

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 807**

51 Int. Cl.:

G01N 31/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010** **PCT/US2010/061909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2011** **WO11087862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10843591 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2517002**

54 Título: **Ensayo de SRM/MRM de la proteína Sustrato 1 del Receptor de Insulina (IRS1)**

30 Prioridad:

22.12.2009 US 289382 P

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

20.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 642 807 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 de SRM/MRM de la proteína Sustrato 1 del Receptor de Insulina (IRS1)

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de la proteína sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina.

Introducción

Se describen péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína sustrato 1 del receptor de insulina, y que se denominarán IRS1. La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son especialmente útiles en una monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) basada en espectrometría de masas, que también se puede denominar ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), y se denominará SRM/MRM. Se describe información sobre el uso de péptidos para el análisis cuantitativo de SRM/MRM de la proteína IRS1.

Este ensayo de SRM/MRM se puede usar para medir los niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína IRS1, y por lo tanto proporciona un medio para medir la cantidad de la proteína IRS1 en una preparación concreta de proteínas obtenida de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

De manera más específica, el ensayo de SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras de lisados complejos de proteínas preparados a partir de células obtenidas de muestras de tejidos de pacientes, tales como tejidos de pacientes de cáncer fijados en formalina. Los métodos para la preparación de muestras de proteínas a partir de tejido fijado en formalina se describen en la patente de EE.UU. nº 7.473.532. Los métodos descritos en la patente de EE.UU. nº 7.473.532 se pueden llevar a cabo de manera conveniente mediante el uso de los reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

La forma disponible de manera más generalizada y ventajosa de tejidos de pacientes de cáncer es el tejido fijado en formalina e incrustado en parafina. La fijación en formaldehído/formalina de tejido extirpado quirúrgicamente es sin duda el método más habitual de conservación de muestras de tejidos cancerosos en todo el mundo, y es la convención aceptada para la práctica habitual de la anatomía patológica. Las disoluciones acuosas de formaldehído se denominan formalina. Un "100%" de formalina consiste en una disolución saturada de formaldehído (es decir, alrededor del 40% en volumen o del 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizante, normalmente metanol, para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La manera más habitual de conservar el tejido es empapar todo el tejido durante periodos prolongados de tiempo (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, denominado habitualmente formalina tamponada neutra al 10%, seguido de incrustación de todo el tejido fijado en cera de parafina para el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Así, los métodos analíticos moleculares para analizar un tejido canceroso fijado en formalina serán los métodos más aceptados y muy utilizados para el análisis de tejidos de pacientes de cáncer.

Los resultados del ensayo de SRM/MRM se pueden usar para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína IRS1 en las muestras de tejidos específicos (p.ej., muestra de tejido canceroso) del paciente o sujeto del que se recogió y se conservó el tejido (muestra biológica). Esto no solamente proporciona información de diagnóstico sobre el cáncer, sino que también permite a un médico u otro profesional de la medicina determinar la terapia adecuada para el paciente. Tal ensayo, que proporciona información diagnóstica y terapéutica importante sobre los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra del paciente, se denomina ensayo *de diagnóstico complementario*. Por ejemplo, se puede diseñar tal ensayo para diagnosticar el estadio o grado de un cáncer y para determinar un agente terapéutico al cual es más probable que responda un paciente.

Yi Z et al. (J Am Soc Mass Spectrom 2006, 17: 562-567) informa sobre la cuantificación de la fosforilación del sustrato-1 del receptor de insulina mediante HPLC-ESI-MS/MS.

Sumario

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante la materia de las reivindicaciones independientes adjuntas. Se pueden tomar las realizaciones preferidas de las reivindicaciones dependientes.

De manera más específica, el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método de medición del nivel de la proteína sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de IRS1 en una digestión de proteínas preparada a partir de dicha muestra biológica humana mediante el uso de espectrometría de masas; y calcular el nivel de la proteína IRS1 en dicha muestra;

en el que el fragmento peptídico de IRS1 es SEQ ID N°: 70 o SEQ ID N°: 76, y

en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicha digestión de proteínas antes de detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1.

En una realización, dicha digestión de proteínas comprende una digestión con proteasa.

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

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

En una realización, el método comprende además cuantificar dicho fragmento peptídico de IRS1.

En una realización, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de IRS1 comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica diferente y separada.

- 10 En una realización, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de IRS1 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido en una cantidad conocida, en el que dicho fragmento peptídico de IRS1 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos; y en el que el péptido patrón interno es un péptido marcado de manera isotópica.

- 15 En una realización, la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en la digestión de proteínas indica la presencia de la proteína IRS1 modificada o sin modificar y una asociación con el cáncer en el sujeto.

En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1, o el nivel de dicha proteína IRS1 con el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer.

- 20

En una realización, la correlación de los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1, o el nivel de dicha proteína IRS1 con el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato multiplexado para proporcionar información adicional sobre el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer.

- 25

Los ensayos descritos en la presente memoria miden los niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos sin modificar específicos de la proteína IRS1 y también pueden medir los niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína IRS1. Los ejemplos de modificaciones incluyen los residuos de aminoácidos fosforilados y los residuos de aminoácidos glicosilados que están presentes en los péptidos.

- 30 Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína IRS1 se determinan mediante la metodología de SRM/MRM, por ejemplo comparando las áreas de los picos distintivos de SRM/MRM (p.ej., el área de los picos distintivos o la intensidad integrada de los iones de fragmentos) de un péptido de IRS1 individual en muestras diferentes. De manera alternativa, es posible comparar múltiples áreas de picos distintivos de SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos de IRS1, en los que cada péptido tiene su propio pico distintivo de SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína IRS1 en una muestra biológica con el contenido de proteína IRS1 en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta manera, se determina la cantidad de un péptido particular, o péptidos, de la proteína IRS1, y por lo tanto la cantidad de la proteína IRS1, respecto del mismo péptido de IRS1, o péptidos, en 2 o más muestras biológicas en las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para un péptido concreto, o péptidos, de la proteína IRS1 en una única muestra comparando el área del pico distintivo para ese péptido mediante la metodología de SRM/MRM respecto del área del pico distintivo para otro péptido diferente, o péptidos, de una proteína diferente, o proteínas, en la misma preparación de proteínas de la muestra biológica. De esta manera, se determina la cantidad de un péptido particular de la proteína IRS1, y por lo tanto la cantidad de la proteína IRS1, respecto de otra en la misma muestra. Estas aproximaciones generan la cuantificación de un péptido individual, o péptidos, de la proteína IRS1 respecto de la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras, en la que las cantidades determinadas mediante el área de los picos son relativas entre sí, independientemente de las cantidades absolutas de peso por volumen o peso por peso del péptido de IRS1 en la preparación de proteínas de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre las áreas de picos distintivos individuales entre muestras diferentes se normalizan respecto de la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede llevar a cabo de manera simultánea con muchos péptidos de múltiples proteínas y la proteína IRS1 en una única muestra y/o con muchas muestras para conocer mejor las cantidades relativas de proteínas, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

- 50

Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína IRS1 se determinan, por ejemplo, mediante la metodología de SRM/MRM, por la cual el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido individual de la proteína IRS1 en una muestra biológica se compara con el área del pico distintivo de SRM/MRM de un patrón interno añadido. En una realización, el patrón interno es una versión sintética de exactamente el mismo péptido de IRS1 que contiene uno o

- 55

más residuos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Tales patrones internos marcados con isótopos se sintetizan de forma que, cuando se analizan mediante espectrometría de masas, se genera un pico distintivo de SRM/MRM predecible y coherente que es diferente y distinto del pico distintivo del péptido de IRS1 nativo y que se puede usar como pico comparativo. Así, cuando el patrón interno se añade a una preparación de proteínas de una muestra biológica en cantidades conocidas y se analiza mediante espectrometría de masas, el área del pico distintivo de SRM/MRM del péptido nativo se compara con el área del pico distintivo de SRM/MRM del péptido patrón interno, y esta comparación numérica indica la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación original de proteínas de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para los fragmentos peptídicos se expresan según la cantidad de proteína analizada por muestra. Se puede llevar a cabo de manera simultánea la cuantificación absoluta con muchos péptidos, y por tanto proteínas, en una única muestra y/o con muchas muestras para conocer mejor las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

El método de ensayo de SRM/MRM se puede usar para ayudar en el diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido obtenido de un paciente, tal como tejido fijado en formalina, y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería el más ventajoso para el uso en el tratamiento de ese paciente. El tejido canceroso que se extrae de un paciente por medio de cirugía, tal como para la extracción terapéutica de tumores parciales o completos, o por medio de procedimientos de biopsia llevados a cabo para determinar la presencia o ausencia de una presunta enfermedad, se analiza para determinar si hay presente o no una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas están presentes en ese tejido del paciente. Además, se puede determinar el nivel de expresión de una proteína, o múltiples proteínas, y se puede comparar con un nivel "normal" o de referencia hallado en el tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas halladas en el tejido sano se pueden obtener, por ejemplo, de los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. De manera alternativa, se pueden obtener los niveles normales o de referencia para individuos con cáncer mediante el análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer. Los ensayos de los niveles de proteínas (p.ej., niveles de IRS1) también se pueden usar para diagnosticar el estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado de cáncer empleando los niveles de IRS1. Los niveles o cantidades de proteínas o péptidos se pueden definir como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o péptido determinado mediante el ensayo de SRM/MRM. El nivel o cantidad se puede normalizar respecto del nivel o cantidad total de proteína u otro componente en el lisado analizado (p.ej., expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramos de proteína). Además, el nivel o la cantidad de una proteína o péptido se puede determinar respecto del volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o la cantidad de proteína o péptido determinado mediante el ensayo de SRM/MRM también se pueden normalizar respecto del número de células analizadas. Así, se puede usar la información con respecto a IRS1 para ayudar a determinar el estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína IRS (o fragmentos peptídicos de la proteína IRS1) con los niveles observados en los tejidos normales. Una vez que se ha determinado el estadio y/o grado, y/o las características de expresión de la proteína IRS1 del cáncer, esa información se puede comparar con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar de manera específica el tejido canceroso que se caracteriza, por ejemplo, por la expresión anormal de la proteína o proteína(s) (p.ej., IRS1) que se ensayaron. La información de comparación de un ensayo de proteína IRS1 con una lista de agentes terapéuticos que seleccionan de manera específica, por ejemplo, la proteína IRS1 o las células/tejidos que expresan la proteína, define lo que se ha denominado una aproximación de *medicina personalizada* para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en la presente memoria forman la base de una aproximación de *medicina personalizada* mediante el uso del análisis de las proteínas del propio tejido del paciente como fuente para las decisiones de diagnóstico y tratamiento.

Descripción Detallada

En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína IRS1, preparado por ejemplo mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (p.ej. tripsina), se puede usar como un indicador sustituto para determinar la abundancia de la proteína IRS1 en una muestra mediante el uso de un ensayo de SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De forma similar, también se podría usar potencialmente cualquier secuencia peptídica predicha que contenga un residuo de aminoácido en un sitio que se sepa que está modificado potencialmente en la proteína IRS1 para ensayar el grado de modificación de la proteína IRS1 en una muestra.

Se pueden generar fragmentos peptídicos de IRS1 mediante una diversidad de medios, que incluyen el uso del protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la patente de EE.UU. 7.473.532. El protocolo y los reactivos Liquid Tissue™ son capaces de producir muestras de péptidos adecuadas para el análisis espectroscópico de masas a partir de tejido incrustado en parafina fijado en formalina mediante digestión proteolítica de las proteínas del tejido/muestra biológica. En el protocolo Liquid Tissue™, el tejido/muestra biológica se calienta en un tampón durante un periodo prolongado de tiempo (p.ej., de alrededor de 80° C a alrededor de 100° C durante un periodo de tiempo de alrededor de 10 minutos a alrededor de 4 horas) para invertir o liberar el entrecruzamiento de las proteínas. El tampón empleado es un tampón neutro, (p.ej., un tampón basado en Tris, o un tampón que contiene un detergente). Tras el tratamiento térmico, el tejido/muestra biológica se trata con una o más proteasas, que incluyen, pero sin limitación, tripsina, quimotripsina, pepsina, y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para alterar el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica, y para licuar dicha muestra (p.ej., un periodo de tiempo de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37 °C a 65 °C). El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado de biomoléculas líquido, soluble, diluible.

- Sorprendentemente, se descubrió que muchas secuencias peptídicas potenciales de la proteína IRS1 son inadecuadas o ineficaces para el uso en los 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 de manera experimental los péptidos modificados y sin modificar en los lisados reales de Liquid Tissue™ para desarrollar un ensayo de SRM/MRM fiable y exacto para la proteína IRS1. Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría, se cree que ciertos péptidos, por ejemplo, podrían ser difíciles de detectar mediante espectrometría de masas, ya que no se ionizan bien o producen fragmentos diferentes de otras proteínas, los péptidos también pueden no resolverse bien en la separación (p.ej., cromatografía líquida), o se pueden adherir al material de vidrio o plástico.
- Los péptidos de IRS1 de esta descripción (p.ej., Tablas 1 y 2) se obtuvieron de la proteína IRS1 mediante digestión con proteasa de todas las proteínas en un lisado complejo de Liquid Tissue™ preparado a partir de células obtenidas de tejido canceroso fijado en formalina. A menos que se indique de otra manera, en cada caso la proteasa fue tripsina. El lisado de Liquid Tissue™ se analizó después mediante espectrometría de masas para determinar esos péptidos derivados de la proteína IRS1 que se detectan y se analizan mediante espectrometría de masas. La identificación de un subgrupo preferido específico de péptidos para el análisis espectrométrico de masas se basa en; 1) la determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en los análisis de espectrometría de masas de lisados de Liquid Tissue™, y 2) la capacidad del péptido de sobrevivir al protocolo y las condiciones experimentales usadas para preparar un lisado de Liquid Tissue™. Esta última propiedad se amplía no solamente a la secuencia de aminoácidos del péptido, sino también a la capacidad de un residuo de aminoácido modificado dentro de un péptido de sobrevivir en forma modificada durante la preparación de la muestra.

Tabla 1

Tabla 1 SEQ ID N°	Secuencia Peptídica
SEQ ID N°: 1	EVWQVILKPKGLGQTK
SEQ ID N°: 2	GLGQTKNLIGIYRLCLTSK
SEQ ID N°: 3	GSGDYMPMSPKSVSAPQQIINPIR
SEQ ID N°: 4	LCGAAGGLENLNYIDLVLK
SEQ ID N°: 5	LNSEAAAWLQLMNIRR
SEQ ID N°: 6	LWTNGVGGHSHVLPHPK
SEQ ID N°: 7	NKHLVALYTR
SEQ ID N°: 8	PKGLGQTKNLIGIYR
SEQ ID N°: 9	RSIPLESCFNINK
SEQ ID N°: 10	RTHSAGTSPTITHQK
SEQ ID N°: 11	SQSSSNCSNPISVPLRRHHLNPPPSQVGLTR
SEQ ID N°: 12	SVSAPQQIINPIRR
SEQ ID N°: 13	TISFVKLNSEAAAWLQLMNIR
SEQ ID N°: 14	VDTAAQTNSRLAR
SEQ ID N°: 15	VIRADPQGCRR
SEQ ID N°: 16	AASEAGGPARYEYENEK
SEQ ID N°: 17	AAWQESTGVEMGR
SEQ ID N°: 18	AAWQESTGVEMGRLGPAPPGAASICR
SEQ ID N°: 19	ADPQGCR

Tabla 1 SEQ ID N°	Secuencia Peptídica
SEQ ID N°: 20	AMSDEFRRPSK
SEQ ID N°: 21	AREQQQQQQPLLHPPEPK
SEQ ID N°: 22	ASSDGEGTMSRPASVDGSPVSPSTNR
SEQ ID N°: 23	CPSQLQPAPR
SEQ ID N°: 24	EEETGTEEYMK
SEQ ID N°: 25	CTPGTGLGTSPALAGDEAASAADLDNR
SEQ ID N°: 26	MDLGPGRR
SEQ ID N°: 27	FFVLRAASEAGGPARR
SEQ ID N°: 28	GGNGHRCTPGTGLGTSPALAGDEAASAADLDNR
SEQ ID N°: 29	HHLNNPPPSQVGLTR
SEQ ID N°: 30	HSAFVPTRSYPEEGLEMHPLER
SEQ ID N°: 31	GSGDYMPMSPK
SEQ ID N°: 32	VDTAAQTNSR
SEQ ID N°: 33	KVGYLRLK
SEQ ID N°: 34	LARPTRLSLGDPK
SEQ ID N°: 35	LHPPLNHSRSIPMPASRCSPSATSPVLSSTSGHGSTSDCLFPR
SEQ ID N°: 36	LLYAATADDSSSSTSSDSLGGGYCGAR
SEQ ID N°: 37	LSLGDPKASTLPR
SEQ ID N°: 38	LSTSSGR
SEQ ID N°: 39	PASVDGSPVSPSTNRTHAHR
SEQ ID N°: 40	PDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
SEQ ID N°: 41	PGELGGAPK
SEQ ID N°: 42	PRSKSQSSSNCSNPISVPLR
SEQ ID N°: 43	PTRLSLGDPKASTLPR
SEQ ID N°: 44	QSYVDTSPAAPVSYADMR
SEQ ID N°: 45	RHHLNNPPPSQVGLTR
SEQ ID N°: 46	HSSETFSSTPSATR
SEQ ID N°: 47	RSRTESITATSPASVMVGK
SEQ ID N°: 48	RSSDLSAYASISFQK
SEQ ID N°: 49	SIPLESCFNINK

ES 2 642 807 T3

Tabla 1 SEQ ID N°	Secuencia Peptídica
SEQ ID N°: 50	SKSQSSSNCSNPISVPLR
SEQ ID N°: 51	SRTESITATSPASMVGK
SEQ ID N°: 52	SSASVSGSPSDGGFISSDEYGSSPCDFR
SEQ ID N°: 53	SSEDLSAYASISFQKQPEDR
SEQ ID N°: 54	SSFRSVTPDSLGHTPPA
SEQ ID N°: 55	GEEELSNYICMGGK
SEQ ID N°: 56	SVTPDSLGHTPPAR
SEQ ID N°: 57	SYPEEGLEMHPLER
SEQ ID N°: 58	TESITATSPASMVGK
SEQ ID N°: 59	VGNTVPFGAGAAVGGGGGSSSSSEDK
SEQ ID N°: 60	VNLSPNRNQSAK
SEQ ID N°: 61	GSGDYMPMSPK
SEQ ID N°: 62	ASSDGEGTMSRPASVDGSPVSPSTNR
SEQ ID N°: 63	SVSAPQQIINPIR
SEQ ID N°: 64	LCLTSKTISFVKLNSEAAAVLQLMNIR
SEQ ID N°: 65	LEPSLPHPHHQLQPHLPR
SEQ ID N°: 66	LPGHRHSAFVPTR
SEQ ID N°: 67	SSEDLSAYASISFQK
SEQ ID N°: 68	PDSSTLHTDDGY[fosforil]MPMSPGVAPVPSGR
SEQ ID N°: 69	SPGEY[fosforil]VNIEFGSDQSGYLSGPVAFHSSPSVR
SEQ ID N°: 70	EQQQQQQLLHPPEPK
SEQ ID N°: 71	HSSASFENVWLRPGELGGAPK
SEQ ID N°: 72	LEYYENEK
SEQ ID N°: 73	LNSEAAAVLQLMNIR
SEQ ID N°: 74	LSLGDPK
SEQ ID N°: 75	NLIGIYR
SEQ ID N°: 76	TGIAAEEVSLPR
SEQ ID N°: 77	HLVALYTR

Tabla 2

Tabla 2 SEQ ID N°	Secuencia peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de Carga del Precursor	m/z del precursor	m/z de transición	Tipo de lón
SEQ ID N°: 22	ASSDGEGTMSRPASVDGSPV SPSTNR	2548,146	2	1275,07996	574,2938	y5
			2		857,447	y8
			2		1302,628	y13
			2		1373,665	y14
			2		1470,718	y15
			3	850,388977	944,4791	y9
			3		1001,5	y10
			3		1116,527	y11
			3		1215,596	y12
			3		1302,628	y13
			3		1373,665	y14
			3		1470,718	y15
SEQ ID N°: 70	EQQQQQQPLLHPPEPK	1923,98	2	962,997009	930,5402	y8
			2		1027,593	y9
			2		1155,651	y10
			2		1283,71	y11
			2		1411,769	y12
			3	642,333984	578,3294	y10
			3		704,3721	y6
			3		706,388	y12
			3		770,4172	y13
			3		817,4561	y7
			3		930,5402	y8
			3		1027,593	y9
			3		1155,651	y10
SEQ ID N°: 77	HLVALYTR	971,555	2	486,783997	552,3135	y4
			2		623,3506	y5

Tabla 2 SEQ ID N°	Secuencia peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de Carga del Precursor	m/z del precursor	m/z de transición	Tipo de lón
			2		722,419	y6
			2		835,5031	y7
			2		972,562	y8
SEQ ID N°: 71	HSSASFENVWLRPGELGGAPK	2238,118	2	1120,06604	825,4459	y9
			2		1280,71	y12
			2		1379,779	y13
			2		1493,822	y14
			3	747,046021	825,4459	y9
			3		981,5471	y10
			3		1008,021	y19
			3		1094,631	y11
			3		1280,71	y12
			3		1379,779	y13
			3		1493,822	y14
SEQ ID N°: 72	LEYYENEK	1086,487	2	544,25	390,1978	y3
			2		682,3037	y5
			2		845,367	y6
			2		974,4096	y7
			2		1087,494	y8
SEQ ID N°: 73	LNSEAAAVVLQLMNIR	1740,956	2	871,484985	774,4285	y6
			2		855,4565	b8
			2		887,5126	y7
			2		986,581	y8
			2		1085,649	y9
			2		1156,687	y10
			2		1227,724	y11
			2		1298,761	y12
			2		1427,803	y13

ES 2 642 807 T3

Tabla 2 SEQ ID N°	Secuencia peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de Carga del Precursor	m/z del precursor	m/z de transición	Tipo de lón
SEQ ID N°: 74	LSLGDPK	728,407	2	365,209992	416,2134	y4
			2		529,2975	y5
			2		616,3295	y6
			2		729,4136	y7
			3	354,187012	406,2039	y4
			3		507,2516	y5
			3		594,2836	y6
			3		707,3677	y7
SEQ ID N°: 75	NLIGIYR	847,492	2	424,752991	451,2658	y3
			2		508,2873	y4
			2		621,3713	y5
			2		734,4554	y6
			2		848,4983	y7
SEQ ID N°: 44	QSYVDTSAPVSYADMR	1956,889	2	979,450989	938,4395	y8
			2		1009,477	y9
			2		1080,514	y10
			2		1177,567	y11
			2		1264,599	y12
			3	653,302979	655,2863	y5
			3		742,3183	y6
			3		841,3867	y7
			3		938,4395	y8
			3		1009,477	y9
			3		1080,514	y10
			3		1177,567	y11
SEQ ID N°: 63	SVSAPQQIINPIR	1421,799	2	711,906006	385,2552	y3
			2		499,2982	y4

Tabla 2 SEQ ID N°	Secuencia peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de Carga del Precursor	m/z del precursor	m/z de transición	Tipo de lón
			2		725,4663	y6
			2		853,5248	y7
			2		981,5834	y8
			2		1078,636	y9
			2		1149,673	y10
			2		1236,705	y11
			2		1335,774	y12
			2		1422,806	y13
SEQ ID N°: 57	SYPEEGLEMHPLER	1685,772	2	843,893005	514,2979	y4
			2		718,8453	y12
			2		911,4398	y7
			2		1024,524	y8
			2		1081,545	y9
			2		1210,588	y10
			2		1339,63	y11
			2		1436,683	y12
SEQ ID N°: 76	TGIAAEEVSLPR	1241,662	2	621,838013	272,1712	y2
			2		700,3983	y6
			2		829,4409	y7
			2		900,478	y8
			2		971,5151	y9
			2		1084,599	y10
			2		1141,621	y11
			2		1242,668	y12

Se prepararon lisados de proteínas de células obtenidas directamente de tejido fijado en formalina (formaldehído) mediante el uso de los reactivos y el protocolo de Liquid Tissue™, que implica la recogida de las células en un tubo de muestras por medio de microdissección del tejido, seguido de calentamiento de las células en el tampón de Liquid Tissue™ durante un periodo prolongado de tiempo. Una vez que el entrecruzamiento inducido por la formalina se ha visto negativamente afectado, el tejido/células se digieren hasta la finalización de una manera predecible mediante el uso de una proteasa, que incluye por ejemplo, pero sin limitación, la proteasa tripsina. Cada lisado de proteínas se convierte en una colección de péptidos mediante digestión de los polipéptidos intactos con la proteasa. Cada lisado de Liquid Tissue™ se analizó (p.ej., mediante espectrometría de masas de trampa de iones) para llevar a cabo

múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos, en los que los datos se presentaron como la identificación de tantos péptidos como se pudo identificar mediante espectrometría de masas 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 llevar a cabo un perfil global para la identificación de tantos péptidos como sea posible de un único lisado complejo de proteínas/péptidos. Los espectrómetros de masas de trampa de iones, sin embargo, pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para llevar a cabo un perfil global de péptidos. Aunque el ensayo de SRM/MRM se puede desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, de trampa de iones, o de triple cuadrupolo, a menudo se considera que la plataforma instrumental más ventajosa para un ensayo de SRM/MRM es una plataforma instrumental de triple cuadrupolo.

Una vez que se identificaron tantos péptidos como fue posible en un único análisis de MS de un único lisado en las condiciones empleadas, esa lista de péptidos se ordenó y se usó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados de Liquid Tissue™, y la lista muy larga de péptidos se ordenó hasta un único conjunto de datos. Se puede considerar que ese tipo de conjunto de datos representa los péptidos que se pueden detectar en el tipo de muestra biológica que se analizó (tras la digestión con proteasa), y de manera específica en un lisado de Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y así incluye los péptidos para proteínas específicas, tales como, por ejemplo, la proteína IRS1.

Los péptidos tripticos de IRS1 identificados como útiles en la determinación de las cantidades absolutas o relativas del receptor IRS1 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 N°:1, SEQ ID N°:2, SEQ ID N°:3, SEQ ID N°:4, SEQ ID N°:5, SEQ ID N°:6, SEQ ID N°:7, SEQ ID N°:8, SEQ ID N°:9, SEQ ID N°:10, SEQ ID N°:11, SEQ ID N°:12, SEQ ID N°:13, SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:16, SEQ ID N°:17, SEQ ID N°:18, SEQ ID N°:19, SEQ ID N°:20, SEQ ID N°:21, SEQ ID N°:22, SEQ ID N°:23, SEQ ID N°:24, SEQ ID N°:25, SEQ ID N°:26, SEQ ID N°:27, SEQ ID N°:28, SEQ ID N°:29, SEQ ID N°:30, SEQ ID N°:31, SEQ ID N°:32, SEQ ID N°:33, SEQ ID N°:34, SEQ ID N°:35, SEQ ID N°:36, SEQ ID N°:37, SEQ ID N°:38, SEQ ID N°:39, SEQ ID N°:40, SEQ ID N°:41, SEQ ID N°:42, SEQ ID N°:43, SEQ ID N°:44, SEQ ID N°:45, SEQ ID N°:46, SEQ ID N°:47, SEQ ID N°:48, SEQ ID N°:49, SEQ ID N°:50, SEQ ID N°:51, SEQ ID N°:52, SEQ ID N°:53, SEQ ID N°:54, SEQ ID N°:55, SEQ ID N°:56, SEQ ID N°:57, SEQ ID N°:58, SEQ ID N°:59, SEQ ID N°:60, SEQ ID N°:61, SEQ ID N°:62, SEQ ID N°:63, SEQ ID N°:64, SEQ ID N°:65, SEQ ID N°:66, SEQ ID N°:67, SEQ ID N°:68, SEQ ID N°:69, SEQ ID N°:70, SEQ ID N°:71, SEQ ID N°:72, SEQ ID N°:73, SEQ ID N°:74, SEQ ID N°:75, SEQ ID N°:76, y SEQ ID N°:77, cada uno de los cuales se enumeran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados de Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido fijado en formalina e incrustado en parafina. Así, cada uno de los péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (p.ej., uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más de esos péptidos enumerados en la Tabla 1, y en particular las combinaciones con uno o más de los péptidos hallados en la Tabla 2) son candidatos para el uso en el ensayo cuantitativo de SRM/MRM de la proteína IRS1 en muestras biológicas humanas, que incluyen directamente el tejido de un paciente fijado en formalina.

Los péptidos tripticos de IRS1 enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados a partir de múltiples lisados de Liquid Tissue™ de múltiples tejidos fijados en formalina diferentes de órganos humanos diferentes que incluyen próstata, colon, y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo de SRM/MRM de la proteína IRS1 en el tejido fijado en formalina. El análisis adicional de los datos de estos experimentos indicó que no se observó una preferencia por ningún péptido específico de ningún órgano específico. Así, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar los ensayos de SRM/MRM de la proteína IRS1 en un lisado de Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado en formalina originado a partir de cualquier muestra biológica o cualquier órgano del cuerpo.

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 esos péptidos enumerados en la Tabla 1, y en particular las combinaciones con los péptidos también hallados en la Tabla 2) se pueden ensayar mediante métodos que no dependen de la espectroscopía de masas, que incluyen, pero sin limitación, métodos inmunológicos (p.ej., transferencia de Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información sobre la cantidad (absoluta o relativa) de el/los péptido(s), la información se puede emplear en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, que incluye indicar (diagnosticar) la presencia de un cáncer en un sujeto, determinar el estadio/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico, o determinar el régimen terapéutico o de tratamiento para un sujeto/paciente.

La presente descripción incluye 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. En ciertas realizaciones, las composiciones 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 2. Las composiciones que comprenden los 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 de manera isotópica. Cada uno de los péptidos puede estar marcado con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en: ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H, o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína IRS1, ya estén marcados o no con isótopos, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (p.ej., un grupo completo de péptidos tripticos).

Opcionalmente, 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 IRS1, y en particular 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 (p.ej., acuosas), matrices, o transferencias.

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

- Para implementar de manera más eficaz un ensayo de SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína IRS1, 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 (p.ej. un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo) para
- 15 llevar a cabo el análisis correcto y enfocado de el/los péptido(s) seleccionado(s) como objetivo específico(s), de forma que el ensayo se puede llevar a cabo de manera eficaz.

- La información adicional sobre los péptidos seleccionados como objetivo en general, y sobre péptidos de IRS1 específicos, puede incluir uno o más de la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, el m/z de los iones de transición, y el tipo de ión de cada ión de transición. La información
- 20 adicional del péptido que se puede usar para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la proteína IRS se muestra por ejemplo para doce (12) de los péptidos de IRS1 de la lista de la Tabla 1, y se muestra en la Tabla 2. Una información adicional similar descrita para estos doce (12) péptidos de IRS1 mostrados, por ejemplo, en la Tabla 2, se puede preparar, obtener, y aplicar para el análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1.

- El método descrito más adelante se usó para: 1) identificar los péptidos candidatos de la proteína IRS1 que se pueden usar para un ensayo de SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína IRS1, 2) desarrollar un ensayo, o ensayos, de SRM/MRM individual para seleccionar como objetivo péptidos de la proteína IRS1 para correlacionarlos y 3) aplicar ensayos cuantitativos para el diagnóstico del cáncer y/o la elección de la
- 25 terapia óptima.

Método de Ensayo

- 30 1. Identificación de fragmentos peptídicos candidatos de SRM/MRM para la proteína IRS
- a. Preparar un lisado de proteínas de Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada en formalina mediante el uso de una proteasa o proteasas (que pueden incluir o no incluir tripsina), para digerir las proteínas
- 35 b. Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína IRS1, en el que los fragmentos peptídicos individuales no contienen ninguna modificación peptídica tal como fosforilaciones o glicosilaciones
- 40 c. Analizar todos los fragmentos de proteínas en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína IRS1 que portan modificaciones peptídicas tales como, por ejemplo, residuos fosforilados o glicosilados
- d. Se pueden medir potencialmente todos los péptidos generados mediante un método de digestión específica de la proteína IRS1 intacta, de longitud completa, pero los péptidos preferidos usados para el desarrollo del ensayo de SRM/MRM son aquellos que se identifican mediante espectrometría de masas directamente en un lisado complejo de proteínas de Liquid Tissue™ preparado a partir de una muestra
- 45 biológica fijada en formalina
- e. Los péptidos que están modificados de manera específica (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 de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina se identifican como péptidos candidatos para ensayar las modificaciones peptídicas de la proteína IRS1
- 50 2. Ensayo de Espectrometría de Masas para Fragmentos Peptídicos de la Proteína IRS1
- a. Se aplica el ensayo de SRM/MRM en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para fragmentos peptídicos individuales identificados en un lisado de Liquid Tissue™ a péptidos de la proteína IRS
- i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento peptídico para las condiciones de cromatografía óptimas que incluyen, pero sin limitación, electroforesis en gel, cromatografía líquida,

electroforesis capilar, cromatografía líquida de fase nano-inversa, cromatografía líquida de alto rendimiento, o cromatografía líquida de alto rendimiento de 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, el m/z del ión de transición para cada péptido, y el tipo de ión de cada ión de transición para cada fragmento peptídico, para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para cada péptido.

iii. El ensayo de SRM/MRM se puede llevar a cabo después mediante el uso de la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, en el que cada péptido tiene un pico distintivo de SRM/MRM característico y exclusivo que define exactamente el ensayo de SRM/MRM exclusivo como se lleva a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

b. Llevar a cabo el análisis de SRM/MRM de forma que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína IRS1 que se detecta, como función del área del pico distintivo de SRM/MRM exclusivo a partir de un análisis de espectrometría de masas de SRM/MRM, puede indicar tanto la cantidad relativa como la absoluta de la proteína en un lisado de proteínas particular.

i. La cuantificación relativa se puede conseguir:

1. Determinando la presencia incrementada o disminuida de la proteína IRS1 comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido de IRS1 concreto detectado en un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina respecto de la misma área del pico distintivo de SRM/MRM del mismo fragmento peptídico de IRS1 en al menos un segundo, tercer, cuarto o más lisados de Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas en formalina

2. Determinando la presencia incrementada o disminuida de la proteína IRS comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido de IRS1 concreto detectado en un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina respecto de las áreas de picos distintivos de SRM/MRM desarrollados a partir de fragmentos peptídicos de otras proteínas, en otras muestras obtenidas de fuentes biológicas diferentes y separadas, en el que la comparación de las áreas de picos distintivos de SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento de péptido se normalizan respecto de la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

3. Determinando la presencia incrementada o disminuida de la proteína IRS comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM para un péptido de IRS1 concreto respecto de las áreas de picos distintivos de SRM/MRM de otros fragmentos peptídicos derivados de proteínas diferentes en el mismo lisado de Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada en formalina para normalizar los niveles variables de proteína IRS1 respecto de los niveles de otras proteínas que no varían sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.

4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a fragmentos peptídicos sin modificar como a fragmentos peptídicos modificados de la proteína IRS1, en los que las modificaciones incluyen, pero sin limitación, fosforilación y/o glicosilación, y en los que los niveles relativos de los péptidos modificados se determinan de la misma manera que se determinan las cantidades relativas de los péptidos sin modificar.

ii. La cuantificación absoluta de un péptido concreto se puede conseguir comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM para un fragmento peptídico concreto de la proteína IRS1 en una muestra biológica individual respecto del área del pico distintivo de SRM/MRM de un patrón interno de fragmento peptídico añadido al lisado de proteínas de la muestra biológica

1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico de la proteína IRS1 que se está investigando. Este patrón se añade a una muestra en cantidades conocidas, y se puede determinar el área del pico distintivo de SRM/MRM para el patrón interno de fragmento peptídico y el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de las áreas de ambos picos

2. Esto se puede aplicar a fragmentos peptídicos sin modificar y fragmentos peptídicos modificados, en los que las modificaciones incluyen, pero sin limitación, fosforilación y/o glicosilación, y en los que los niveles absolutos de los péptidos modificados se pueden determinar de la misma manera que se determinan los niveles absolutos de los péptidos sin modificar.

3. Aplicación de la Cuantificación de Fragmentos Peptídicos al Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer

a. Llevar a cabo una cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína IRS1 y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, tal como se entiende

bien en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína IRS1 con el estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral del paciente

b. Llevar a cabo la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína IRS1 y demostrar la correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en el que esta correlación ya se ha demostrado en el campo o se puede demostrar en el futuro por medio de estudios de correlación con cohortes de pacientes y tejido de esos pacientes. Una vez que las correlaciones previamente establecidas o las correlaciones obtenidas en el futuro se confirman mediante este ensayo, se puede usar el método de ensayo para determinar la estrategia óptima de tratamiento

La información mostrada en la Tabla 2 es necesaria para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la cuantificación de la proteína IRS1 en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Se desarrollaron las características específicas y exclusivas sobre estos péptidos de IRS1 mediante el análisis de todos los péptidos de IRS1 en espectrómetros de masas de trampa de iones y de triple cuadrupolo. Esa información incluye la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los valores m/z de transición del precursor, y los tipos de ión de cada una de las transiciones identificadas. Esa información se debe determinar de manera experimental para todos y cada uno de los péptidos de SRM/MRM candidatos directamente en los lisados de Liquid Tissue™ de tejido fijado en formalina; debido a que, de manera interesante, no todos los péptidos de la proteína IRS se pueden detectar en tales lisados mediante el uso de SRM/MRM como se describe en la presente memoria, lo que indica que los péptidos de IRS1 no detectados no se pueden considerar péptidos candidatos para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para el uso en la cuantificación de péptidos/proteínas directamente en lisados de Liquid Tissue™ de tejido fijado en formalina.

Mediante la utilización de esta información, se pueden desarrollar ensayos de SRM/MRM cuantitativos para la proteína IRS1, y la determinación de los niveles de proteína IRS1 en los tejidos basada en el análisis del tejido obtenido del paciente fijado en formalina puede proporcionar información de diagnóstico, pronóstico, e información terapéuticamente relevante sobre cada paciente particular. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, esta descripción describe un método para medir el nivel de la proteína IRS1 en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de IRS1 modificados o sin modificar en una digestión de proteínas preparada a partir de dicha muestra biológica mediante el uso de espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína IRS1 modificada o sin modificar 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 fragmentos peptídicos de IRS1 comprende determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos peptídicos de IRS1 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que cada uno de los fragmentos peptídicos de IRS1 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, el patrón interno es un péptido patrón interno marcado de manera isotópica que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados de ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

El método para medir el nivel de la proteína IRS1 en una muestra biológica descrita en la presente memoria (o fragmentos peptídicos como sustitutos de la misma) se puede usar como indicador de diagnóstico del cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de las medidas del nivel de la proteína IRS1 se pueden emplear para determinar el diagnóstico del estadio/grado/estado de un cáncer correlacionando (p.ej., comparando) el nivel del receptor IRS1 hallado en un tejido con el nivel de esa proteína hallado en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

Listado de secuencias

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

<120> Ensayo de SRM/MRM de la proteína Sustrato 1 del Receptor de Insulina (IRS1)

<130> 01152.8013

<150> US 61/289,382

<151> 2009-12-22

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido de IRS

5 <400> 1

Glu Val Trp Gln Val Ile Leu Lys Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr Lys
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de IRS

15 <400> 2

Gly Leu Gly Gln Thr Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Cys Leu
 1 5 10 15

20 Thr Ser Lys

<210> 3
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido de IRS

30 <400> 3

Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys Ser Val Ser Ala Pro
 1 5 10 15

Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg

35 20

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido de IRS

<400> 4

Leu Cys Gly Ala Ala Gly Gly Leu Glu Asn Gly Leu Asn Tyr Ile Asp
 1 5 10 15

45 Leu Asp Leu Val Lys
 20

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido de IRS

<400> 5

Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg
1 5 10 15

Arg

5

<210> 6

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Péptido de IRS

<400> 6

15

Leu Trp Thr Asn Gly Val Gly Gly His His Ser His Val Leu Pro His
1 5 10 15

Pro Lys

<210> 7

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de IRS

25

<400> 7

Asn Lys His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg
1 5 10

30

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Péptido de IRS

<400> 8

Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg
1 5 10 15

40

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

45

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de IRS

50

<400> 9

Arg Ser Ile Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys
1 5 10

55

<210> 10

<211> 15

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Péptido de IRS

 <400> 10

 Arg Thr His Ser Ala Gly Thr Ser Pro Thr Ile Thr His Gln Lys
 1 5 10 15
 10
 <210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 11
 20
 Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro Leu Arg
 1 5 10 15

 Arg His His Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg
 20 25 30

 <210> 12
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 30
 <400> 12

 Ser Val Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg
 1 5 10
 35
 <210> 13
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 13

 Thr Ile Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu
 1 5 10 15

 Gln Leu Met Asn Ile Arg
 20
 45
 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 55
 <400> 14

Val Asp Thr Ala Ala Gln Thr Asn Ser Arg Leu Ala Arg
1 5 10

5 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Péptido de IRS

<400> 15

Val Ile Arg Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg Arg
1 5 10

15 <210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 16

25 Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu Asn
1 5 10 15

Glu Lys

30 <210> 17
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido de IRS

<400> 17

Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val Glu Met Gly Arg
1 5 10

40 <210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 18

Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val Glu Met Gly Arg Leu Gly Pro
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ile Cys Arg
20 25

50 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

5 <400> 19

Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg
1 5

<210> 20
10 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Péptido de IRS

<400> 20

Ala Met Ser Asp Glu Phe Arg Pro Arg Ser Lys
1 5 10

20 <210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 21

30 Ala Arg Glu Gln Gln Gln Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu
1 5 10 15

Pro Lys

<210> 22
35 <211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <223> Péptido de IRS

<400> 22

Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp
1 5 10 15

Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg
20 25

45 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 23

Cys Pro Ser Gln Leu Gln Pro Ala Pro Arg
1 5 10

55

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS

 10 <400> 24

 Glu Glu Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys
 1 5 10

 <210> 25
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Péptido de IRS

 <400> 25

 Cys Thr Pro Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser Pro Ala Leu Ala Gly Asp
 1 5 10 15

 Glu Ala Ala Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn Arg
 20 25
 25
 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 26
 35
 Met Asp Leu Gly Pro Gly Arg Arg
 1 5

 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 45
 <400> 27

 Phe Phe Val Leu Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg
 1 5 10 15
 50
 <210> 28
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 28

Gly Gly Asn Gly His Arg Cys Thr Pro Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser

1 5 10 15

Pro Ala Leu Ala Gly Asp Glu Ala Ala Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn
20 25 30

Arg

5 <210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 29

His His Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg
1 5 10 15

15 <210> 30
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 30

25 His Ser Ala Phe Val Pro Thr Arg Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu
1 5 10 15

Met His Pro Leu Glu Arg
20

30 <210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 31

Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys
1 5 10

40 <210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 32

50 Val Asp Thr Ala Ala Gln Thr Asn Ser Arg
1 5 10

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS

 10 <400> 33

 Lys Val Gly Tyr Leu Arg Lys
 1 5

 <210> 34
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Péptido de IRS

 <400> 34

 Leu Ala Arg Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys
 1 5 10
 25
 <210> 35
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 35
 35
 Leu His Pro Pro Leu Asn His Ser Arg Ser Ile Pro Met Pro Ala Ser
 1 5 10 15

 Arg Cys Ser Pro Ser Ala Thr Ser Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Ser
 20 25 30

 Thr Ser Gly His Gly Ser Thr Ser Asp Cys Leu Phe Pro Arg
 35 40 45

 <210> 36
 <211> 27
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 45
 <400> 36

 Leu Leu Tyr Ala Ala Thr Ala Asp Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 1 5 10 15

 Asp Ser Leu Gly Gly Gly Tyr Cys Gly Ala Arg
 20 25
 50 <210> 37
 <211> 13

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Péptido de IRS

 <400> 37

 Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg
 1 5 10
 10
 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 38
 20
 Leu Ser Thr Ser Ser Gly Arg
 1 5

 <210> 39
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 30
 <400> 39

 Pro Ala Ser Val Asp Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg Thr
 1 5 10 15

 His Ala His Arg
 20
 35
 <210> 40
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 40

 Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser
 1 5 10 15

 Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser Gly Arg
 20 25
 45
 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 55
 <400> 41

Pro Gly Glu Leu Gly Gly Ala Pro Lys
1 5

5 <210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Péptido de IRS

<400> 42

Pro Arg Ser Lys Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser
1 5 10 15

Val Pro Leu Arg
20

15 <210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 43

25 Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg
1 5 10 15

<210> 44
<211> 18
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

35 <400> 44

Gln Ser Tyr Val Asp Thr Ser Pro Ala Ala Pro Val Ser Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Met Arg

40 <210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 45

50 Arg His His Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg
1 5 10 15

<210> 46
<211> 14
55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de IRS

5 <400> 46

His Ser Ser Glu Thr Phe Ser Ser Thr Pro Ser Ala Thr Arg
1 5 10

10 <210> 47
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 47

Arg Ser Arg Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val
1 5 10 15

20 Gly Gly Lys

<210> 48
<211> 16
<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

30 <400> 48

Arg Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys
1 5 10 15

<210> 49
<211> 12
<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

40 <400> 49

Ser Ile Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys
1 5 10

45 <210> 50
<211> 18
<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

<400> 50

55 Ser Lys Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 51
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS

 10 <400> 51

 Ser Arg Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly
 1 5 10 15

 Gly Lys

 15 <210> 52
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Péptido de IRS

 <400> 52

 Ser Ser Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ile Ser
 1 5 10 15
 Ser Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Asp Phe Arg
 20 25
 25

 <210> 53
 <211> 20
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS

 35 <400> 53

 Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys Gln
 1 5 10 15

 Pro Glu Asp Arg
 20

 40 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> Péptido de IRS

 <400> 54

 Ser Ser Phe Arg Ser Val Thr Pro Asp Ser Leu Gly His Thr Pro Pro
 1 5 10 15

 Ala
 50
 <210> 55
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Péptido de IRS

 <400> 55

 Gly Glu Glu Glu Leu Ser Asn Tyr Ile Cys Met Gly Gly Lys
 1 5 10
 10
 <210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 56
 20
 Ser Val Thr Pro Asp Ser Leu Gly His Thr Pro Pro Ala Arg
 1 5 10

 <210> 57
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS
 30
 <400> 57

 Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu Met His Pro Leu Glu Arg
 1 5 10
 35
 <210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 58

 Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly Gly Lys
 45 1 5 10 15

 <210> 59
 <211> 27
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido de IRS

 <400> 59

 Val Gly Asn Thr Val Pro Phe Gly Ala Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Val Lys
 20 25

<210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de IRS
 <400> 60
 10
 Val Asn Leu Ser Pro Asn Arg Asn Gln Ser Ala Lys
 1 5 10
 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de IRS
 20
 <400> 61
 Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys
 1 5 10
 25
 <210> 62
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido de IRS
 <400> 62
 Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp
 1 5 10 15
 35
 Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg
 20 25
 <210> 63
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido de IRS
 45
 <400> 63
 Ser Val Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg
 1 5 10
 50
 <210> 64
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido de IRS
 <400> 64

Leu Cys Leu Thr Ser Lys Thr Ile Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu
1 5 10 15

Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg
20 25

<210> 65

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de IRS

10

<400> 65

Leu Glu Pro Ser Leu Pro His Pro His His Gln Val Leu Gln Pro His
1 5 10 15

Leu Pro Arg

15 <210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Péptido de IRS

<400> 66

Leu Pro Gly His Arg His Ser Ala Phe Val Pro Thr Arg
25 1 5 10

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido de IRS

35 <400> 67

Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys
1 5 10 15

<210> 68

40 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Péptido de IRS

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

50 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 68

Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser
1 5 10 15

Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser Gly Arg
20 25

5 <210> 69
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido de IRS

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 69

Ser Pro Gly Glu Tyr Val Asn Ile Glu Phe Gly Ser Asp Gln Ser Gly
1 5 10 15

Tyr Leu Ser Gly Pro Val Ala Phe His Ser Ser Pro Ser Val Arg
20 25 30

20 <210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Péptido de IRS

30 <400> 70

Glu Gln Gln Gln Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu Pro Lys
1 5 10 15

35 <210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 71

His Ser Ser Ala Ser Phe Glu Asn Val Trp Leu Arg Pro Gly Glu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Ala Pro Lys
20

45 <210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 72

Leu Glu Tyr Tyr Glu Asn Glu Lys
1 5

5 <210> 73
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido de IRS

<400> 73

Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg
15 1 5 10 15

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

25 <400> 74

Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys
1 5

<210> 75
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido de IRS

<400> 75

Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg
40 1 5

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

<400> 76

50 Thr Gly Ile Ala Ala Glu Glu Val Ser Leu Pro Arg
1 5 10

<210> 77
<211> 8
55 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido de IRS

60 <400> 77

His	Leu	Val	Ala	Leu	Tyr	Thr	Arg
1				5			

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el nivel de la proteína sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de IRS1 en una digestión de proteínas preparada a partir de dicha muestra biológica humana mediante el uso de espectrometría de masas; y calcular el nivel de la proteína IRS en dicha muestra;
- 5 en el que el fragmento peptídico de IRS1 es SEQ ID N°: 70 o SEQ ID N°: 76, y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicha digestión de proteínas antes de detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1.
- 10 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha digestión de proteínas comprende una digestión con proteasa.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tejido es tejido incrustado en parafina.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tejido se obtiene de un tumor.
- 15 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además cuantificar dicho fragmento peptídico de IRS1.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la cuantificación de dicho fragmento peptídico de IRS1 comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica diferente y separada.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, en el que la cuantificación de dicho fragmento peptídico comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido en una cantidad conocida, en el que dicho fragmento peptídico de IRS1 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos; y en el que el péptido patrón interno es un péptido marcado de manera isotópica.
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección y/o la cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1 en la digestión de proteínas indica la presencia de la proteína IRS modificada o sin modificar, y una asociación con el cáncer en el sujeto.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1, o el nivel de dicha proteína IRS con el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer.
- 30 11. El método de la reivindicación 10, en el que la correlación de los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de IRS1, o el nivel de dicha proteína IRS con el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato multiplexado para proporcionar información adicional sobre el diagnóstico del estadio/grado/estado del cáncer.