala Arg

```

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para medir el nivel de la proteína receptor 2 de efrina tipo A (EPHA2) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un péptido del fragmento EPHA2 en una digestión de proteasa de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína EPHA2 en dicha muestra; en donde el péptido del fragmento EPHA2 es el péptido de la SEQ ID NO: 1, y  
 en el que dicha cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicha digestión de proteasa antes de detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida en fase nano-invertida, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha digestión con proteasa de dicha muestra biológica se prepara mediante el protocolo Liquid Tissue™.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha digestión con proteasa comprende una digestión con tripsina.
- 20 5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas de trampa de iones, espectrometría de masas de triple cuadrupolo, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI, y/o espectrometría de masas de tiempo de vuelo, y en la que el modo de espectrometría de masas utilizado es el Monitoreo de Reacción Seleccionado (SRM), el Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM), y/o el Monitoreo de Reacción Seleccionado múltiple (mSRM), o cualquier combinación de los mismos.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el tejido fijado con formalina es tejido embebido en parafina.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho tejido se obtiene de un tumor.
- 25 8. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además cuantificar dicho péptido del fragmento EPHA2.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la cuantificación del péptido del fragmento EPHA2 comprende comparar una cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido del fragmento EPHA2 en una muestra biológica diferente y separada.
- 30 10. El método de la reivindicación 8, en el que cuantificar dicho fragmento de péptido EPHA2 comprende determinar la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en dicha muestra biológica en comparación con un péptido patrón interno marcado isotópicamente que tiene la misma secuencia de aminoácidos.
11. El método de la reivindicación 10, en el que dicho péptido patrón interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos pesados estables seleccionados de <sup>18</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>34</sup>S, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H o combinaciones de los mismos.
- 35 12. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 en la digestión proteica indica la presencia de proteína EPHA2 modificada o no modificada y una asociación con cáncer en el sujeto.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2, o la cantidad de dicha proteína EPHA2 con la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 40 14. El método de la reivindicación 13, en donde correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 no modificado, o la cantidad de dicha proteína EPHA2 con el estadio/estado/etapa 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 la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 45 15. El método de la reivindicación 1, que comprende además seleccionar para el sujeto a partir del cual se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de dicho péptido del fragmento EPHA2 o la cantidad de proteína EPHA2.
- 50 16. El método de la reivindicación 15, en el que el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células cancerosas que expresan la proteína EPHA2.