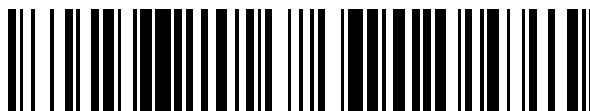


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 651**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/US2012/058782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13052686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12838643 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2764359**

54 Título: **Ensayo de SRM/MRM para determinar la proteína ERBB-4 del receptor de tirosina-proteína quinasa (HER4)**

30 Prioridad:

**04.10.2011 US 201161543092 P**

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

**31.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 670 651 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 para determinar la proteína ERBB-4 del receptor de tirosina-proteína quinasa (HER4)

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de la proteína erbB-4 del receptor de tirosina-proteína quinasa (HER4) en una muestra biológica.

**Introducción**

10 Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína erbB-4 del receptor de tirosina-proteína quinasa (denominada en la presente ERBB4, y que también se conoce como HER4). La secuencia del péptido y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en un análisis de control de una reacción seleccionada ("Selected Reaction Monitoring", SRM) basada en la espectrometría de masas, que también puede denominarse como ensayo de control de reacciones múltiples ("Multiple Reaction Monitoring", MRM). Estos ensayos se denominan en la presente SRM/MRM. Se describe el uso de los péptidos para el análisis de SRM/MRM cuantitativo de la proteína HER4.

15 Este ensayo de SRM/MRM puede emplearse para medir los niveles cuantitativos relativos o absolutos de uno o más péptidos específicos procedentes de la proteína HER4. Esto proporciona un medio para medir la cantidad de la proteína HER4 en una preparación de proteínas concreta obtenida de una muestra de proteínas mediante espectrometría de masas.

20 De modo más específico, el ensayo de SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisados de proteínas preparadas a partir de células obtenidas de muestras de tejido de pacientes, tales como el tejido de un paciente con cáncer fijado en formol. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de un tejido fijado con formol se describen en la patente de EE. UU. n.º 7.473.532. Los métodos descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.473.532 puede llevarse a cabo de modo conveniente empleando los reactivos Liquid Tissue® y el protocolo disponibles en OncoPlex DX (antes Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

25 La forma más amplia y ventajosamente disponible de tejidos procedentes de pacientes con cáncer es un tejido introducido en parafina y fijado con formol. La fijación con formaldehído/formol de tejido retirado de modo quirúrgico es el método más común de conservar muestras de tejidos de cáncer en todo el mundo y constituye la convención aceptada para la práctica patológica convencional. Las disoluciones acuosas de formaldehído se denominan formol. Formol al "100%" consiste en una disolución saturada de formaldehído (que esta aproximadamente al 40% en volumen o al 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizante, de modo habitual metanol para 30 limitar la oxidación y el grado de polimerización. La manera más habitual en que se conserva un tejido es sumergir el tejido entero durante periodos largos de tiempo (de 8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, que habitualmente se denomina formol tamponado neutro al 10%, seguido de la introducción del tejido entero fijado en cera de parafina para la conservación a largo plazo a temperatura ambiente. Por tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar tejido de cáncer fijado en formol son los métodos más aceptados y utilizados para el análisis de tejidos de 35 pacientes con cáncer.

40 Los resultados del ensayo de SRM/MRM pueden emplearse para correlacionar niveles cuantitativos precisos de la proteína HER4 contenida en muestras de tejido específicas (por ejemplo, una o más muestras de tejido de cáncer) del paciente o sujeto del cual se tomó y se conservó el tejido (muestra biológica). Esto no solo proporciona información de diagnóstico acerca del cáncer, sino que también permite que un médico u otro profesional sanitario determinen la terapia apropiada para el paciente. Por ejemplo, este ensayo puede diseñarse para que diagnostique el estadio o el grado de un cáncer y para determinar cuál será el agente terapéutico al que el paciente responda con la máxima probabilidad. Este ensayo que proporciona información importante desde el punto de vista del diagnóstico y terapéutico acerca de los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra de un paciente se denomina un ensayo de diagnóstico de acompañamiento.

45 Kaushansky A., *et al.* (Kaushansky A., *et al.*, Chemistry & Biology, 15, 808-817, 25 de agosto, 2008) indican que ErbB4 contiene 19 sitios para la fosforilación de Tyr que son excepcionalmente selectivos en sus propiedades de reclutamiento.

50 El documento WO 2007/146959 A2 se refiere a productos terapéuticos específicos de receptores de la superficie pancelulares, que incluyen productos terapéuticos específicos para pan-HER que interaccionan con al menos dos ligandos del receptor de HER diferentes y/o dimerizan con dos o más receptores de la superficie celular de HER.

Condina M. R., *et al.* (Condina M. R., *et al.*, Proteomics, 2010, 10, 2516-2530) describen un MALDI-TOF/TOF MS acoplado a EZYprep LC como una aplicación en aerosol de matriz mejorada para la caracterización de fosfopéptidos.

55 El documento US 2009/0088553 A1 se refiere a macrociclos de peptidomiméticos y a métodos para su preparación y uso, así como a análogos de aminoácidos y conectores formadores de macrociclos.

El documento WO 2011/031982 A1 se refiere a marcadores moleculares para la respuesta a la terapia del cáncer y a métodos para su utilización.

5 El documento WO 2007/027867 A2 se refiere a sitios de fosforilación identificados en proteínas y vías de transducción de señales que subyacen al carcinoma humano, y a anticuerpos específicos del sitio de fosforilación y péptidos marcados con isótopos pesados para la detección selectiva y la cuantificación de estos sitios y proteínas fosforilados, respectivamente, así como a métodos para emplear los reactivos para dicho fin.

Taylor P., *et al.* (Taylor P., *et al.*, European Journal of Cancer, suplemento, vol. 7, n.º 4, 1 de octubre de 2009, p. 31) describen la detección y la cuantificación de la fosforilación del receptor de EGF en secciones de tumores fijados con formol mediante espectrometría de masas de control de reacciones múltiples/seleccionadas.

10 **Sumario**

El problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante los aspectos de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas pueden extraerse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

15 De modo más específico, el problema que subyace a la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la proteína HER4 en una muestra biológica de un tejido fijado con formol, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de HER4 en un digerido de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica empleando espectrometría de masas, en el que el fragmento peptídico de HER4 es el péptido de SEQ ID NO:4; y calcular el nivel de la proteína HER4 en dicha muestra; y en el que dicha cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.

20 En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho digerido de proteínas antes de detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, en el que dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida en fase nanoinvertida, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

En una realización, dicho digerido de proteínas comprende un digerido con proteasas.

En una realización, dicho digerido de proteínas comprende un digerido con tripsina.

25 En una realización, el tejido fijado con formol es un tejido introducido en parafina.

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

En una realización, la cuantificación del fragmento peptídico de HER4 comprende comparar una cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica individual con la cantidad del mismo fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica diferente y separada.

30 En una realización, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de HER4 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido en cantidad conocida, en la que dicho péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.

35 En una realización, la detección y la cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en el digerido de proteínas indica la presencia de una proteína HER4 modificada o no modificada y una asociación con un cáncer en el sujeto.

En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de dicha proteína HER4 con un estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

40 En una realización, la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de dicha proteína HER4 con un estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer, se combina con la detección y/o la cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos procedentes de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar más información acerca del estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

45 En una realización, el método comprende además seleccionar para el sujeto del cual se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento basándose en la presencia, la ausencia o la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de proteína HER4.

En una realización, el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células de cáncer que expresan la proteína HER4.

50 Los ensayos descritos en la presente miden niveles relativos o absolutos de péptidos específicos no modificados procedentes de la proteína HER4 y también pueden medir los niveles relativos o absolutos de péptidos específicos modificados procedentes de la proteína HER4. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos aminoácidos

fosforilados (por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina) y restos aminoácidos glicosilados (por ejemplo, restos asparagina glicosilados) que están presentes en los péptidos.

5 Los niveles cuantitativos relativos de la proteína HER4 se determinan mediante la metodología de SRM/MRM, por ejemplo, comparando las áreas del pico de firma de SRM/MRM (por ejemplo, el área del pico de firma o la intensidad de ion fragmentado integrado) de un péptido de HER4 individual en diferentes muestras. Como alternativa, es posible comparar múltiples áreas del pico de firma de SRM/MRM para múltiples péptidos de firma de HER4, en el que cada péptido tiene su propio pico de firma de SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo en proteína HER4 en una muestra biológica con respecto al contenido en proteína HER4 de una o más muestras biológicas diferentes o adicionales. De este modo, la cantidad de un péptido o péptidos concretos, procedentes de la proteína HER4, y por tanto la cantidad de la proteína HER4, se determina con relación al mismo péptido o péptidos de HER4, a través de dos o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, puede determinarse la cuantificación relativa para un péptido o péptidos concretos a partir de la proteína HER4 dentro de una sola muestra comparando el área del pico de firma para ese péptido mediante la metodología de SRM/MRM con el área de pico de firma de otro péptido o péptidos diferentes, de una proteína o proteínas diferentes, dentro de la misma preparación de proteínas procedente de la muestra biológica. De este modo, la cantidad de un péptido concreto procedente de la proteína HER4, y por tanto la cantidad de la proteína HER4, se determina con relación a los otros dentro de la misma muestra. Estas estrategias generan la cuantificación de un péptido o péptidos individuales a partir de la proteína HER4 con respecto a la cantidad de otro péptido o péptidos entre muestras y dentro de muestras, en la que las cantidades, determinadas por el área del pico, son relativas entre sí, independientemente de las cantidades absolutas de peso a volumen o de peso a peso del péptido de HER4 en la preparación de proteínas procedente de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos acerca de las áreas del pico de firma individuales entre diferentes muestras se normalizan a la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa puede realizarse a través de muchos péptidos procedentes de múltiples proteínas y la proteína HER4 simultáneamente en una única muestra y/o a través de muchas muestras para obtener información con respecto a las cantidades relativas de proteínas, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

10 Los niveles cuantitativos absolutos de la proteína HER4 se determinan, por ejemplo, mediante la metodología de SRM/MRM, en la que el área del pico de firma de un péptido individual procedente de la proteína HER4 en una muestra biológica se compara con el área del pico de firma de SRM/MRM de un patrón interno "sembrado" añadido de modo exógeno. En una realización, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido HER4 exacto que contiene uno o más restos aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Los patrones internos marcados con isótopos adecuados se sintetizan de modo que, cuando se analizan mediante espectrometría de masas, cada patrón genera un pico de firma de SRM/MRM constante y predecible que es diferente y diferenciable del pico de firma del péptido de HER4 nativo y que puede emplearse como pico comparador. Así, cuando el patrón interno se siembra en una cantidad conocida en una preparación de proteínas procedente de una muestra biológica y se analiza mediante espectrometría de masas, el área del pico de firma de SRM/MRM del péptido nativo de la muestra puede compararse con el área del pico de firma de SRM/MRM del péptido patrón interno. Esta comparación numérica proporciona la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de proteínas original procedente de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para los fragmentos peptídicos se muestran según la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta puede realizarse a través de muchos péptidos y, por tanto, proteínas, de modo simultáneo en una única muestra y/o a través de muchas muestras para obtener información con respecto a las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

15 El método de ensayo de SRM/MRM puede emplearse para ayudar en el diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido obtenido del paciente, tal como tejido fijado con formol, y para ayudar a determinar el agente terapéutico que sería más ventajoso para su uso en el tratamiento de ese paciente. El tejido de cáncer que se retira de un paciente mediante cirugía, tal como la retirada terapéutica de tumores parciales o enteros, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o la ausencia de la enfermedad sospechada, se analiza para determinar si está o no presente una proteína o proteínas específicas y qué forma de las proteínas está presente en este tejido del paciente. Además, el nivel de expresión de la proteína, o de múltiples proteínas, puede determinarse y compararse con un nivel de referencia o "normal" que se encuentra en un tejido sano. Los niveles de proteínas normales o de referencia que se encuentran en el tejido sano pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de los tejidos pertinentes de uno o más individuos que no padecen cáncer. Como alternativa, los niveles normales o de referencia pueden obtenerse a partir de individuos con cáncer mediante el análisis de tejidos permitentes que no están afectados por el cáncer.

20 El ensayo de los niveles de proteínas (por ejemplo, los niveles de HER4) también puede utilizarse para diagnosticar el estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de HER4. Los niveles o las cantidades de proteínas o péptidos pueden definirse como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o un péptido determinada mediante el ensayo de SRM/MRM. El nivel o la cantidad pueden normalizarse para ascender al nivel o cantidad de una proteína u otro componente en el lisado analizado (por ejemplo, expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramo de proteína). Además, el nivel o la cantidad de una proteína o un péptido puede determinarse en base al volumen, expresándose, por ejemplo, en unidades micromolares o nanogramos/microlitro. El nivel o la cantidad de una proteína o un péptido,

determinado mediante el ensayo de SRM/MRM, también puede normalizarse al número de células analizadas. Por tanto, la información acerca de HER4 puede usarse para ayudar a determinar el estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína HER4 (o fragmentos peptídicos de la proteína HER4) con los niveles observados en tejidos normales. Tras haber determinado el estadio y/o el grado y/o las características de expresión de la proteína HER4 del cáncer, esta información puede correlacionarse con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente un tejido de cáncer que se caracteriza, por ejemplo, por una expresión anómala de la proteína o proteínas (por ejemplo, HER4) que se han ensayado. La correlación de la información procedente de un ensayo de la proteína HER4 con una lista de agentes terapéuticos que se dirigen específicamente, por ejemplo, a la proteína HER4 o a células/tejidos que expresan la proteína, define lo que se ha denominado una estrategia de medicina personalizada para tratar una enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en la presente constituyen los cimientos de una estrategia de medicina personalizada mediante el uso del análisis de las proteínas procedentes del tejido del propio paciente como fuente para tomar decisiones de diagnóstico y tratamiento.

### Descripción detallada

En principio, puede emplearse cualquier péptido predicho derivado de la proteína HER4, preparado, por ejemplo, mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina), como indicador sustituto para determinar la abundancia de la proteína HER4 en una muestra empleando un ensayo de SRM/MRM basado en la espectrometría de masas. De modo similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contenga un resto aminoácido en un sitio que se sabe que está potencialmente modificado en la proteína HER4 también puede emplearse para ensayar el grado de modificación de la proteína HER4 en una muestra.

Los fragmentos peptídicos de HER4 pueden generarse mediante una diversidad de formas, que incluyen la utilización del protocolo de Liquid Tissue™ descrito, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 7.473.532. El protocolo y los reactivos de Liquid Tissue™ producen muestras de péptidos adecuadas para el análisis espectroscópico de masas de tejido introducido en parafina y fijado con formol mediante la digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/biológica. También están disponibles en el mercado reactivos y protocolos adecuados en OncoPlexDx (antes Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

En el protocolo de Liquid Tissue™, la muestra de tejido/biológica se calienta en un tampón durante un periodo largo de tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas) para revertir o liberar el entrecruzamiento de las proteínas. El tampón empleado es un tampón neutro (por ejemplo, un tampón basado en Tris, o un tampón que contenga un detergente). Después del tratamiento con calor, la muestra de tejido/biológica se trata con una o más proteasas que incluyen, pero no se limitan a tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para alterar la estructura del tejido y celular de dicha muestra biológica y para licuar la muestra. Los ejemplos de condiciones para el tratamiento con proteasa son de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas a una temperatura de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 65 °C). De forma ventajosa, se emplean endoproteasas y, en particular, combinaciones de dos o tres endoproteasas, de modo simultáneo o secuencial, para licuar la muestra. Por ejemplo, las combinaciones adecuadas de proteasas pueden incluir, pero no se limitan a combinaciones de tripsina, endoproteinasa Lys-C y quimotripsina, tales como tripsina y endoproteinasa Lys-C. El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado de biomoléculas diluible, soluble y líquido. De forma ventajosa, este lisado líquido está exento de sólidos o de materia en partículas que pueda ser separada del lisado mediante centrifugación.

De modo sorprendente, se ha descubierto que muchas secuencias peptídicas potenciales procedentes de la proteína HER4 no resultan adecuadas o no son eficaces para su uso en los ensayos de SRM/MRM basados en la espectrometría de masas por razones que no inmediatamente evidentes. Puesto que no es posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo de MRM/SRM, resulta necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en los lisados reales de Liquid Tissue® para desarrollar un ensayo de SRM/MRM fiable y preciso para la proteína HER4. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que, por ejemplo, algunos péptidos pueden ser difíciles de detectar mediante espectrometría de masas porque no se ionizan bien o producen fragmentos que no se diferencian de los generados a partir de otras proteínas. También puede suceder que los péptidos no se resuelvan bien en la separación (por ejemplo, cromatografía líquida) o pueden adherirse al equipo de vidrio o plástico, lo cual conduce a unos resultados erróneos en el ensayo de SRM/MRM.

Los péptidos de HER4 que se pueden encontrar en esta descripción (por ejemplo, las siguientes tablas 1 y 2) proceden de la proteína HER4 mediante una digestión con proteasas de todas las proteínas dentro de un lisado complejo de Liquid Tissue® preparado a partir de células procedentes de tejido de cáncer fijado con formol. A menos que se indique lo contrario, en cada caso, la proteasa es tripsina. El lisado de Liquid Tissue™ después se analiza mediante espectrometría de masas para determinar los péptidos derivados de la proteína HER4 que son detectados y analizados mediante espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto específico preferido de péptidos para el análisis espectrométrico de masas se basa en: 1) la determinación experimental de cuál es el péptido o péptidos procedentes de una proteína que se ioniza en un análisis de espectrometría de masas de lisados de Liquid Tissue™, y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y las condiciones experimentales empleadas para preparar el lisados de Liquid Tissue™. Esta última propiedad se extiende no solo a la secuencia de

aminoácidos del péptido, sino también de la capacidad de un resto modificado dentro de un péptido para sobrevivir en una forma modificada durante la preparación de la muestra.

Se prepararon lisados de proteínas procedentes de células obtenidos directamente de tejido fijado con formol (formaldehído) empleando los reactivos y el protocolo de Liquid Tissue™. Esto supone recolectar células en un tubo para muestras mediante microdissección de tejidos, seguido de un calentamiento de las células en tampón de Liquid Tissue™ durante un periodo largo de tiempo. Tras haber afectado de modo negativo al entrecruzamiento inducido por el formol, el tejido/células después se digieren totalmente de una manera predecible empleando una proteasa, tal como tripsina. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden emplearse otras proteasas y, en particular, endoproteasas en lugar o además de la tripsina. Cada lisado de proteínas se emplea para preparar una colección de péptidos mediante la digestión de los polipéptidos intactos con la proteasa o la combinación de proteasas. Cada lisado de Liquid Tissue™ se analiza (por ejemplo, mediante espectrometría de masas de atrapamiento de iones) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos, en los que los datos se presentan como la identificación de tantos péptidos como sea posible, según pueden identificarse mediante una espectrometría de masas, de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteínas. Puede emplearse un espectrómetro de masas de atrapamiento de iones u otra forma de espectrómetro de masas que sea capaz de realizar el perfil global para la identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un único lisado de péptidos/proteínas complejo. Sin embargo, los espectrómetros de masas de atrapamiento de iones pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para realizar el perfil global de los péptidos. Aunque el ensayo de SRM/MRM puede desarrollarse y realizarse con cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, atrapamiento de iones, o cuadrupolo triple, a menudo se considera que una plataforma instrumental ventajosa para el ensayo de SRM/MRM es una plataforma instrumental de cuadrupolo triple.

Tras haber identificado tantos péptidos como sea posible en un único análisis espectrométrico de masas de un único lisado bajo las condiciones empleadas, entonces esa lista de péptidos se coteja y se emplea para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Este proceso se repite para múltiples lisados de Liquid Tissue™, y la larguísima lista de péptidos se coteja con un único conjunto de datos. El conjunto de datos resultante representa los péptidos que pueden detectarse en el tipo de muestra biológica que se ha analizado (después de la digestión con proteasas), y específicamente en un lisado de Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y así incluye los péptidos para proteínas específicas, tales como, por ejemplo, la proteína HER4. Los péptidos trípticos de HER4 identificados como útiles para la determinación de las cantidades absolutas o relativas del receptor de HER4 incluyen uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, y SEQ ID NO:10, cuyas secuencias se muestran en la tabla 1. Cada uno de estos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados de Liquid Tissue™ preparados a partir de un tejido introducido en parafina y fijado con formol. Así, cada uno de los péptidos en la tabla 1, o cualquier combinación de estos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos indicados en la tabla 1, y en particular las combinaciones con los péptidos que aparecen en la tabla 2) es candidato a su utilización en un ensayo de SRM/MRM cuantitativo para la proteína HER4 en muestras biológicas humanas, incluyendo directamente en tejido de un paciente fijado con formol. La tabla 2 muestra más información acerca de tres de los péptidos mostrados en la tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia peptídica
SEQ ID NO:1	YSADPTVFAPER
SEQ ID NO:2	DGGFAAEQGVSPYR
SEQ ID NO:3	LSSLSDLEQQYR
SEQ ID NO:4	YLVIQGDDR
SEQ ID NO:5	GIWVPEGETVK
SEQ ID NO:6	YLPLENLR
SEQ ID NO:7	ELAAEFSR
SEQ ID NO:8	QEYLNPEENPFVSR
SEQ ID NO:9	DGNFGLQELGLK
SEQ ID NO:10	STLQHPDYLQEYSTK

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa monoisotópica	Estado de carga del precursor	m/z del precursor	m/z de transición	Tipo de ion
SEQ ID NO:1	YSADPTVFAPER	1351,641	2	676,828	619,319	y5
			2	676,828	718,388	y6
			2	676,828	819,435	y7
			2	676,828	916,488	y8
			2	676,828	1031,515	y9
			2	676,828	1102,552	y10
SEQ ID NO:2	DGGFAAEQGVSPYR	1551,732	2	776,873	534,303	y4
			2	776,873	621,335	y5
			2	776,873	720,403	y6
			2	776,873	777,425	y7
			2	776,873	905,483	y8
			2	776,873	1034,526	y9
			2	776,873	1105,563	y10
			2	776,873	1176,6	y11
			2	776,873	1323,669	y12
			2	776,873	1380,69	y13
SEQ ID NO:3	LSSLSDLEQQYR	1437,71	2	719,862	594,299	y4
			2	719,862	723,342	y5
			2	719,862	836,426	y6
			2	719,862	951,453	y7
			2	719,862	1038,484	y8
			2	719,862	1151,569	y9
			2	719,862	1238,601	y10

Los péptidos trípticos de HER4 listados en la tabla 1 incluyen los detectados en múltiples lisados de Liquid Tissue™ de múltiples tejidos fijados con formol diferentes de diferentes órganos humanos, que incluyen próstata, colon y mama. Cada uno de estos péptidos es útil para el ensayo de SRM/MRM cuantitativo de la proteína HER4 en tejido fijado con formol. Otros análisis de los datos de estos experimentos indican que no se observa preferencia por ningún péptido específico de ningún sitio de órgano. Así, cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos de SRM/MRM de la proteína HER4 en un lisado de Liquid Tissue™ obtenido de cualquier tejido fijado con formol procedente de cualquier muestra biológica o de cualquier sitio de órgano en el cuerpo. Los péptidos en la tabla 1, o cualquier combinación de estos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos indicados en la tabla 1, y en particular las combinaciones con los péptidos que aparecen en la tabla 2) se ensayan mediante métodos que no se basan en la espectroscopía de masas que incluyen, pero no se limitan a métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información sobre la cantidad del péptido o péptidos (absoluta o relativa), la información puede emplearse en cualquiera de los métodos descritos en la presente, que incluyen indicar (diagnosticar) la presencia de un cáncer en un sujeto, determinar el estadio/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico, o determinar el producto terapéutico o el régimen 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, siete o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos de la tabla 1. Las composiciones pueden comprender los péptidos de la tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden incluir uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más péptidos que están isotópicamente marcados. Cada uno de los péptidos puede estar marcado con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en:  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o sus combinaciones. No es necesario que las composiciones que comprenden péptidos procedentes de la proteína HER4, marcados isotópicamente o no, contengan todos los péptidos procedentes de esa proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). Es posible que las composiciones contengan uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más péptidos de HER4 y, en particular, los péptidos que aparecen en la tabla 1 o la tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales secados o liofilizados, líquidos (por ejemplo, acuosos), disoluciones o suspensiones, matrices o transferencias.

Una consideración para realizar un ensayo de SRM/MRM es el tipo de instrumento que puede emplearse en el análisis de los péptidos. Aunque los ensayos de SRM/MRM pueden desarrollarse y realizarse con cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, atrapamiento de iones, o cuadrupolo triple, a menudo se considera que la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo de SRM/MRM es una plataforma instrumental de cuadrupolo triple. Este tipo de espectrómetro de masas puede considerarse el instrumento más adecuado para analizar un único péptido diana aislado dentro de un lisado de proteínas muy complejo que puede consistir en cientos de miles a millones de péptidos individuales procedentes de todas las proteínas contenidas dentro de una célula.

Para aplicar el ensayo de SRM/MRM de la forma más eficaz para cada péptido procedente de la proteína HER4, resulta deseable utilizar más información además de la secuencia peptídica en el análisis. Esta información adicional puede emplearse para dirigir y ordenar al espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple) para que lleve a cabo el análisis correcto y enfocado del péptido o péptidos buscados específicos de modo que el ensayo pueda realizarse de modo eficaz.

La información adicional acerca de los péptidos diana en general, y de los péptidos HER4 específicos, puede incluir uno o más de la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga de su precursor, el valor de m/z del precursor, el m/z de los iones de transición, y el tipo de ion de cada ion de transición. Otra información del péptido que puede utilizarse para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la proteína Her4 se muestra como ejemplo para tres (3) de los péptidos Her4 de la lista de la tabla 1, y se muestra en la tabla 2. Una información adicional descrita para esos tres (3) péptidos de Her4 mostrados como ejemplo en la tabla 2 puede prepararse, obtenerse y aplicarse al análisis de otros péptidos contenidos en la tabla 1.

El método descrito a continuación se emplea para: 1) identificar péptidos candidatos procedentes de la proteína HER4 que pueden utilizarse para un ensayo de SRM/MRM basado en una espectrometría de masas para la proteína HER4, 2) desarrollar un ensayo o ensayos de SRM/MRM individuales para dirigirse a péptidos procedentes de la proteína HER4, y 3) aplicar ensayos cuantitativos para el diagnóstico del cáncer y/o elegir una terapia óptima.

### Método de ensayo

#### 1. Identificación de fragmentos peptídicos candidatos para SRM/MRM de la proteína HER4

a. Se prepara un lisado de proteínas de Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formol empleando una proteasa o proteasas (que pueden o no incluir tripsina) para digerir las proteínas.

b. Se analizan todos los fragmentos de la proteína en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de atrapamiento de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos procedentes de la proteína HER4, en los que los fragmentos peptídicos individuales no contienen ninguna modificación del péptido, tal como fosforilaciones o glicosilaciones.

c. Se analizan todos los fragmentos de la proteína en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de atrapamiento de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos procedentes de la proteína HER4 que portan modificaciones en el péptido, tales como, por ejemplo, restos fosforilados o glicosilados.

d. Pueden medirse potencialmente todos los péptidos generados mediante un método de digestión específico a partir de la proteína HER4 entera de longitud completa, pero los péptidos preferidos para el desarrollo del ensayo de SRM/MRM son los que se identifican mediante espectrometría de masas directamente en un lisado de proteínas complejo de Liquid Tissue® preparado a partir de una muestra biológica fijada en formol.

e. Los péptidos que están específicamente modificados (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™ procedentes de una muestra biológica fijada con formol se identifican como péptidos candidatos para ensayar las modificaciones de péptidos de la proteína HER4



2. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos procedentes de la proteína HER4

a. Se aplica un ensayo de SRM/MRM en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple para fragmentos peptídicos individuales identificados en un lisado de Liquid Tissue™ a los péptidos procedentes de la proteína HER4.

5 i. Se determina el tiempo de retención para un fragmento peptídico para las condiciones óptimas de la cromatografía que incluye, pero no se limita a la electroforesis en gel, la cromatografía líquida, la electroforesis capilar, la cromatografía líquida en fase nanoinversa, la cromatografía líquida de alta resolución, o la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

10 ii. Se determina la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor para cada péptido, el valor de m/z del precursor para cada péptido, el m/z de los iones de transición para cada péptido, y el tipo de ion de cada ion de transición para cada fragmento peptídico para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para cada péptido.

15 iii. Entonces puede realizarse un ensayo de SRM/MRM empleando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple, en el que cada péptido tiene un pico de firma de SRM/MRM exclusivo y característico que define con precisión el ensayo de SRM/MRM exclusivo realizado en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple.

b. Se realiza el análisis de SRM/MRM de modo que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína HER4 que se detecta, como una función del área del pico de firma de SRM/MRM exclusivo a partir de un análisis de espectrometría de masas de SRM/MRM, puede indicar la cantidad relativa y absoluta de la proteína en un lisado de proteínas concreto.

20 i. La cuantificación relativa puede lograrse:

1. Determinando el aumento o la disminución de la presencia de la proteína HER4 comparando el área del pico de firma de SRM/MRM de un péptido HER4 concreto detectado en un lisado de Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formol, con el área del mismo pico de firma de SRM/MRM del mismo fragmento peptídico de HER4 en al menos un segundo, tercero, cuarto o más lisados de Liquid Tissue™ procedentes de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas en formol.

25 2. Determinando el aumento o la disminución de la presencia de la proteína HER4 comparando el área del pico de firma de SRM/MRM de un péptido HER4 concreto detectado en un lisado de Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formol, con las áreas del pico de firma de SRM/MRM desarrolladas a partir de fragmentos peptídicos procedentes de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, en la que la comparación del área del pico de firma de SRM/MRM entre las dos muestras para un fragmento peptídico se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

30 3. Determinando el aumento o la disminución de la presencia de la proteína HER4 comparando el área del pico de firma de SRM/MRM de un péptido HER4 concreto con las áreas del pico de firma de SRM/MRM obtenidas de otros fragmentos peptídicos procedentes de proteínas diferentes dentro del mismo lisado de Liquid Tissue™ procedente de una muestra biológica fijada con formol, para normalizar los niveles cambiantes de la proteína HER4 a los niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo diversas condiciones celulares.

35 4. Estos ensayos pueden aplicarse a fragmentos peptídicos no modificados y a fragmentos peptídicos modificados de la proteína HER4, en los que las modificaciones incluyen, pero no se limitan a la fosforilación y/o la glicosilación, y en los que los niveles relativos de los péptidos modificados se determinan de la misma manera en que se determinan las cantidades relativas de los péptidos no modificados.

40 ii. Puede lograrse la cuantificación absoluta de un péptido concreto comparando el área del pico de firma de SRM/MRM para un fragmento peptídico concreto procedente de la proteína HER4 en una muestra biológica individual con el área del pico de firma de SRM/MRM de un patrón interno de fragmento peptídico sembrado en el lisado de proteínas procedente de la muestra biológica.

45 1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico procedente de la proteína HER4 que se está interrogando. Este patrón se siembra en una muestra en cantidades conocidas, y puede determinarse el área del pico de la firma de SRM/MRM para el patrón interno de fragmento peptídico y para el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas de los picos.

50 2. Esto puede aplicarse a fragmentos peptídicos no modificados y a fragmentos peptídicos modificados, en los que las modificaciones incluyen, pero no se limitan a la fosforilación y/o la glicosilación, y en los que los niveles absolutos de los péptidos modificados pueden determinarse de la misma manera en que se determinan los niveles absolutos de los péptidos no modificados.

3. Aplicación de la cuantificación de fragmentos peptídicos al diagnóstico y el tratamiento del cáncer

a. Se realiza la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína HER4 y se

demuestra que la asociación previamente determinada, tal como se entiende en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína HER4 con el estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral de un paciente se confirma.

5 b. Se realiza la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína HER4 y se demuestra una correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en las que esta correlación ya ha sido demostrada en el campo o puede demostrarse en el futuro por medio de estudios de correlación a través de cohortes de pacientes y de tejidos procedentes de dichos pacientes. Tras haber confirmado mediante este ensayo las correlaciones previamente establecidas o las correlaciones derivadas en el futuro, entonces el método de ensayo puede emplearse para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

10 La evaluación de los niveles de proteínas HER4 en tejidos basada en el análisis de un tejido procedente de un paciente fijado con formol puede proporcionar información de diagnóstico, pronóstico y terapéuticamente pertinente acerca de cada paciente concreto. En una realización de la invención según se define en las reivindicaciones, el método es un método para medir el nivel de la proteína HER4 en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de HER4 modificada o no modificada en un digerido de proteínas preparado a partir de la muestra biológica empleando una espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína HER4 modificada o no modificada en la muestra; y en el que el nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

15 En una realización relacionada de la invención, según se define en las reivindicaciones, la cuantificación de uno o más fragmentos peptídicos de HER4 comprende determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos peptídicos de HER4 en una muestra biológica mediante la comparación con una cantidad conocida de un péptido patrón interno añadido, en la cada uno de los fragmentos peptídicos de HER4 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones de la invención, según se define en las reivindicaciones, el patrón interno es un péptido patrón interno marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados de  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o sus combinaciones.

25 Según la invención, según se define en las reivindicaciones, el método para medir el nivel de la proteína HER4 en una muestra biológica descrito en la presente (o fragmentos peptídicos como sus sustitutos) puede emplearse como indicador de diagnóstico del cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de las mediciones del nivel de la proteína HER4 pueden emplearse para determinar el estadio/grado/estado de un cáncer correlacionando (por ejemplo, comparando) el nivel de la proteína HER4 que se encuentra en un tejido con el nivel de esa proteína que se encuentra en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos. En otra realización, los resultados de las mediciones del nivel de la proteína HER4 pueden emplearse para determinar la estrategia terapéutica para tratar al paciente del cual se ha obtenido la muestra biológica.

30 Otras realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, dicho digerido de proteínas de dicha muestra biológica se prepara mediante el protocolo de Liquid Tissue™.

35 En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, dicha espectrometría de masas comprende la espectrometría de masas en tándem, la espectrometría de masas de atrapamiento de iones, la espectrometría de masas cuadrupolo triple, la espectrometría de masas de MALDI-TOF, la espectrometría de masas de MALDI y/o la espectrometría de masas de tiempo de vuelo.

40 En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el modo de la espectrometría de masas utilizado es el control de una reacción seleccionada ("Selected Reaction Monitoring", SRM), el control de reacciones múltiples ("Multiple Reaction Monitoring", MRM) y/o el control de múltiples reacciones seleccionadas ("Multiple Selected Reaction Monitoring", mSRM), o cualquiera de sus combinaciones.

45 En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de suero, una muestra de fluido de ascitis, una muestra de esputo, fluido linfático, una muestra de saliva, una célula o un tejido sólido.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el tejido es un tejido fijado con formol.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el tejido es un tejido introducido en parafina.

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

50 En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el tumor es un tumor primario.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el tumor es un tumor secundario.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el método comprende además cuantificar un fragmento peptídico de HER4 modificada o no modificada.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, la muestra biológica es un tejido de

tumor fijado con formol que ha sido procesado para cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de HER4 modificada o no modificada empleando el protocolo y los reactivos de Liquid Tissue™.

En una realización de la invención, según se define en las reivindicaciones, el método comprende además cuantificar la cantidad de los péptidos en la tabla 2.

- 5 Se describe una composición que comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos en la tabla 1 o anticuerpos contra estos.

La composición puede comprender uno o más, o dos o más de los péptidos de la tabla 2 o anticuerpos contra estos.

**Listado de secuencias**

10 <110> Expression Pathology Inc

<120> Ensayo de SRM/MRM para la proteína erbB-4 del receptor de tirosina-proteína quinasa (HER4)

<130> 01152.8028.WO00

15 <150> Documento US 61/543.092

<151> 04-10-2011

<160> 10

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Tyr Ser Ala Asp Pro Thr Val Phe Ala Pro Glu Arg  
1 5 10

30

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 2

Asp Gly Gly Phe Ala Ala Glu Gln Gly Val Ser Val Pro Tyr Arg  
1 5 10 15

40

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 3

Leu Ser Ser Leu Ser Asp Leu Glu Gln Gln Tyr Arg  
1 5 10

50

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

<400> 4

Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Asp Arg  
1 5

<210> 5

ES 2 670 651 T3

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 5  
 Gly Ile Trp Val Pro Glu Gly Glu Thr Val Lys  
 1 5 10  
 <210> 6  
 10 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6  
 15 Tyr Leu Pro Leu Glu Asn Leu Arg  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 8  
 20 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7  
 Glu Leu Ala Ala Glu Phe Ser Arg  
 25 1 5  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 8  
 Gln Glu Tyr Leu Asn Pro Val Glu Glu Asn Pro Phe Val Ser Arg  
 35 1 5 10 15  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 40 <400> 9  
 Asp Gly Asn Phe Gly Leu Gln Glu Leu Gly Leu Lys  
 1 5 10  
 45 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 10  
 Ser Thr Leu Gln His Pro Asp Tyr Leu Gln Glu Tyr Ser Thr Lys  
 1 5 10 15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un método para medir el nivel de una proteína HER4 en una muestra biológica de un tejido fijado con formol, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de HER4 en un digerido de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica empleando espectrometría de masas, en el que el fragmento peptídico de HER4 es el péptido de SEQ ID NO:4; y calcular el nivel de la proteína HER4 en dicha muestra; y en el que dicha cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho digerido de proteínas antes de detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, en el que dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida en fase nanoinversa, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho digerido de proteínas comprende un digerido con proteasas.
- 4.- El método de la reivindicación 3, en el que dicho digerido de proteínas comprende un digerido con tripsina.
- 5.- El método de la reivindicación 1, en el que el tejido fijado con formol es un tejido introducido en parafina.
- 15 6.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tejido se obtiene de un tumor.
- 7.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cuantificación del fragmento peptídico de HER4 comprende comparar una cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica individual con la cantidad del mismo fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica diferente y separada.
- 20 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cuantificación de dicho fragmento peptídico de HER4 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido en cantidad conocida, en el que dicho péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.
- 25 9.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección y la cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4 en el digerido de proteínas indica la presencia de una proteína HER4 modificada o no modificada y una asociación con un 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 cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de dicha proteína HER4, con un estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 30 11.- El método de la reivindicación 10, en el que la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de dicha proteína HER4, con un estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer, se combina con la detección y/o la cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos procedentes de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar más información acerca del estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 35 12.- El método de la reivindicación 1, que comprende además seleccionar para el sujeto del cual se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento basándose en la presencia, la ausencia o la cantidad de dicho fragmento peptídico de HER4, o la cantidad de proteína HER4.
- 13.- El método de la reivindicación 12, en el que el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células de cáncer que expresan la proteína HER4.