(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 555 147**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 10843597 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2517011**

(54) Título: **Ensayo SRM/MRM de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R)**

(30) Prioridad:

22.12.2009 US 289378 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2015

(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:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

DESCRIPCION

Ensayo SRM/MRM de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R)

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina.

Se describen péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina y que se denominará IGF-1R, y que se puede denominar también como proteína CD221. La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en una monitorización de reacción seleccionada (SRM) basada en espectrometría de masas, que también se puede denominar como ensayo de monitorización de reacción múltiple (MRM), y se denominará SRM/MRM. Se describe el uso de uno de tales péptidos para análisis cuantitativo SRM/MRM de la proteína IGF-1 R.

Este ensayo SRM/MRM puede usarse para medir los niveles cuantitativos relativos o absolutos de uno o más de los péptidos específicos de la proteína IGF-1R y por tanto puede proporcionar un medio para medir la cantidad de proteína IGF-1R en un preparado de proteína dado obtenido de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

Más específicamente, el ensayo SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisados de proteínas preparados a partir de células obtenidas a partir de muestras de tejido de pacientes, tal como el tejido de paciente de cáncer fijado con formalina. Se describen en la patente de EE. UU. nº 7.473.532 métodos de preparación de muestras de proteína a partir de tejido fijado con formalina. Los métodos descritos en la patente de EE. UU. nº 7.473.532 pueden llevarse a cabo convenientemente utilizando reactivos y protocolo Liquid Tissue™ disponibles de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

La forma más amplia y ventajosamente disponible de tejidos de pacientes con cáncer es el tejido fijado con formalina y embebido en parafina. La fijación con formaldehído/formalina de tejido extirpado quirúrgicamente es, con mucho, el método más común de preservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada para la práctica de la patología estándar. Las soluciones acuosas de formaldehído se conocen como formalina. La formalina “al 100%" consiste en una solución saturada de formaldehído en agua (esto es aproximadamente 40% en volumen o 37% en peso), con una pequeña cantidad de estabilizante, generalmente metanol, para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común de conservar el tejido es empapar todo el tejido durante períodos de tiempo prolongados (de 8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, llamado comúnmente formalina tamponada neutra al 10%, y a continuación embeber en cera de parafina todo el tejido fijado para el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Así pues, los métodos analíticos moleculares para analizar tejido canceroso fijado con formalina serán los métodos más aceptados y profusamente utilizados para el análisis del tejido de paciente de cáncer.

Los resultados del ensayo SRM/MRM se pueden usar para correlacionar los niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína IGF-1R dentro de las muestras de tejidos específicos (por ejemplo, muestras de tejido de cáncer) del paciente o sujeto de quien se recogió y se conservó el tejido (muestra biológica). Esto no sólo proporciona información diagnóstica sobre el cáncer, sino que también permite a un médico u otro profesional médico determinar la terapia adecuada para el paciente. Tal ensayo que proporciona información importante desde el punto de vista del diagnóstico y la terapia acerca de los niveles de expresión de la proteína en un tejido enfermo u otra muestra del paciente, se denomina ensayo de *diagnóstico acompañante*. Por ejemplo, puede diseñarse un ensayo de este tipo para diagnosticar el estadio o grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al cual es más probable que responda a un paciente.

Fundamento

Krizman D. et al. ("Quantitative analysis of IGF-1R signaling pathway activation en FFPE tissue”, Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, vol. 51, abril de 2010 (2010-04), página 1114) describen un método para medir el nivel de la proteína del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina midiendo péptidos fosforilados.

Sumario

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante la materia objeto de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes anexas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un péptido de fragmento de IGF-1R en un material de digestión de proteína preparada a partir de dicha muestra biológica humana

usando espectrometría de masas, y calcular el nivel de proteína IGF-1R en dicha muestra, en donde el péptido fragmento de IGF-1R es la SEQ ID Nº: 1 y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho material de digestión de proteína antes de la detección y/o la cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R.

En una realización, dicho material de digestión de proteína comprende un material de digestión con proteasa.

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

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

En una realización, el método comprende además cuantificar dicho péptido fragmento de IGF-1R.

En una realización, cuantificar dicho péptido fragmento de IGF-1R comprende comparar la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento de IGF-1R en una muestra diferente y separada.

En una realización, cuantificar dicho péptido fragmento de IGF-1R comprende determinar la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho péptido fragmento de IGF-1R en el 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, detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en el material de digestión de proteína indica la presencia de proteína IGF-1R modificada o no modificada y una asociación con el cáncer en el sujeto.

En una realización, la correlación de los resultados de dicha detección y/o la cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R, o el nivel de dicha proteína IGF-1R para el diagnóstico del estadio/grado/estatus del cáncer se combina con la detección y/o la cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato multiplex para proporcionar información adicional acerca del estadio/grado/estatus del diagnóstico del cáncer.

En una realización, dicha muestra biológica fue obtenida de un paciente al que se había administrado una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico, estando basado el agente y/o la cantidad del agente terapéutico administrado en la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R o el nivel de proteína IGF-1R.

En una realización, el agente terapéutico se une a la proteína IGF-1R y/o inhibe su actividad biológica.

En una realización, la muestra biológica es una muestra biológica humana.

Los ensayos que se reivindican miden los niveles *relativos o absolutos* de péptidos no modificados específicos de la proteína IGF-1R y también pueden medir los niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína IGF-1R. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados y restos de aminoácidos glicosilados que están presentes en los péptidos.

Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína IGF-1R se pueden determinar mediante la metodología SRM/MRM, por ejemplo comparando áreas de pico de signatura SRM/MRM (por ejemplo, área de pico de signatura o intensidad iónica del fragmento integrado) de un péptido IGF-1R individual en diferentes muestras. Alternativamente, es posible comparar áreas de pico de signatura SRM/GRM múltiples para múltiples péptidos signatura IGF-1R, en donde cada péptido tiene su propio pico de signatura SRM/MRM específico, para determinar el contenido de proteína IGF-1R relativo en una muestra biológica con el contenido de proteína IGF-1R en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta forma, la cantidad de un péptido o péptidos en particular, a partir de la proteína IGF-1R, y por lo tanto la cantidad de proteína IGF-1R, se determina en relación al mismo péptido o péptidos IGF-1R, a través de 2 o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para un péptido o péptidos dados, a partir de la proteína IGF-1R dentro de una sola muestra comparando el área del pico de signatura para ese péptido mediante metodología SRM/MRM con el área del pico de signatura para otro péptido o péptidos diferentes, a partir de una proteína o proteínas diferentes, dentro del mismo preparado de proteína de la muestra biológica. De esta forma, la cantidad de un péptido particular de la proteína IGF-1R, y por lo tanto la cantidad de la proteína IGF-1R, se determina relativa una con otra dentro de la misma muestra. Estos planteamientos generan la cuantificación de un péptido o péptidos individuales de la proteína IGF-1R a la cantidad de otro péptido o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades que se determinan por el área de pico son relativas entre sí, al margen de las cantidades de peso absoluto a volumen o de peso a peso del péptido IGF-1R en el preparado de proteína de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos acerca de áreas de picos signatura individuales entre muestras diferentes se normalizan respecto a la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede realizar a través de muchos péptidos de múltiples proteínas y la proteína IGF-1R simultáneamente en una muestra individual y/o a través de muchas

muestras para profundizar en las cantidades relativas de proteína, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína IGF-1R se determinan, por ejemplo, mediante la metodología SRM/MRM por la cual el área del pico de signatura de SRM/MRM de un péptido individual de la proteína IGF-1R en una muestra biológica se compara con el área del pico de signatura de SRM/MRM de un patrón interno enriquecido (*spiked*). El patrón interno puede ser una versión sintética del mismo péptido IGF-1R exacto que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Tales patrones internos marcados con isótopos se sintetizan de forma que cuando se analizan por espectrometría de masas generan un pico de signatura de SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinto del pico de signatura de péptido IGF-1R nativo, que puede ser utilizado como pico comparador. Así pues, cuando el patrón interno se enriquece en un preparado de proteína de una muestra biológica en cantidades conocidas y se analiza mediante espectrometría de masas, el área del pico de signatura de SRM/MRM del péptido nativo se compara con el área del pico de signatura de SRM/MRM del péptido patrón interno, y esta comparación numérica indica bien sea la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en el preparado de proteína original de la muestra biológica. Se presentan datos cuantitativos absolutos para péptidos fragmento de acuerdo con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos, y por tanto proteínas, simultáneamente en una muestra individual y/o a través de muchas muestras para profundizar mejor en las cantidades de proteínas absolutas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

El método de ensayo SRM/MRM se puede utilizar para ayudar en el diagnóstico de la estadificación o estadiaje del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido derivado del paciente, tal como tejido fijado con formalina, y para ayudar en la determinación del agente terapéutico que sería más ventajoso para ser usado en el tratamiento de ese paciente. El tejido canceroso que se extrae de un paciente, ya sea a través de la cirugía, tal como para la eliminación terapéutica de tumores parciales o totales, o bien mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o la ausencia de la enfermedad sospechosa, se analiza para determinar si es o no una proteína o proteínas específicas, y qué formas de proteínas están presentes en ese tejido del paciente. Además, el nivel de expresión de una proteína, o de múltiples proteínas, puede ser determinado y comparado con un nivel "normal" o de referencia encontrado en el tejido sano. Los niveles normales o de referencia de las proteínas que se encuentran en el tejido sano se pueden derivar, por ejemplo, de los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Alternativamente, se pueden obtener los niveles normales o de referencia para los individuos con cáncer mediante análisis de los tejidos relevantes no afectados por el cáncer. Los ensayos de los niveles de proteína (p. ej. niveles de IGF-1R) pueden también utilizarse para diagnosticar el estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer, mediante el empleo de los niveles de IGF-1R. 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 por el ensayo SRM/MRM. El nivel o cantidad puede normalizarse 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 basándose en volumen, expresado por ejemplo en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o la cantidad de proteína o péptido como se determina mediante el ensayo SRM/MRM puede también normalizarse respecto al número de células analizadas. La información referente a IGF-1 R puede por tanto utilizarse para ayudar en la determinación del estadío o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína IGF-1R (o péptidos fragmento de la proteína IGF-1R) con los niveles observados en los tejidos normales. Una vez que se ha determinado el estadío y/o grado, y/o las características de expresión de proteína IGF-1R del cáncer, esa información se puede hacer coincidir con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente el tejido de cáncer que se caracteriza, por ejemplo, por la expresión anómala de la proteína o proteínas (p. ej. IGF-1R) que fueron ensayadas. La información de coincidencia de un ensayo de la proteína IGF-1R con una lista de agentes terapéuticos que se dirige específicamente, por ejemplo, a la proteína IGF-1R o células/tejido que expresa la proteína, define lo que se ha denominado un planteamiento de *medicina personalizada* para el tratamiento de la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en el presente texto forman la base de un planteamiento de *medicina personalizada* usando análisis de proteínas a partir de tejido del propio paciente como fuente para el diagnóstico y las decisiones de tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1, partes A y B, muestra un ejemplo de un ensayo SRM/MRM de un péptido único de la proteína IGF-1R realizado en lisados Liquid Tissue™ con la cuantificación del péptido IGF-1R realizada en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

Descripción detallada

En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína IGF-1R, preparado por ejemplo por digestión con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina), puede utilizarse como reportero suplente para determinar la abundancia de proteína IGF-1R en una muestra usando un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. Del mismo modo, cualquier secuencia de péptido predicho que contiene un resto de

aminoácido en un sitio que se sabe que es potencialmente modificado en la proteína IGF-1R, podría también potencialmente ser utilizada para ensayar el alcance de la modificación de la proteína IGF-1R en una muestra.

Pueden ser generados péptidos fragmento IGF-1R por diversos medios, incluyendo el uso del protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la patente de EE. UU. nº 7.473.532. El protocolo y los reactivos Liquid Tissue™ son capaces de producir muestras de péptidos adecuados para análisis espectroscópico de masas a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina con digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/biológica. En el protocolo Liquid Tissue™ el tejido biológico 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 invertir o liberar el entrecruzamiento de proteína. El tampón empleado es un tampón neutro, (p. ej. 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, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, tripsina, quimiotripsina, pepsina, y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para romper el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y para licuar dicha muestra (p. ej. un período de tiempo de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37 °C a 65 °C). El resultado del calentamiento y la proteolisis es un lisado líquido, soluble, de biomoléculas diluibles.

Sorprendentemente, se encontró que muchas secuencias de péptidos potenciales de la proteína IGF-1R son inadecuadas o inefectivas para su uso en ensayos SRM/GRM basados en espectrometría de masas por razones que no son inmediatamente evidentes. Dado que no fue posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo MRM/SRM, fue necesario identificar experimentalmente los péptidos modificados y no modificados en lisados Liquid Tissue™ reales para desarrollar un ensayo SRM/MRM fiable y seguro para la proteína IGF-1R. Aunque no se desea vincularse con ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían, por ejemplo, ser 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 en la buena resolución en la separación (por ejemplo, cromatografía de líquidos), o se adhieren a vidrio o a material de plástico.

Los péptidos de IGF-1R encontrados en diversas realizaciones de esta descripción (por ejemplo, Tablas 1 y 2) fueron derivados de la proteína IGF-1R por digestión con proteasa de todas las proteínas dentro de un lisado Liquid Tissue™ complejo preparado a partir de células conseguidas de tejido canceroso fijado con formalina. A menos que se indique otra cosa, en cada caso la proteasa era tripsina. El lisado Liquid Tissue™ se analizó después por espectrometría de masas para determinar aquellos péptidos derivados de la proteína IGF-1R que son detectados y analizados mediante espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto de péptidos específico preferido para el análisis por 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.

Tabla 1

Tabla 1 **SEQ ID NO.**	**Secuencia de péptido**
SEQ ID NO: 1	GNLLINIR
SEQ ID NO: 2	AGKMYFAFNPK
SEQ ID NO: 3	AVTLTMVENDHIRGAKSEILYIR
SEQ ID NO: 4	DVEPGILLHGLK
SEQ ID NO: 5	ECGDLCPGTMEEKPMCEK
SEQ ID NO: 6	EEAEYR
SEQ ID NO: 7	ERTVISNLRPFTLYR
SEQ ID NO: 8	GPCCACPKTEAEKQAEK

Tabla 1 SEQ ID NO.	Secuencia de péptido
SEQ ID NO: 9	GVVKDEPETRVAIK
SEQ ID NO: 10	IPIRKYADGTIDIEEVRENPK
SEQ ID NO: 11	KTKTIDSVTSAQMLQGCTIFK
SEQ ID NO: 12	LCVSEIYRMEEVTGTKGR
SEQ ID NO: 13	LFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLR
SEQ ID NO: 14	LNRLNPGNYTAR
SEQ ID NO: 15	MIQMAGEIADGMAYLNANK
SEQ ID NO: 16	NADLCYLSTVDWSLILDAVSNNYIVGNK
SEQ ID NO: 17	PDNCPDMLFELMR
SEQ ID NO: 18.	PMCEKTTINNEYNYRCWTTNR
SEQ ID NO: 19	PPKECGDLCPGTMEEK
SEQ ID NO: 20	SEILYIRTNASVPSIPLDVLSASNSSSQLIVK
SEQ ID NO: 21	TEAEKQAEKEEAEYR
SEQ ID NO: 22	TEVCGGEKGPCCACPKTEAEK
SEQ ID NO: 23	TGYENFIHLIIALPVAVLLIVGGLVIMLYVFHRKR
SEQ ID NO: 24	TIDSVTSAQMLQGCTIFK
SEQ ID NO: 25	TKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGNLLINIR
SEQ ID NO: 26	TTINNEYNYRCWTTNRCQK
SEQ ID NO: 27	VFENFLHNSIFVPRPERK
SEQ ID NO: 28	WNPPSLPNGNLSYYIVR
SEQ ID NO: 29	WPEPENPNGLILMYEIK
SEQ ID NO: 30	YADGTIDIEEVTENPKTEVCGGEK
SEQ ID NO: 31	YGGAKLNRLNPGNYTAR
SEQ ID NO: 32	YGSQVEDQRECVSR
SEQ ID NO: 33	ACTENNECCHPECLGSCSAPDNDTACVACR

Tabla 1 SEQ ID NO.	Secuencia de péptido
SEQ ID NO: 34	DLAARNCMVAEDFTVK
SEQ ID NO: 35	DLISFTVYYKEAPFK
SEQ ID NO: 36	EKITMSRELGQGSFGMVYEGVAK
SEQ ID NO: 37	ELGQGSFGMVYEGVAKGWK
SEQ ID NO: 38	FPKLTVITEYLLLFR
SEQ ID NO: 39	FVMEGGLLDK
SEQ ID NO: 40	GNNIASELENFMGLIEVVTGYVK
SEQ ID NO: 41	GWKLFYNYALVIFEMTNLKDIGLYNLR
SEQ ID NO: 42	HYYYAGVCVPACPPNTYR
SEQ ID NO: 43	IDIHSCNHEAEKLGCSASNFVFAR
SEQ ID NO: 44	YRPPDYR
SEQ ID NO: 45	KYGGAK
SEQ ID NO: 46	LENCTVIEGYLHILLISKAEDYRSYR
SEQ ID NO: 47	LNPGNYTARIQpTSLSGNGSWTDPVFFYVQAK
SEQ ID NO: 48	MEEVTGTKGRQSK
SEQ ID NO: 49	NGSQSMYCIPCEGPCPK
SEQ ID NO: 50	NGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEEK
SEQ ID NO: 51	NITRGAIR
SEQ ID NO: 52	NNGER
SEQ ID NO: 53	NNGERASCESDVLH FTSTTTSK
SEQ ID NO: 54	QPQDGYLYR
SEQ ID NO: 55	QPQDGYLYRHNYCSKDK
SEQ ID NO: 56	QSKGDINTRNNGER
SEQ ID NO: 57	RGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKIR
SEQ ID NO: 58	SRNTTAADTYNITDPEELETEYPFFESR

Tabla 1 SEQ ID NO.	Secuencia de péptido
SEQ ID NO: 59	TNASVPSIPLDVLSASNSSSQLIVK
SEQ ID NO: 60	TVISNLRPFTLYR
SEQ ID NO: 61	VAGLESLGDLFPNLTVIRGWK
SEQ ID NO: 62	WPEPENPNGLILMYEIK
SEQ ID NO: 63	ALPLPQSSTC
SEQ ID NO: 64	ASCESDVLHFTSTTTSKNRIIITWHR
SEQ ID NO: 65	IIITWHR
SEQ ID NO: 66	FVMEGGLLDK
SEQ ID NO: 67	HYYYAGVCVPACPPNTYRFEGWR
SEQ ID NO: 68	NDYQQLKRLENCTVIEGYLHILLISK
SEQ ID NO: 69	NGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEEKK
SEQ ID NO: 70	NTTAADTYNITDPEELETEYPFFESR
SEQ ID NO: 71	DIYETDYYR
SEQ ID NO: 72	DIY[Fosforil]ETDYYR
SEQ ID NO: 73	DIY[Fosforil]ETDY[Fosforil]YR
SEQ ID NO: 74	DIY[Fosforil]ETDYY[Fosforil]R
SEQ ID NO: 75	DIYETDY[Fosforil]Y[Fosforil]R
SEQ ID NO: 76	DIYETDY[Fosforil]YR
SEQ ID NO: 77	DIYETDYY[Fosforil]R
SEQ ID NO: 78	DIY[Fosforil]ETDY[Fosforil]Y[Fosforil]R

Tabla 2

Tabla 2 SEQ ID NO.:	Secuencia de péptido	Masa monoisotópica	Estado de carga del precursor	m/z precursor	m/z transición	Tiopo de ion
SEQ ID NO: 1	GNLLINIR	911,555	2	456,784	515,33	y4
			2	456,784	628,41	y5
			2	456,784	7741,5	y6

Se prepararon lisados de proteína de células obtenidas directamente de tejido fijado con formalina (formaldehído) utilizando los reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo que implica recolectar las células en un tubo de muestra mediante microdisección de tejidos seguido por calentamiento de las células en el tampón de Liquid Tissue™ durante un periodo de tiempo prolongado. Una vez que el entrecruzamiento inducido por formalina ha sido afectado negativamente, el tejido/células se digieren después completamente de una manera predecible usando una proteasa, incluyendo por ejemplo, pero no limitándose a ella, la proteasa tripsina. Cada lisado de proteína se convierte en una colección de péptidos por digestión de polipéptidos intactos con la proteasa. Cada lisado Liquid Tissue™ fue analizado (por ejemplo, mediante espectrometría de masas con trampa de iones) para realizar múltiples exámenes proteómicos globales de los péptidos, donde los datos se presentaron como la identificación de tantos péptidos como pudieron ser identificados por espectrometría de masas a partir de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteínas. Se emplea un espectrómetro de masas de trampa de iones u otra forma de espectrómetro de masas que sea capaz de realizar perfiles globales para la identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un solo lisado de proteína/péptido complejo. Los espectrómetros de masas de trampa de iones, sin embargo, pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para realizar perfiles globales de péptidos. Aunque el ensayo SRM/MRM puede desarrollarse y realizarse sobre cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluyendo un MALDI, trampa de iones, o triple cuadrupolo, se considera a menudo que la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo SRM/MRM es una plataforma instrumental de triple cuadrupolo.

Una vez que se identificó la mayor cantidad de péptidos posible en un solo análisis de MS de un lisado único bajo las condiciones empleadas, a continuación, se recopiló esa lista de péptidos y se usó 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 fue recopilada en un solo conjunto de datos. Puede considerarse que ese tipo de conjunto de datos representa los péptidos que pueden ser detectados en el tipo de muestra biológica que se ha analizado (después de la digestión con proteasa), y específicamente en un lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y por tanto incluye los péptidos para proteínas específicas, tales como por ejemplo la proteína IGF-1R.

La invención implica al menos el péptido de SEQ ID Nº: 1. Otros péptidos trípticos de IGF-1R identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas del receptor IGF-1R 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: 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, SEQ ID Nº: 9, SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12, SEQ ID Nº: 13, SEQ ID Nº: 14, SEQ ID Nº: 15, SEQ ID Nº: 16, SEQ ID Nº: 17, SEQ ID Nº: 18, SEQ ID Nº: 19, SEQ ID Nº: 20, SEQ ID Nº: 21, SEQ ID Nº: 22, SEQ ID Nº: 23, SEQ ID Nº: 24, SEQ ID Nº: 25, SEQ ID Nº: 26, SEQ ID Nº: 27, SEQ ID Nº: 28, SEQ ID Nº: 29, SEQ ID Nº: 30, SEQ ID Nº: 31, SEQ ID Nº: 32, SEQ ID Nº: 33, SEQ ID Nº: 34, SEQ ID Nº: 35, SEQ ID Nº: 36, SEQ ID Nº: 37, SEQ ID Nº: 38, SEQ ID Nº: 38, SEQ ID Nº: 40, SEQ ID Nº: 41, SEQ ID Nº: 42, SEQ ID Nº: 43, SEQ ID Nº: 44, SEQ ID Nº: 45, SEQ ID Nº: 46, SEQ ID Nº: 47, SEQ ID Nº: 48, SEQ ID Nº: 49, SEQ ID Nº: 50, SEQ ID Nº: 51, SEQ ID Nº: 52, SEQ ID Nº: 53, SEQ ID Nº: 54, SEQ ID Nº: 55, SEQ ID Nº: 56, SEQ ID Nº: 57, SEQ ID Nº: 58, SEQ ID Nº: 59, SEQ ID Nº: 60, SEQ ID Nº: 61, SEQ ID Nº: 62, SEQ ID Nº: 63, SEQ ID Nº: 64, SEQ ID Nº: 65, SEQ ID Nº: 66, SEQ ID Nº: 67, SEQ ID Nº: 68, SEQ ID Nº: 69, SEQ ID Nº: 70, SEQ ID Nº: 71, SEQ ID Nº: 72, SEQ ID Nº: 73, SEQ ID Nº: 74, SEQ TD Nº: 75, SEQ ID Nº: 76, SEQ ID NO: 77 y SEQ ID Nº: 78, cada uno de los cuales está listado en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó por espectrometría de masas en lisados Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina. Así pues, cada uno de los péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de esos 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 diez o más de esos péptidos citados en la Tabla 1, y en particular combinaciones con el péptido encontrado en la Tabla 2) son candidatos para su uso en el ensayo SRM/MRM cuantitativo para la proteína IGF-1R en muestras biológicas humanas, incluyendo tejido de paciente fijado en formalina directamente.

Los péptidos trípticos IGF-1R listados en la Tabla 1 incluyen los detectados a partir de lisados múltiples Liquid Tissue™ de múltiples tejidos diferentes fijados con formalina de diferentes órganos humanos, incluyendo próstata,

colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo de SRM/MRM cuantitativo de la proteína IGF-1R en tejido fijado con formalina. Un análisis posterior de datos de estos experimentos indicó que no se observa ninguna preferencia para ningún péptido específico a partir de ningún sitio del órgano específico. Por lo tanto, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos de SRM/MRM de la proteína IGF-1R en un lisado Liquid Tissue™ desde cualquier tejido fijado con formalina que se origina de cualquier muestra biológica o a partir de cualquier sitio de órganos en el cuerpo.

En un aspecto de la descripción 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 listados en la Tabla 1, y en particular combinaciones con el péptido que también se encuentra en la Tabla 2) se ensayan por métodos que no dependen de la espectroscopia de masas, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia Western o ELISA). Al margen de cómo se obtiene la información dirigida a la cantidad de péptido o péptidos (absoluta o relativa) que se obtiene, la información puede ser empleada en cualquiera de los métodos descritos en el presente texto, incluyendo señalar (diagnosticar) la presencia de cáncer en un sujeto, determinar el estadio/grado/estatus del cáncer, proporcionar un pronóstico, o determinar el régimen terapéutico o de tratamiento para un sujeto/paciente. La invención utiliza espectrometría de masas.

También se describen composiciones que comprenden 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 la Tabla 1. Las composiciones comprenden el péptido 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, ocho o más, o diez o más péptidos que están marcados isotópicamente. Cada uno de los péptidos se puede marcar con uno o más isótopos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en: ^{18}O, ^{17}O, ^{34}S, ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína IGF-1R, tanto si están marcados con isótopos como si no lo están, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). En algunos aspectos descritos 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 IGF-1R, y particularmente los péptidos que aparecen en la Tabla 1 o la Tabla 2. Las composiciones que comprenden los péptidos pueden estar en forma de materiales secos o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosa), matrices o manchas.

Una consideración importante para la realización de un ensayo SRM/MRM es el tipo de instrumento que puede ser empleado en el análisis de los péptidos. Aunque los ensayos de SRM/GRM pueden ser desarrollados y realizados en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluyendo un MALDI, trampa de iones, o triple cuadrupolo, se considera que la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo SRM/MRM es frecuentemente una plataforma instrumental de triple cuadrupolo. Puede considerarse que ese tipo de espectrómetro de masas es el instrumento más adecuado para el análisis de un péptido diana aislado único 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.

Con el fin de implementar de la manera más eficiente el ensayo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína IGF-1R es deseable utilizar información además de la secuencia del péptido en el análisis. Esa información adicional puede ser usada en dirigir e instruir el espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo), para realizar el análisis correcto y enfocado del péptido o péptidos diana específicos, de forma que el ensayo pueda realizarse eficazmente.

La información adicional acerca de los péptidos diana en general, y acerca de los péptidos IGF-1 R específicos, puede incluir uno o más de la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, iones de transición m/z, y el tipo iónico de cada ion de transición. Se muestra por ejemplo información adicional del péptido que puede usarse para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la proteína IGF-1R para uno (1) de los péptidos de IGF-1R de la lista de la Tabla 1 y se muestra en la Tabla 2. Puede prepararse información adicional similar descrita para este un (1) péptido IGF-1R mostrado por ejemplo en la Tabla 2 obtenida y aplicada al análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1.

El método descrito a continuación se utilizó para: 1) identificar péptidos candidatos a partir de la proteína IGF-1R que se pueden utilizar para un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína IGF-1R, 2) desarrollar un ensayo o ensayos SRM/MRM individuales, para los péptidos diana de la proteína IGF-1R con el fin de correlacionarlos y 3) aplicar ensayos cuantitativos al diagnóstico del cáncer y/o elegir la terapia óptima.

Método de ensayo

1. Identificación de péptidos fragmento candidatos de SRM/GRM para la proteína IGF-1R.

   a) Preparar un lisado de proteína Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formalina usando una proteasa o proteasas (que puede 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 con trampa de iones e identificar todos los péptido fragmento de la proteína IGF-1R, donde los

péptidos fragmento individuales no contienen ninguna de las modificaciones de péptidos tales como fosforilaciones o glicosilaciones.

c) Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los péptido fragmentos de la proteína IGF-1R que llevan modificaciones de péptidos tales como por ejemplo restos fosforilados o glicosilados.

d) Todos los péptidos generados por un método de digestión específico de la totalidad de la proteína IGF-1R de longitud completa pueden ser medidos potencialmente, pero los péptidos preferidos usados 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 a partir de una muestra biológica fijada con formalina.

e) Los péptidos que son modificados específicamente (fosforilados, glicosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan, y por tanto se detectan, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina, son identificados como péptidos candidato para ensayar modificaciones de péptidos de la IGF-1R.

2. Ensayo de espectrometría de masas para péptidos fragmento de la proteína IGF-1R.

a) El ensayo SRM/MRM en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para péptidos fragmento individuales identificados en un lisado Liquid Tissue™ se aplica a los péptidos de la proteína IGF-1R.

i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un péptido fragmento para las condiciones óptimas de cromatografía incluyendo, pero sin que sea limitación, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, cromatografía líquida en fase nano-inversa, cromatografía líquida de alto rendimiento, o cromatografía de líquidos de alto rendimiento 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 de m/z para cada péptido, y el tipo de iones de cada ion de transición para cada péptido fragmento con el fin de desarrollar un ensayo SRM/MRM para cada péptido.

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

b) Realizar el análisis SRM/MRM de forma que la cantidad del péptido fragmento de la proteína IGF-1R que se detecta, en función del área del pico de signatura de SRM/MRM único a partir de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, puede indicar la cantidad tanto relativa como absoluta de proteína en un lisado de proteína particular.

i. La cuantificación relativa se puede conseguir mediante:

1. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína IGF-1R mediante la comparación del área del pico de signatura de SRM/MRM a partir de un péptido IGF-1R dado detectada en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina, con la misma área del pico de signatura de SRM/MRM del mismo péptido fragmento de IGF-1R 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.

2. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína IGF-1R mediante la comparación del área del pico de signatura de SRM/MRM a partir de un péptido de IGF-1R detectado en un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina, con las áreas de picos de signatura de SRM/GRM desarrollados a partir de fragmentos péptidos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área de pico de signatura de SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento de péptido se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

3. Determinación de aumento o la disminución de la presencia de la proteína IGF-1R mediante la comparación del área del pico de signatura de SRM/MRM para un péptido IGF-1R dado, con las áreas del pico de signatura de SRM/MRM de otros péptidos fragmento derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada con formalina para normalizar los niveles cambiantes de proteína IGF-1R a los niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo varias condiciones celulares.

4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a péptidos fragmento no modificados como a péptidos fragmento modificados de la proteína IGF-1R, donde las modificaciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera que se determinan las cantidades relativas de los péptidos no modificados.

ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede conseguir comparando el área del pico de signatura de SRM/MRM para un péptido fragmento dado de la proteína IGF-1R en una muestra biológica individual, con el área del pico de signatura de SRM/MRM de un patrón interno de péptido fragmento enriquecido, en el lisado de proteína de la muestra biológica.

1. El patrón interno es una versión sintética marcada del péptido fragmento de la proteína IGF-1R que está siendo interrogado. Este patrón está enriquecido en una muestra en cantidades conocidas, y se puede determinar el área del pico de signatura de SRM/MRM tanto para el patrón interno de péptido fragmento como el péptido fragmento nativo en la muestra biológica separadamente, seguido por la comparación de áreas de ambos picos.

2. Esto se puede aplicar a los péptidos fragmento no modificados y a los péptidos fragmento modificados, donde las modificaciones incluyen, pero sin limitarse a ellas, la fosforilación y/o la glicosilación, y donde los niveles absolutos de péptidos modificados se pueden determinar de la misma manera que se determinan los niveles absolutos de péptidos no modificados.

3. Aplicación de la cuantificación del péptido fragmento al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

a) Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de péptido fragmento de la proteína IGF-1R y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, como es bien entendido en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína IGF-1R con el estadio/grado/estatus del cáncer en el tejido tumoral del paciente.

b) Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de péptido fragmento de la proteína IGF-1R y demostrar la correlación con los resultados clínicos de estrategias de tratamiento diferentes, en donde esta correlación ha sido ya demostrada en el campo o puede demostrarse en el futuro mediante estudios de correlación entre cohortes de pacientes y tejido de esos pacientes. Una vez que son confirmadas las correlaciones previamente establecidas o bien las correlaciones derivadas en el futuro mediante este ensayo, entonces se puede utilizar el método de ensayo para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

La Figura 1 muestra un ejemplo de un único ensayo SRM/MRM realizado en lisados Liquid Tissue™ de tejido canceroso fijado con formalina. Un ensayo SRM/MRM fue desarrollado para un único péptido para la cuantificación de la proteína IGF-1R en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Las características específicas y únicas del péptido de IGF-1R GNLLINIR, SEQ ID Nº: 1, se desarrollaron mediante el análisis de todos los péptidos de IGF-1R tanto en una trampa de iones y como en espectrómetros de masas de triple cuadrupolo. Esa información incluye la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los valores de m/z de transición del precursor, y los tipos de iones de cada una de las transiciones identificadas. Esa información ha de determinarse experimentalmente para cada péptido SRM/MRM candidato directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina; porque, lo que resulta interesante es que no todos los péptidos de la proteína IGF-1R pueden ser detectados en tales lisados utilizando SRM/MRM como se describe en el presente texto, lo que indica que los péptidos de IGF-1R no detectados no pueden considerarse péptidos candidatos para el desarrollo de un ensayo SRM/MRM para ser usado en la cuantificación de péptidos/proteínas directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina.

Como se muestra en la Figura 1A, este ensayo SRM/MRM en particular fue desarrollado para este péptido de IGF-1R específico y se realizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Se analizó un lisado de proteína testigo en el que se sabía que el péptido está presente en grandes cantidades, porque este lisado se preparó a partir de un tumor de xenoinjerto de ratón que resultó de la inyección de una línea celular de cáncer derivado del ser humano en un ratón atímico (lampiño). Así, este tumor de xenoinjerto era el control positivo. La muestra experimental en este experimento fue un lisado de proteína Liquid Tissue™ preparado a partir de tejido de cáncer humano embebido en parafina fijado con formalina estándar. Los datos del ensayo indican la presencia del pico de signatura de SRM/MRM único para este péptido IGF-1R, tanto en la muestra de control (cromatografía superoir) y la muestra experimental (cromatografía inferior). La comparación del área del pico de signatura SRM/MRM entre estas 2 muestras genera la medida cuantitativa relativa para la proteína IGF-1R entre 2 muestras biológicas diferentes.

La Figura 1B muestra la medida cuantitativa del péptido mencionado anteriormente a través de una colección de siete (7) tejidos cancerosos fijados con formalina usando un patrón interno para lograr la cuantificación absoluta de la proteína IGF-1R a través de una cohorte de muestras de paciente derivadas de cáncer. Estos datos indican

cantidades absolutas de este péptido IGF-1R en función de la cantidad molar del péptido por microgramo de lisado de proteína analizado. El establecimiento de los niveles de proteína de IGF-1R en los tejidos basado en el análisis de tejido derivado del paciente fijado con formalina puede proporcionar información de diagnóstico, de pronóstico y terapéuticamente relevante acerca de cada paciente en particular. En una realización, esta descripción describe un método para medir el nivel de la proteína IGF-1R en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmento de IGF-1R modificados o no modificados en un material de digestión de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína IGF-1R 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, cuantificar uno o más péptidos fragmento de IGF-1R comprende determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmento de IGF-1R en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde cada uno de los péptidos fragmento de IGF-1R 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 ^{18}O, ^{17}O, ^{34}S, ^{15}N, ^{13}C, ^{2}H o combinaciones de los mismos.

El método para medir el nivel de la proteína IGF-1R en una muestra biológica descrita en el presente texto (o péptidos fragmento como sustitutos de la misma) se puede usar como indicador de diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de las medidas del nivel de la proteína IGF-1R se pueden emplear para determinar el diagnóstico del estadio/grado/estatus de un cáncer correlacionando (por ejemplo, comparando) el nivel de receptor IGF-1R que se encuentra en un tejido con el nivel de esa proteína que se encuentra en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Expression Pathology Inc. Krizman, David Thyparambil, Sheeno Hembrough, Todd

<120> Ensayo SRM/MRM de la proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R)

<130> 01152.8012

<150> US 61/289,378
<151>22-12- 2009

<160> 78

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido IGF-1R
<400> 1
Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg
1 5

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 2
Ala Gly Lys Met Tyr Phe Ala Phe Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 3
Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp His Ile Arg Gly Ala Lys
1 5 10 15

Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg
20

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 4
Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 5
Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 6
Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
1 5

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 7
Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 8
Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu
1 5 10 15

Lys

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 9
Gly Val Val Lys Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys
1 5 10

<210> 10
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 10
Ile Pro Ile Arg Lys Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val
1 5 10 15

Thr Glu Asn Pro Lys
20

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 11
Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
1 5 10 15

Cys Thr Ile Phe Lys
20

<210> 12
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 12
Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu Val Thr Gly Thr Lys
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 13
Leu Phe Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys
1 5 10 15

Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Leu Arg
20

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 14
Leu Asn Arg Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg
1 5 10

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 15
Met Ile Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn
1 5 10 15

Ala Asn Lys

<210> 16
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 16
Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile Leu
1 5 10 15

Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys
20 25

<210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 17
Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg
1 5 10

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 18
Pro Met Cys Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys
1 5 10 15

Trp Thr Thr Asn Arg
20

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 19
Pro Pro Lys Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys
1 5 10 15

<210> 20
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 20
Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro
1 5 10 15

Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys
20 25 30

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 21
Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg
1 5 10 15

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 22
Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Lys
20

<210> 23
<211> 35

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 23
Thr Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala
1 5 10 15

Val Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His

20 25 30

Arg Lys Arg
35

<210> 24
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 24
Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly Cys Thr Ile
1 5 10 15

Phe Lys

<210> 25
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 25
Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly Cys
1 5 10 15

Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg
20 25

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 26
Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr Asn Arg
1 5 10 15

Cys Gln Lys

<210> 27
<211> 18

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 27
Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
1 5 10 15

Arg Lys

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 28
Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn Leu Ser Tyr Tyr Ile Val
1 5 10 15

Arg

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 29
Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Lys

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 30
Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
1 5 10 15

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys

20

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 31
Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 32
Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val Ser Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 33
Ala Cys Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser
1 5 10 15

Cys Ser Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg
20 25 30

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 34
Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys
1 5 10 15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 35
Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys Glu Ala Pro Phe Lys
1 5 10 15

<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 36
Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met
1 5 10 15

Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys
20

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 37
Glu Leu Gly Gln Gly Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys
1 5 10 15

Gly Val Val Lys
20

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 38
Phe Pro Lys Leu Thr Val Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg
1 5 10 15

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 39
Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 40
Gly Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu
1 5 10 15

Val Val Thr Gly Tyr Val Lys
20

<210> 41
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 41
Gly Trp Lys Leu Phe Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr
1 5 10 15

Asn Leu Lys Asp Ile Gly Leu Tyr Asn Leu Arg
20 25

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 42
His Tyr Tyr Tyr Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr
1 5 10 15

Tyr Arg

<210> 43
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 43
Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
1 5 10 15

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg
20

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 44
Tyr Arg Pro Pro Asp Tyr Arg
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 45
Lys Tyr Gly Gly Ala Lys
1 5

<210> 46
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 46
Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg
20 25

<210> 47
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 47
Leu Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys
20 25 30

<210> 48
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 48
Met Glu Glu Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys
1 5 10

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 49
Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 50
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 50
Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro
1 5 10 15

Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
20

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 51
Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg
1 5

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 52
Asn Asn Gly Glu Arg
1 5

<210> 53
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 53
Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
1 5 10 15

Ser Thr Thr Thr Ser Lys
20

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 54
Gln Pro Gln Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 55
Gln Pro Gln Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp
1 5 10 15

Lys

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 56
Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg Asn Asn Gly Glu Arg
1 5 10

<210> 57
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 57
Arg Gly Asn Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile
1 5 10 15

Glu Val Val Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg
20 25

<210> 58
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 58
Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro Glu
1 5 10 15

Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg
20 25

<210> 59
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 59
Thr Asn Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ser Gln Leu Ile Val Lys
20 25

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 60
Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
1 5 10

<210> 61
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 61
Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val
1 5 10 15

Ile Arg Gly Trp Lys
20

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R
<400> 62
Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met Tyr Glu Ile

1 5 10 15

Lys

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 63
Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
1 5 10

<210> 64
<211> 25

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 64
Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr Ser Thr Thr Thr Ser Lys
1 5 10 15

Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
20 25

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 65
Ile Ile Ile Thr Trp His Arg
1 5

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 66
Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 67
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 67
His Tyr Tyr Tyr Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr
1 5 10 15

Tyr Arg Phe Glu Gly Trp Arg
20

<210> 68
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 68
Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu
1 5 10 15

Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile Ser Lys
20 25

<210> 69
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 69
Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro
1 5 10 15

Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys Lys
20

<210> 70
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 70
Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro Glu Glu Leu
1 5 10 15

Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg
20 25

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<400> 71
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 72
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 73
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 74
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 75
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 76
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1R

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 77
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido IGF-1Rs

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 78
Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el nivel de proteína del Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R) en una muestra biológica de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un péptido fragmento de IGF-1R en un material de digestión de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, y calcular el nivel de proteína IGF-1R en dicha muestra; en donde el péptido fragmento de IGF-1R es la SEQ ID Nº: 1 y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

2. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho material de digestión de proteína antes de la detección y/o la cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho material de digestión de proteína comprende un material de digestión de proteasa.

4. El método según la reivindicación 1, en el que el tejido es tejido embebido en parafina.

5. El método según la reivindicación 1, en el que el tejido se obtiene de un tumor.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además cuantificar dicho péptido fragmento de IGF-1R.

7. El método según la reivindicación 6, en el que la cuantificación de dicho péptido fragmento de IGF-1R comprende comparar la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento de IGF-1R en una muestra diferente y separada.

8. El método según la reivindicación 7, en el que la cuantificación de dicho péptido fragmento de IGF-1R comprende determinar la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que dicho péptido fragmento de IGF-1R en la muestra biológica es comparado con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos, y en el que el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R en el material de digestión de proteína indica la presencia de proteína IGF-1R modificada o no modificada y una asociación con el cáncer en el sujeto.

10. El método según la reivindicación 9, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R, o el nivel de dicha proteína IGF-1R con el diagnóstico del estadio/grado/estatus del cáncer.

11. El método según la reivindicación 10, en el que la correlación de los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R, o el nivel de dicha proteína IGF-1R con el diagnóstico del estadio/grado/estatus 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 acerca del diagnóstico del estadio/grado/estatus del cáncer.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra biológica se obtuvo de un paciente al cual se había administrado una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico, estando basado el agente terapéutico y/o la cantidad del agente terapéutico administrado en la cantidad de dicho péptido fragmento de IGF-1R o el nivel de proteína IGF-1R.

13. El método según la reivindicación 12, en el que el agente terapéutico se une a la proteína IGF-1R y/o inhibe su actividad biológica.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra biológica es una muestra biológica humana.

Figura 1A

A) Demostración del pico de signatura de SRM/MRM para este péptido IGF-1R en un lisado Liquid Tissue a partir de tejido de cáncer fijado con formalina.

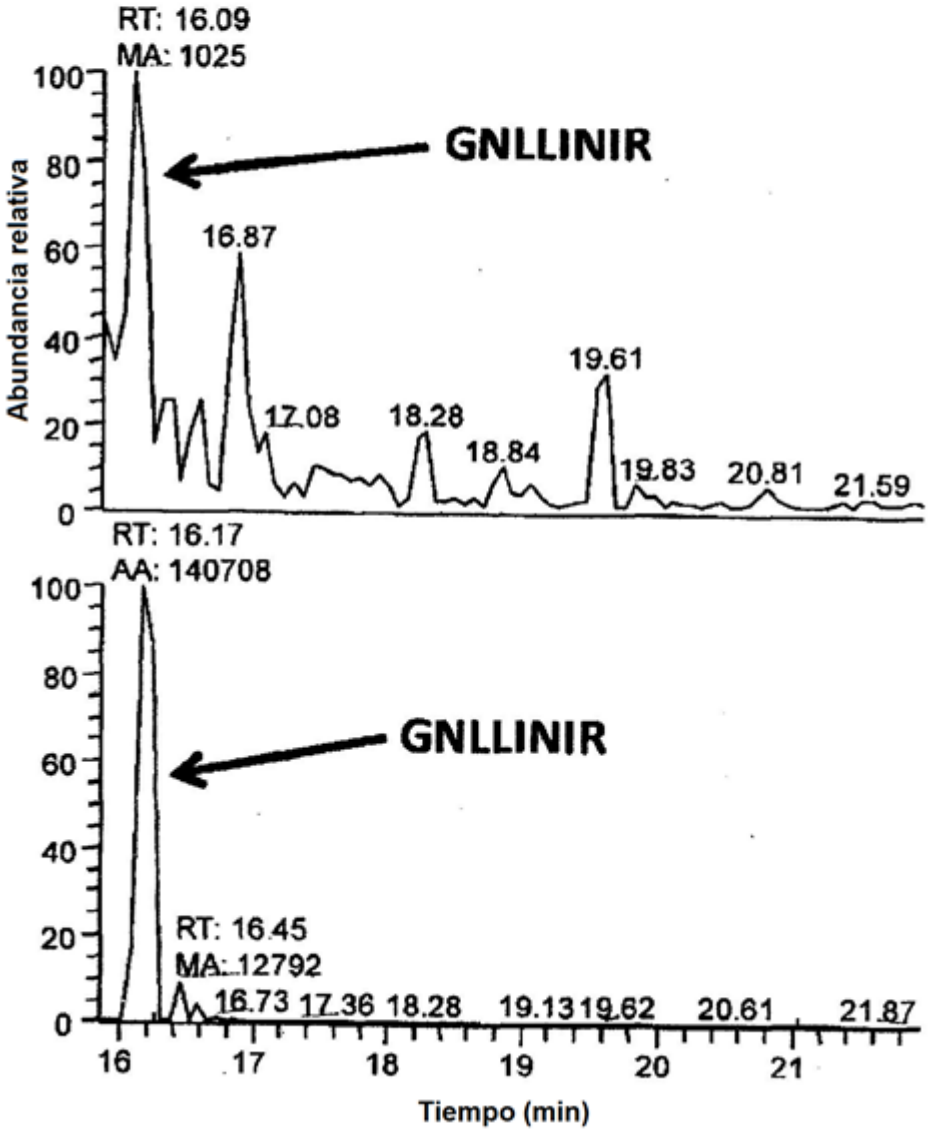
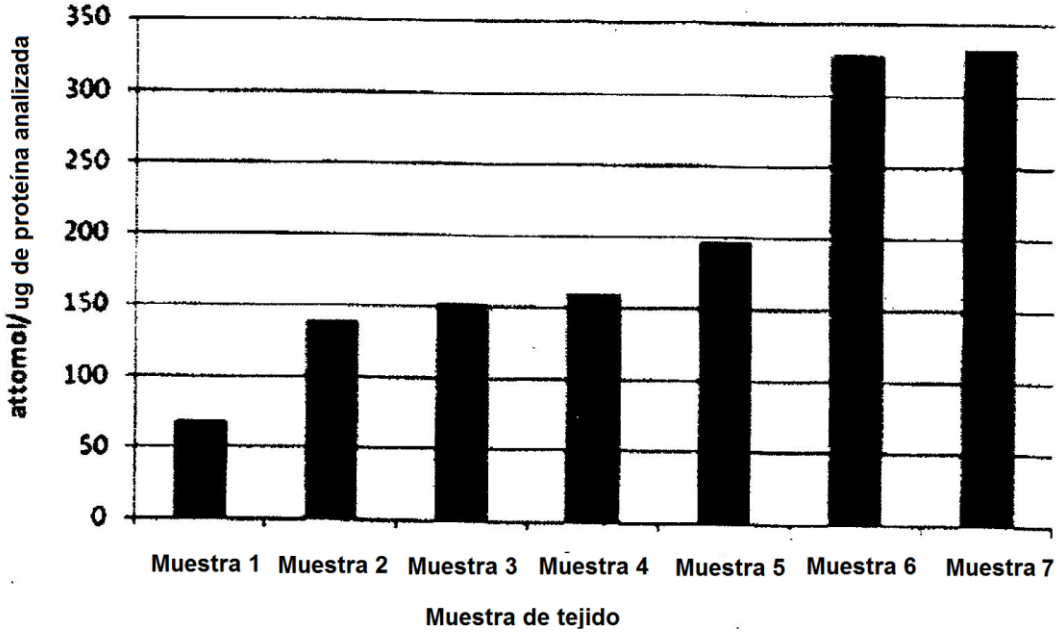


Figura 1B

B) Cuantificación comparativa a través de una cohorte de muestras de tejido fijadas con formalina