

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 829**

51 Int. Cl.:

H01J 49/26	(2006.01)
G01T 1/38	(2006.01)
G01N 24/00	(2006.01)
C12Q 1/37	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013 PCT/US2013/021074**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13106603**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013 E 13735986 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2805346**

54 Título: **Ensayo de SRM/MRM para la proteína receptor de insulina**

30 Prioridad:

10.01.2012 US 201261585202 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2018

73 Titular/es:

**EXPRESSION PATHOLOGY, INC. (100.0%)
9620 Medical Center Drive Suite 100
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 2 676 829 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 la proteína receptor de insulina

La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de la proteína receptor de insulina (abreviadamente en lo sucesivo IR, por la expresión inglesa *Insulin Receptor*), y/o sus isoformas IR-A y/o IR-B en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina.

Introducción

Se cree que las acciones proliferativas de los factores de crecimiento similares a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II respectivamente) se deben en gran medida a su activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR). Sin embargo, IGF-II también puede unirse a la isoforma embrionaria del receptor de insulina (IR-A), que se encuentra en numerosos cánceres, y activar dicha isoforma. Véase, por ejemplo, Denley *et al.*, *Endocrinology* 147 (2): 1029-1036 (2006). En respuesta al factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), la proteína IR-A produce una señal anti-apoptósica y proliferativa. Además, el IGF-II por sí mismo puede ser secretado por tumores para establecer un circuito proliferativo autocrino en el que se une a su receptor (IGF-IR) y al receptor IR-A si está presente. Una consecuencia de la señalización de IGF-II vía IR-A es la inducción de IR-A que media la resistencia a fármacos inhibidores de IGF-IR, incluyendo los que están actualmente en desarrollo.

Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína receptor de insulina (denominada IR) adecuados para determinar el nivel y tipo de isoformas del receptor de insulina (IR-A e IR-B) presentes en una muestra. La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en ensayos de monitorización de reacciones seleccionadas (abreviadamente en lo sucesivo SRM, por la expresión inglesa *Selected Reaction Monitoring*) basados en espectrometría de masas, que también se pueden denominar ensayos de monitorización de reacciones múltiples (abreviadamente en lo sucesivo MRM, por la expresión inglesa *Multiple Reaction Monitoring*). Dichos ensayos se denominan en la presente memoria ensayo(s) de SRM/MRM. Se describe el uso de péptidos para el análisis cuantitativo por SRM/MRM de la(s) proteína(s) IR, y el análisis cuantitativo de diferentes isoformas de la proteína IR (por ejemplo, IR-A e IR-B).

Este ensayo de SRM/MRM se puede usar para medir niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína IR. Esto proporciona un medio para medir por espectrometría de masas no solo la cantidad total de proteína(s) IR, sino también la(s) cantidad(es) de las isoformas IR-A e IR-B, en una preparación dada de proteínas obtenida de una muestra biológica.

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

La forma más amplia y ventajosamente disponible de tejidos de pacientes con cáncer es tejido fijado en formalina e incrustado en parafina. La fijación en formaldehído/formalina del tejido extirpado quirúrgicamente es, con mucho, el método más común para conservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada para la práctica de patología estándar. Las soluciones acuosas de formaldehído se denominan formalina. La formalina "al 100%" consiste en una solución saturada de formaldehído (esto es, aproximadamente 40% en volumen o 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizador, generalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en que se conserva el tejido es impregnando todo el tejido durante largos períodos de tiempo (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra al 10%, seguido por incrustación del tejido entero fijado en cera de parafina durante conservación a largo plazo a temperatura ambiente. Por lo tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido canceroso fijado en formalina serán los métodos más aceptados y muy utilizados para el análisis del tejido de pacientes con cáncer.

Los resultados del ensayo de SRM/MRM se pueden usar para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la(s) proteína(s) IR, además de niveles cuantitativos exactos y precisos de las isoformas IR-A e IR-B, en muestras de tejido específico (por ejemplo, muestra de tejido canceroso) de un paciente o sujeto del que se recogió y conservó el tejido (muestra biológica). Esto no solo proporciona información para diagnóstico sobre el cáncer, sino que también permite a un médico u otro profesional de la medicina determinar la terapia adecuada para el paciente. Por ejemplo, un ensayo de este tipo puede diseñarse para diagnosticar el estadio o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que es más probable que responda un paciente. Dicho ensayo que proporciona información diagnóstica y terapéuticamente importante sobre los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra de paciente se denomina ensayo de *diagnóstico complementario*.

El documento US 2004/214338 A1 se refiere a métodos de cuantificación e identificación de péptidos y proteínas, incluyendo la proteína denominada receptor de insulina.

El documento US 2011/105337 A1 se refiere a un método para descubrir biomarcadores proteínicos de la enfermedad para su uso en ensayos de diagnóstico de fluidos corporales para determinar patrones de expresión diferencial

de proteínas secretadas o liberadas directamente por células epiteliales normales y enfermas en lúmenes glandulares.

El documento US 2007/059784 A1 se refiere a métodos para medir la subunidad α del receptor de insulina en una muestra de sangre con un anticuerpo que reconoce la subunidad α del receptor de insulina.

5 El documento US 2011/028344 A1 se refiere a biomarcadores para la enfermedad endometrial.

El documento WO 2011/046871 A1 se refiere a composiciones y métodos para detectar y cuantificar la expresión de la isoforma A del receptor de insulina (IR-A) y/o la isoforma B del receptor de insulina (IR-B) en una muestra de tejido.

Sumario

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

Más específicamente, el problema que subyace en la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la proteína receptor de insulina (IR) y/o sus isoformas, IR-A y/o IR-B, en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR en un producto de digestión de la proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, en donde los péptidos fragmentos del IR se seleccionan del grupo que consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5; y calcular el nivel de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B en dicha muestra; y en donde dicha cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.

15 En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión de proteína antes de detectar y cuantificar la cantidad de dicho uno o más péptidos fragmentos del IR, donde preferiblemente, dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos en fase nano-inversa, cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.

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

25 En una realización, dicha producto de digestión de proteína comprende un producto de digestión con tripsina.

En una realización, dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas con trampa de iones, espectrometría de masas de cuadrupolo triple, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI, y/o espectrometría de masas con tiempo de vuelo, donde preferiblemente el modo de espectrometría de masas utilizado es monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), monitorización de reacciones múltiples (MRM) y/o monitorización de reacciones seleccionadas múltiples (mSRM) o cualquiera de sus combinaciones.

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

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

35 En una realización, la cuantificación del péptido fragmento del IR comprende comparar una cantidad de dicho uno o más péptidos fragmentos del IR en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento del IR en una muestra biológica diferente y separada.

40 En una realización, la cuantificación de uno o más péptidos fragmentos del IR comprende determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmentos del IR en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido en cantidad conocida, en donde cada uno de los péptidos fragmentos del IR 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 isotópicamente.

En una realización, el péptido patrón interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados entre ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o sus combinaciones.

45 En una realización, la detección y cuantificación de la cantidad de dicho uno o más péptidos fragmentos del IR en el producto de digestión de proteína indica la presencia de proteína IR, IR-A y/ o IR-B y una asociación con cáncer en un paciente o sujeto.

50 En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer y más preferiblemente en donde la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

55 En una realización, el método comprende además seleccionar para un paciente o sujeto del cual se obtuvo dicha

muestra biológica, un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de dichos uno o más péptidos fragmentos del IR o la cantidad de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, dirigiéndose preferiblemente el tratamiento a células cancerosas que expresan la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B.

Los ensayos descritos en la presente memoria miden niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos no modificados específicos de la proteína IR y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína IR. Los ejemplos de modificaciones incluyen residuos de aminoácidos fosforilados (por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina) y residuos de aminoácidos glicosilados (por ejemplo, residuos de asparagina glicosilada) que están presentes en los péptidos.

Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, se determinan por la metodología de SRM/MRM, por ejemplo, comparando áreas de picos distintivos de SRM/MRM (por ejemplo, el área del pico distintivo o la intensidad de iones de los fragmentos integrados) de un péptido de IR individual en diferentes muestras (por ejemplo, una muestra de control y una muestra preparada a partir de un tejido de un paciente o de un sujeto). Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de picos distintivos de SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos del IR, donde cada péptido tiene su propio pico distintivo específico de SRM/MRM para determinar el contenido relativo de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B en una muestra biológica con la proteína IR, y el contenido de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta manera, la cantidad de un péptido o péptidos particulares, de la proteína IR y, por lo tanto, la cantidad de la proteína IR, y las isoformas IR-A y/o IR-B, se determina con relación al mismo péptido o péptidos del IR en 2 o más muestras biológicas en las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para un péptido o péptidos dados, a partir de la proteína IR en una sola muestra comparando el área del pico distintivo para dicho péptido por la metodología de SRM/MRM con el área del pico distintivo para otro péptido o péptidos diferentes, a partir de una proteína o proteínas diferentes, en la misma preparación de proteína de la muestra biológica. De esta manera, la cantidad de un péptido particular de la proteína IR, y por lo tanto la cantidad de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, se determina una con relación a otra en la misma muestra. Estos enfoques permiten la cuantificación de un péptido o péptidos individuales, de la proteína IR respecto a la cantidad de otro péptido o péptidos, entre muestras y en muestras en las que las cantidades determinadas por el área del pico son relativas unas respecto a otras, independientemente de las cantidades de peso absoluto a volumen o de peso a peso del péptido del IR en la preparación de proteína de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre áreas de picos distintivos individuales entre muestras diferentes se normalizan con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede realizar a través de muchos péptidos de múltiples proteínas y la proteína IR simultáneamente en una única muestra y/o en muchas muestras para obtener información sobre cantidades relativas de proteínas, de un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

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

El método de ensayo de SRM/MRM se puede usar para ayudar al diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido derivado del paciente o derivado del sujeto, tal como tejido fijado en formalina, y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería más ventajoso para uso en el tratamiento de dicho paciente o sujeto. Se analiza el tejido canceroso que se extrae de un paciente o sujeto, ya sea por cirugía, tal como por extirpación terapéutica de tumores parciales o enteros, o por procedimientos de biopsias realizados para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad sospechosa, para determinar si están o no presentes en el tejido de dicho paciente o sujeto una proteína o proteínas específicas, y qué formas de proteínas. Además, el nivel de expresión de una proteína o proteínas múltiples, se puede determinar y comparar con un nivel "normal" o de referencia encontrado en el tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas encontrados en tejido sano pueden proceder, por ejemplo, de los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Alternativamente, se pueden obtener niveles normales o de referencia para individuos con cáncer por análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer.

Los ensayos de niveles de proteínas (por ejemplo, IR, IR-A o IR-B) se pueden usar también para diagnosticar el

estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando uno o más (es decir, uno, dos, tres o cuatro) de los niveles de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B o la relación IR-A/IR-B. Cuando se emplea la relación IR-A/IR-B, dicha relación puede ser mayor que 0,10, 0,05, 0,07, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 1,5, 2,0, 2,25, 2,5, 4, 5, 7,5 o 10 dependiendo del tejido y el cáncer.

5 La sobreexpresión del receptor de insulina (IR) es común en cánceres, con expresión de la versión embrionaria de la proteína IR, predominando la isoforma A (IR-A, que carece del exón 11) sobre la isoforma B (IR-B con el exón 11). Los ensayos descritos en la presente memoria son capaces de determinar/detectar la presencia y cantidad de la isoforma IR-A presente en la muestra biológica. La implicación de la presencia de IR-A es que esta isoforma
10 específica es capaz de unirse al factor de crecimiento II similar a la insulina con una afinidad mayor que la isoforma IR-B, y por lo tanto impartir resistencia a la terapia mediada por IGF-IR.

Se describen métodos para determinar la resistencia (o inversamente, la susceptibilidad) de un cáncer a un antagonista de IGF-IR. Dichos métodos comprenden determinar la presencia o el nivel del IR, IR-A, o la relación IR-A/IR-B en un tejido canceroso; en donde la presencia del IR, IR-A o una mayor relación IR-A/IR-B con respecto al tejido de control es indicativa de una resistencia de dicho cáncer a dicho antagonista de IGF-IR.

15 Un método puede comprender determinar la presencia o el nivel de IR-A, o la relación IR-A/IR-B en un tejido canceroso; en donde la presencia de IR-A o una mayor relación IR-A/IR-B en relación con el tejido de control es indicativa de una resistencia de dicho cáncer a dicho antagonista de IGF-IR. Cuando se emplea la relación IR-A/IR-B, la relación que indica resistencia a IGF-IR puede ser mayor que 0,10, 0,05, 0,07, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 1,5, 2,0, 2,25, 2,5, 4, 5, 7,5 o 10 dependiendo del tejido y el cáncer.

20 Los métodos para determinar la resistencia (o susceptibilidad) de un cáncer a un antagonista de IGF-IR pueden extenderse a la selección de una terapia y/o agente terapéutico para el tratamiento de un paciente o sujeto que padece cáncer. En algunos ejemplos, cuando el cáncer tiene IR-A o una relación IR-A/IR-B suficientemente alta como para indicar resistencia a los antagonistas de IGF-IR, la terapia y/o el método terapéutico empleado omitiría el uso de antagonistas de IGF-IR.

25 En los métodos para determinar la resistencia (o, a inversamente, la susceptibilidad) de un cáncer a un antagonista de IGF-IR, el antagonista de IGF-IR es una proteína o péptido (polipéptido) que se une al IGF-IR. La proteína o péptido (polipéptido) puede comprender: a) un anticuerpo humano; b) un anticuerpo humanizado; c) un anticuerpo quimérico; d) un anticuerpo monoclonal; e) un anticuerpo monoespecífico; f) un anticuerpo recombinante; g) un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; h) un anticuerpo monocatenario; i) un diacuerpo; j) un triacuerpo; k) un tetracuerpo; l) un fragmento Fab; m) un fragmento F(ab')₂; n) un anticuerpo de un dominio; o) un anticuerpo IgD; p) un anticuerpo IgE; q) un anticuerpo IgM; r) un anticuerpo IgG1; s) un anticuerpo IgG2; t) un anticuerpo IgG3; o u) un anticuerpo IgG4. En otros ejemplos adicionales, la proteína es un anticuerpo o un anticuerpo monoclonal. En un ejemplo, el anticuerpo se selecciona de uno cualquiera, o una combinación de dos cualquiera, o de los tres de R1507 (Roche), OSI-906 (OSI Pharmaceuticals) y/o figitumumab. En otro ejemplo, el antagonista de IGF-IR es un
35 inhibidor de tirosina-quinasa.

Los niveles o cantidades de proteínas o péptidos se pueden definir como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o péptido determinada por el ensayo de SRM/MRM. El nivel o cantidad puede ser normalizado hasta el nivel o la cantidad total de proteína u otro componente en el lisado analizado (por ejemplo, expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramo de proteína). Además, el nivel o cantidad de una
40 proteína o péptido se puede determinar en volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o cantidad de proteína o péptido según se determina por el ensayo de SRM/MRM se puede normalizar también con respecto al número de células analizadas. La información con respecto a la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B se puede utilizar por tanto para ayudar a la determinación del estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína IR, las isoformas IR-A y/o IR-B, o péptidos fragmentos de la proteína IR con los niveles observados en tejidos normales. Una vez que se han determinado el estadio y/o el grado y/o las características de expresión de la proteína IR, y la isoforma IR-A y/o IR-B del cáncer, dicha información se puede relacionar con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente tejido canceroso que se caracteriza, por ejemplo, por la expresión anormal de la proteína o proteína(s) (por ejemplo, IR y las isoformas IR-A y/o IR-B) que se analizaron. Relacionando la información de un ensayo de la proteína IR, y las isoforma IR-A y/o IR-B, con una lista de agentes terapéuticos que se dirigen específicamente, por ejemplo, a la proteína IR, y a las isoformas IR-A y/o IR-B, o a las células/tejido que expresan la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B se define lo que se ha denominado un enfoque de *medicina personalizada* para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos en esta memoria forman el fundamento de un enfoque de *medicina personalizada* utilizando el análisis de proteínas del propio tejido del paciente o del sujeto como fuente de decisiones de diagnóstico y
55 tratamiento.

Como se define en las reivindicaciones, se proporciona un método para medir el nivel de la proteína receptor de insulina (IR), y/o sus isoformas IR-A y/o IR-B, en una muestra biológica humana, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR en un producto de digestión de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, en donde los péptidos fragmentos del IR se seleccionan del grupo que consiste en los péptidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5; y calcular el nivel de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la IR-B en la muestra; y donde la cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.
60

5 El método puede comprender además la etapa de fraccionar el producto de digestión de proteína antes de detectar y cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR. La etapa de fraccionamiento puede ser, por ejemplo, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos en fase inversa. El producto de digestión de proteínas de la muestra biológica se puede preparar por el protocolo *Liquid Tissue*[™]. En una realización particular, el producto de digestión de proteína comprende un producto de digestión con proteasa, por ejemplo, un producto de digestión por tripsina.

10 En estas realizaciones, la espectrometría de masas puede comprender espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas con trampa de iones, espectrometría de masas de cuadrupolo triple, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI y/o espectrometría de masas con tiempo de vuelo. El modo de espectrometría de masas utilizado puede ser, por ejemplo, monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), monitorización de reacciones múltiple (MRM) y/o monitorización de reacciones seleccionadas múltiples (mSRM) o cualquiera de sus combinaciones.

15 Se describe que el péptido fragmento del IR puede comprender una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

Se describe que la muestra biológica puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de suero, una muestra de líquido ascítico, una muestra de esputo, fluido linfático, una muestra de saliva, una célula o un tejido sólido. El tejido puede ser tejido incrustado en parafina. El tejido se puede obtener de un tumor, por ejemplo, un tumor primario o un tumor secundario.

20 En cualquiera de estas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, el método comprende cuantificar un péptido fragmento del IR. La cuantificación del péptido fragmento del IR como se describe en la presente memoria puede comprender comparar una cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR que comprenden una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 8 a aproximadamente 45 residuos de aminoácidos del IR como se muestra en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento del IR en una muestra biológica diferente y separada. La cuantificación de uno o más péptidos fragmentos del IR puede comprender determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmentos del IR en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que se compara cada uno de los péptidos fragmentos del IR en la muestra biológica con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. El péptido patrón interno puede ser un péptido marcado isotópicamente. El péptido patrón interno marcado isotópicamente puede contener uno o más isótopos pesados estables seleccionados de ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o sus combinaciones.

35 En cualquiera de estas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, la detección y/o cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR en el producto de digestión de proteína puede indicar la presencia de la proteína IR, IR-A y/o IR-B, y una asociación con cáncer en un paciente o sujeto. El método puede comprender además correlacionar los resultados de la detección y/o cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer. Correlacionar los resultados de la detección y/o cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer se puede combinar con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

40 El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores puede comprender además seleccionar, para un paciente o sujeto del que se obtuvo la muestra biológica, un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR o la cantidad de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B.

45 Se describe que el método puede comprender además administrar a un paciente o paciente del cual se obtuvo la muestra biológica una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, donde el agente terapéutico y/o la cantidad del agente terapéutico administrado se basa en la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR modificados o no modificados o la cantidad de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B. El tratamiento o el agente terapéutico pueden dirigirse a células cancerosas que expresan la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B.

50 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la muestra biológica puede ser tejido tumoral fijado en formalina que se ha procesado para cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR empleando el protocolo y los reactivos de *Liquid Tissue*[™].

55 En el método descrito en la presente memoria, el uno o más péptidos fragmentos del IR pueden ser uno o más de los péptidos de la Tabla 1. El método puede comprender la cuantificación de la cantidad de uno, dos, tres, cuatro o cinco de los péptidos de la Tabla 2.

También se describen composiciones que comprenden uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más de los péptidos de la Tabla 1 y/o anticuerpos para ellos, y composiciones que comprenden uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más de los péptidos de la Tabla 2 o anticuerpos para ellos.

Se describen métodos para determinar la resistencia de un cáncer a un antagonista de IGF-IR, que comprende determinar la presencia o el nivel de IR-A, o la relación de IR-A a IR-B en un tejido canceroso; donde la presencia de IR-A o una mayor relación de IR-A a IR-B con respecto al tejido de control es indicativa de una resistencia de dicho cáncer a dicho antagonista de IGF-IR. El antagonista de IGF-IR puede comprender una proteína o péptido que se une al IGF-IR. La proteína o péptido puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humano; anticuerpo humanizado; anticuerpo quimérico; anticuerpo monoclonal; anticuerpo mono-específico; anticuerpo recombinante; fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; anticuerpo monocatenario; diacuerpo; triacuerpo; tetracuerpo; fragmento Fab; fragmento F(ab')₂; anticuerpo de un dominio; anticuerpo IgD; anticuerpo IgE; anticuerpo IgM; anticuerpo IgG1; anticuerpo IgG2; anticuerpo IgG3; o anticuerpo IgG4. El anticuerpo se puede seleccionar de R1507, OSI-906 o figitumumab.

Descripción detallada

En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína IR, preparado, por ejemplo, por digestión con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina o endoproteinasa Lys-C), se puede usar como un informador sustituto para determinar la abundancia de la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B de la proteína IR, en una muestra utilizando un ensayo de SRM/MRM basado en espectrometría de masas. Similarmente, cualquier secuencia de péptido predicha que contenga un residuo de aminoácido en un sitio que se sabe que está potencialmente modificado en la proteína IR se puede utilizar también para analizar en una muestra la extensión de la modificación de la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B.

Los péptidos fragmentos del IR se pueden generar de varias maneras, incluyendo el uso del protocolo *Liquid Tissue*[™] descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 7.473.532. El protocolo y los reactivos de *Liquid Tissue*[™] producen muestras peptídicas adecuadas para el análisis por espectroscopía de masas a partir de tejido incrustado en parafina y fijado en formalina por digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/biológica. Los reactivos y protocolos adecuados también están comercialmente disponibles de OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

En el protocolo *Liquid Tissue*[™], el tejido/muestra biológica se calienta en un tampón durante un período de tiempo prolongado (por ejemplo, desde aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 100°C durante un período de tiempo desde aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 4 horas, por ejemplo, durante aproximadamente 60 o aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 4, 6 u 8 horas) para invertir o liberar la reticulación de proteínas. El tampón empleado es un tampón neutro (por ejemplo, un tampón basado en Tris o un tampón que contiene un detergente) y ventajosamente es un tampón que no interfiere con el análisis por espectrometría de masas. Después del tratamiento térmico, la muestra de tejido/biológica se trata con una o más proteasas, que incluyen, aunque sin limitación, tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para romper el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y para licuar la muestra. Las condiciones ilustrativas para el tratamiento con proteasa son desde aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 60 minutos hasta aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 24 horas, a una temperatura desde aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 65°C. Ventajosamente, se emplean para licuar la muestra endoproteasas, y particularmente combinaciones de dos o tres endoproteasas, usadas de forma simultánea o secuencial. Por ejemplo, las combinaciones adecuadas de proteasas pueden incluir, aunque sin limitación, 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 biomolecular líquido, soluble y diluible. Ventajosamente este lisado líquido está libre de materia sólida o en partículas que se puede separar del lisado por centrifugación.

Una vez que se preparan los lisados, los péptidos de las muestras pueden ser sometidos a una variedad de técnicas que facilitan su análisis y medición por espectrometría de masas. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los péptidos se pueden separar por una técnica de afinidad, tal como por ejemplo purificación basada inmunológicamente (por ejemplo, cromatografía de inmovilización de anticuerpos), cromatografía en medios selectivos para iones, o si los péptidos están modificados, por separación utilizando medios apropiados, tales como lectinas para la separación de péptidos modificados con carbohidratos. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se emplea el método SISCAPA, que emplea la separación inmunológica de péptidos antes del análisis por espectrometría de masas. La técnica SISCAPA se describe, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. N° 7.632.686. En otra realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se pueden usar métodos de afinidad para lectina (por ejemplo, purificación y/o cromatografía de afinidad) para separar péptidos de un lisado antes del análisis por espectrometría de masas. Métodos para la separación de grupos de péptidos, que incluyen métodos basados en lectina, se describen, por ejemplo, en Geng et al., J. Chromatography B, 752: 293-306 (2001). Técnicas de cromatografía de inmovilización de anticuerpos, técnicas de afinidad por lectinas y otras formas de separación y/o cromatografía de afinidad (por ejemplo, en fase inversa, separación basada en tamaños, intercambio iónico) se pueden usar en cualquier combinación adecuada para facilitar el análisis de péptidos por espectrometría de masas.

Sorprendentemente, se encontró que muchas secuencias peptídicas potenciales de la proteína IR son inadecuadas o ineficaces para su uso en ensayos de SRM/MRM basados en espectrometría de masas por razones que no son inmediatamente evidentes. En particular, se encontró que muchos péptidos tripticos procedentes de la proteína IR no podían ser detectados eficazmente o en absoluto en un lisado por *Liquid Tissue*[™] a partir de tejido incrustado en parafina y fijado en formalina. Como no era posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo de MRM/

SRM, fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en lisados reales por *Liquid Tissue*TM para desarrollar un ensayo de SRM/MRM fiable y preciso para la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B de la proteína. Si bien no se desea vincularse a ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían, por ejemplo, ser difíciles de detectar por espectrometría de masas porque no se ionizan bien ni producen fragmentos que no son distintos de los generados a partir de otras proteínas. Los péptidos tampoco pueden resolverse bien por separación (por ejemplo, cromatografía de líquidos), o pueden adherirse a recipientes de vidrio o plástico, lo que conduce a resultados erróneos en el ensayo. Por consiguiente, los péptidos de la proteína IR (y sus isoformas A y B) que pueden ser detectados en un lisado por *Liquid Tissue*TM (por ejemplo, los péptidos de las Tablas 1 y 2) preparados a partir de una muestra de tejido fijado en formalina son los péptidos para los que se pueden emplear ensayos de SRM/MRM en un ensayo de SRM/MRM para la proteína IR.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la proteasa empleada en la preparación simultánea de fragmentos de IR-A e IR-B en una única muestra será tripsina. En otra realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la proteasa empleada será Lys-C. En aún otras realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, la proteasa empleada será una combinación de tripsina y Lys-C.

Los péptidos IR encontrados en varios ejemplos de esta descripción (por ejemplo, los de las Tablas 1 y/o 2, a continuación) se derivaron de la proteína IR por digestión con proteasa de todas las proteínas en un lisado complejo por *Liquid Tissue*TM preparado a partir de células obtenidas de tejido canceroso fijado en formalina. A menos que se indique lo contrario, en cada caso la proteasa fue tripsina. El lisado por *Liquid Tissue*TM se analizó luego por espectrometría de masas para determinar los péptidos derivados de la proteína IR que se detectan y analizan por espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto preferido específico de péptidos para análisis por espectrometría de masas se basa en: 1) determinación experimental de qué péptido o péptidos procedentes de una proteína se ionizan en análisis por espectrometría de masas de lisados por *Liquid Tissue*TM, y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir a las condiciones del protocolo y experimentales usadas en la preparación de un lisado por *Liquid Tissue*TM. Esta última propiedad se extiende no solo a la secuencia de aminoácidos del péptido, sino también a la capacidad de un residuo de aminoácido modificado dentro de un péptido para sobrevivir en forma modificada durante la preparación de la muestra.

Los lisados de proteínas de células obtenidas directamente a partir de tejido fijado en formalina (formaldehído) se prepararon usando los reactivos y el protocolo de *Liquid Tissue*TM. Esto implica recoger células en un tubo de muestra por una microdissección de tejido seguida de calentamiento de las células en el tampón de *Liquid Tissue*TM durante un período de tiempo prolongado. Una vez que la reticulación inducida por formalina se ha visto afectada negativamente, los tejidos/células se digieren a continuación hasta completarse de una manera predecible usando una proteasa, tal como tripsina. El experto en la técnica reconocerá que otras proteasas, y en particular, las endoproteasas pueden usarse en lugar de tripsina o además de ella.

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

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

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los péptidos trípticos del IR identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, incluyen dos o más, tres o más, cuatro o más, o todos los péptidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, las secuencias de cada uno de los cuales se muestra en la Tabla 1, con la condición de que al menos un péptido sea un péptido de la SEQ ID NO: 3 o un péptido de la SEQ ID NO: 5. Cada uno de esos péptidos se detectó por espectrometría de masas en lisados por *Liquid Tissue*TM preparados a partir de tejido incrustado en parafina y fijado en formalina. Por lo tanto, cada uno de los péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más de dichos péptidos citados en las Tablas 1 y 2) son candidatos para su uso en ensayo de SRM/MRM cuantitativo para la proteína IR, y las isoformas IR-A y/o IR-B, en muestras biológicas humanas, que incluyen directamente en el tejido del

paciente o sujeto fijado en formalina. La Tabla 2 muestra información adicional con respecto a los péptidos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia del péptido
SEQ ID NO: 1	TSSGTGAEDPRPSRK
SEQ ID NO: 2	TFEDYLHNVVFVPRPSRK
SEQ ID NO: 3	TFEDYLHNVVFVPRPSR
SEQ ID NO: 4	TFEDYLHNVVFVPRK
SEQ ID NO: 5	TFEDYLHNVVFVPR

5 Los péptidos IR enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados de lisados múltiples por *Liquid Tissue*TM de múltiples tejidos fijados en formalina diferentes de distintos órganos humanos, incluyendo próstata, colon y mama. Cada uno de dichos péptidos es útil para el ensayo de SRM/MRM cuantitativo de la proteína IR, y las isoformas IR-A y/o IR-B, en tejido fijado en formalina. El análisis adicional de los datos de estos experimentos indicó que no se observa preferencia para ninguno de los péptidos específicos de ningún sitio específico del órgano. Por lo tanto, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos de SRM/MRM de la proteína IR y de las isoformas IR-A y/o IR-B, en un lisado por *Liquid Tissue*TM de cualquier tejido fijado en formalina procedente de cualquier muestra biológica o de cualquier sitio del órgano en el cuerpo.

10 Como se describe en la presente memoria, uno o más péptidos de la Tabla 1, o cualquier combinación de dichos péptidos (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, o los cinco) se analiza por un método que no se basa en espectroscopía de masas, incluyendo, aunque sin limitación, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia de Western o ELISA). En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los ensayos se realizan usando tejido fijado en formalina. Independientemente de cómo se obtenga la información dirigida a la cantidad del (de los) péptido(s) (absoluta o relativa), la información se puede emplear en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo indicar (diagnosticar) la presencia de cáncer en un paciente o sujeto, determinar el estadio/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico o determinar la terapia o el régimen de tratamiento para un paciente o sujeto.

15 La presente descripción incluye composiciones que comprenden uno o más de los péptidos de las Tablas 1 y/o 2, y puede incluir opcionalmente péptidos que están marcados isotópicamente, pero por lo demás idénticos a uno o más de los péptidos encontrados en las Tablas 1 y/o 2. Las composiciones puede comprender uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, o todos los péptidos de las Tablas 1 y/o 2, y opcionalmente puede incluir péptidos, polipéptidos o proteínas que comprenden péptidos que están marcados isotópicamente, pero por lo demás idénticos a uno o más de los péptidos encontrados en la Tabla 1 y/o Tabla 2. Cuando se emplean péptidos, polipéptidos o proteínas que comprenden los péptidos de las Tablas 1 y/o 2, el tratamiento con proteasa libera péptidos que están marcados isotópicamente, pero son idénticos por lo demás a los péptidos de las Tablas 1 y/o 2. Cada uno de los péptidos marcados isotópicamente pueden estar marcados con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en: ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o sus combinaciones. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína IR, ya sean marcados o no isotópicamente, no necesitan contener todos los péptidos de dicha proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). No es necesario que las composiciones contengan todos los péptidos en combinación de IR, y particularmente todos los péptidos que aparecen en la Tabla 1 y/o Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales secos o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosas), matrices o transferencias.

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa mono-isotópica	Estado de carga del precursor	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
SEQ ID NO: 1	TSSGTGAEDPRP SRK	1544,74	2	773,384	390,245	y3
			2	773,384	487,298	y4
			2	773,384	643,399	y5
			2	773,384	740,452	y6
			2	773,384	855,479	y7
			2	773,384	984,522	y8
			2	773,384	1055,559	y9

ES 2 676 829 T3

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa mono-isotópica	Estado de carga del precursor	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
			2	773,384	1112,58	y10
			2	773,384	1213,628	y11
			2	773,384	1270,649	y12
			2	773,384	1357,681	y13
SEQ ID NO: 2	TFEDYLHNVVVFV PRPSRK	2203,14	2	1102,584	390,245	y3
			2	1102,584	487,298	y4
			2	1102,584	643,399	y5
			2	1102,584	740,452	y6
			2	1102,584	839,52	y7
			2	1102,584	986,589	y8
			2	1102,584	1085,657	y9
			2	1102,584	1184,726	y10
			2	1102,584	1298,769	y11
			2	1102,584	1435,828	y12
SEQ ID NO: 3	TFEDYLHNVVVFV PRPSR	2075,04	2	1038,537	359,203	y3
			2	1038,537	515,304	y4
			2	1038,537	612,357	y5
			2	1038,537	711,426	y6
			2	1038,537	858,494	y7
			2	1038,537	957,562	y8
			2	1038,537	1056,631	y9
			2	1038,537	1170,674	y10
			2	1038,537	1307,733	y11
			2	1038,537	1420,817	y12
SEQ ID NO: 4	TFEDYLHNVVVFVPRK	1862,95	2	932,491	400,266	y3
			2	932,491	499,335	y4
			2	932,491	646,403	y5
			2	932,491	745,471	y6
			2	932,491	844,54	y7
			2	932,491	958,583	y8
			2	932,491	1095,642	y9
			2	932,491	1208,726	y10
			2	932,491	1371,789	y11
			2	932,491	1486,816	y12
SEQ ID NO: 5	TFEDYLHNVVVFVPR	1734,86	2	868,444	371,24	y3
			2	868,444	518,308	y4
			2	868,444	617,376	y5
			2	868,444	716,445	y6

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa mono-isotópica	Estado de carga del precursor	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
			2	868,444	830,488	y7
			2	868,444	967,547	y8
			2	868,444	1080,631	y9
			2	868,444	1243,694	y10
			2	868,444	1358,721	y11
			2	868,444	1487,764	y12

Una consideración 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 realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluyendo MALDI, con trampa de iones o de cuadrupolo triple, la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo de SRM/MRM se considera frecuentemente una plataforma de instrumentos de cuadrupolo triple. Se puede considerar que ese tipo de espectrómetro de masas es el instrumento más adecuado para analizar un solo péptido diana aislado en un lisado de proteína muy complejo que puede consistir en cientos de miles a millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas en una célula.

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

La información adicional sobre péptidos diana en general, y sobre péptidos IR específicos, puede incluir una o más de la masa mono-isotópica de cada péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z, y el tipo de ion de cada ion de transición. La información adicional de péptidos que se puede usar para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B, se muestra en la Tabla 2 para los cinco (5) péptidos del IR de la lista de la Tabla 1. La información adicional similar descrita para los péptidos mostrados en la Tabla 2 se puede preparar, obtener y aplicar al análisis de los otros péptidos de la proteína IR, incluyendo los producidos por la acción de otras proteasas o combinaciones de proteasas (por ejemplo, tripsina y/o Lys-C).

La información adicional sobre péptidos del IR específicos puede incluir uno o más, dos o más, o tres o más de la masa mono-isotópica de cada péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z, y el tipo de iones de cada ion de transición para los péptidos que resultan de la proteólisis por Lys-C de proteínas IR, incluyendo una o ambas de las isoformas IR-A y/o IR-B.

La información adicional sobre péptidos del IR específicos puede incluir uno o más, dos o más, o tres o más de la masa mono-isotópica de cada péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z, y el tipo de iones de cada ion de transición para péptidos que resultan de la proteólisis por tripsina de proteínas IR, incluyendo una o ambas de las isoformas IR-A y/o IR-B.

Aún la información adicional sobre el péptido del IR específico puede incluir uno o más, dos o más, o tres o más de la masa mono-isotópica de cada péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z, y el tipo de iones de cada ion de transición para péptidos que resultan de la proteólisis por tripsina y Lys-C de proteínas IR, incluyendo una o ambas de las isoformas IR-A y/o IR-B.

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

Método de ensayo

1. Identificación de péptidos fragmentos candidatos por SRM/MRM para la proteína IR
 - a. Preparar un lisado de proteína por *Liquid Tissue*[™] a partir de una muestra biológica fijada en formalina usando una proteasa o proteasas, (que pueden o no incluir tripsina), para digerir proteínas.
 - b. Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado por *Liquid Tissue*[™] en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los péptidos fragmentos de la proteína IR, donde los péptidos fragmentos individuales no contienen ninguna modificación peptídica, tal como fosforilaciones o glicosilaciones
 - c. Analizar todos los fragmentos de proteína en el lisado por *Liquid Tissue*[™] en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los péptidos fragmentos de la proteína IR

que llevan modificaciones peptídicas, tales como, por ejemplo, residuos fosforilados o glicosilados.

- 5 d. Se pueden medir potencialmente todos los péptidos generados por un método de digestión específico de la proteína IR de longitud completa, pero los péptidos preferidos usados para el desarrollo del ensayo de SRM/MRM son los que se identifican por espectrometría de masas directamente en un lisado complejo de proteínas por *Liquid Tissue*TM preparado a partir de una muestra biológica fijada en formalina.
- 10 e. Los péptidos que están modificados específicamente (fosforilados, glicosilados, etc.) en un tejido de paciente o sujeto y que se ionizan, y por tanto se pueden detectar, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado por *Liquid Tissue*TM de una muestra biológica fijada en formalina se identifican como péptidos candidatos para analizar modificaciones peptídicas de la proteína IR.
2. Ensayo de espectrometría de masas para péptidos fragmentos de la proteína IR.
- 15 a. El ensayo de SRM/MRM en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple para péptidos fragmentos individuales identificados en un lisado por *Liquid Tissue*TM se aplica a los péptidos de la proteína IR.
- 20 i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un péptido fragmento para condiciones óptimas de cromatografía que incluyen, entre otras, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos en fase nano-inversa, cromatografía de líquidos de alta resolución o cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.
- 25 ii. Determinar la masa mono-isotópica del péptido, el estado de carga del precursor para cada péptido, el valor m/z del precursor para cada péptido, los iones de transición m/z para cada péptido y el tipo de iones de cada ion de transición para cada péptido fragmento con el fin de desarrollar un ensayo de SRM/MRM para cada péptido.
- iii. El ensayo de SRM/MRM se puede realizar utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple donde cada péptido tiene un pico distintivo característico y único de SRM/MRM que define con precisión el ensayo de SRM/MRM único, tal como se realiza en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple.
- 30 b. Realizar un análisis por SRM/MRM de modo que la cantidad del péptido fragmento de la proteína IR que se detecta, en función del área del pico distintivo único de SRM/MRM a partir de un análisis por espectrometría de masas de SRM/MRM, pueda indicar tanto la cantidad relativa como absoluta de la proteína en un lisado de proteína particular.
- 35 i. La cuantificación relativa se puede lograr por:
1. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido del IR dado detectado en un lisado por *Liquid Tissue*TM a partir de una muestra biológica fijada en formalina con la misma área del pico distintivo de SRM/MRM del mismo péptido fragmento del IR en al menos un segundo, tercero, cuarto o más lisados por *Liquid Tissue*TM de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas en formalina.
- 40 2. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido IR dado detectado en un lisado por *Liquid Tissue*TM a partir de una muestra biológica fijada en formalina con áreas de picos distintivos de SRM/MRM desarrolladas a partir de péptidos fragmentos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área del pico distintivo de SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento de péptido se normalizan a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.
- 45 3. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR, las isoformas IR-A y/o IR-B, comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM para un péptido del IR dado con las áreas de los picos distintivos de SRM/MRM de otros péptidos fragmentos derivados de diferentes proteínas en el mismo lisado por *Liquid Tissue*TM a partir de la muestra biológica fijada en formalina para normalizar los niveles cambiantes de la proteína IR, y las isoformas IR-A y/o IR-B, a niveles de otras proteínas que no cambian su niveles de expresión bajo diversas condiciones celulares.
- 50 4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a péptidos fragmentos no modificados como a péptidos fragmentos modificados de la proteína IR, donde las modificaciones incluyen, aunque sin limitación, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera que se determinan las cantidades relativas de péptidos no modificados.
- 55 ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM para un péptido fragmento dado procedente de la proteína IR en una

muestra biológica individual con el área de pico distintivo de SRM/MRM de un patrón interno de péptido fragmento introducido en el lisado de proteína de la muestra biológica.

1. El patrón interno es una versión sintética marcada del péptido fragmento de la proteína IR que está siendo buscada. Este patrón se introduce en una muestra en cantidades conocidas, y el área del pico distintivo de SRM/MRM se puede determinar tanto para el patrón interno del péptido fragmento como para el péptido fragmento natural en la muestra biológica por separado, seguido por la comparación de ambas áreas de picos.
2. Esto se puede aplicar a péptidos fragmentos no modificados y péptidos fragmentos modificados, donde las modificaciones incluyen, aunque sin limitación, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles absolutos de los péptidos modificados se pueden determinar de la misma manera que se determinan los niveles absolutos de los péptidos no modificados.
3. Aplicar la cuantificación de péptidos fragmentos al diagnóstico y al tratamiento del cáncer.
 - a. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de péptidos fragmentos de la proteína IR, y las isoformas IR-A y/o IR-B, y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, como es bien entendida en el campo del cáncer, de la proteína IR y las isoformas IR-A y/o IR-B, expresión del estadio/grado/estado del cáncer en tejido tumoral del paciente o sujeto.
 - b. Realizar una cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de péptidos fragmentos de la proteína IR, las isoformas IR-A y/o IR-B, y demostrar la correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en donde esta correlación ya se ha demostrado en el campo o puede ser demostrada en el futuro a través de estudios de correlación entre cohortes de pacientes o sujetos y tejido de dichos pacientes o sujetos. Una vez que son confirmadas por este ensayo las correlaciones previamente establecidas o las correlaciones derivadas en el futuro, entonces el método de ensayo se puede usar para determinar la estrategia óptima de tratamiento.

Un ensayo de espectrometría de masas para péptidos fragmentos de la proteína IR.

- a. Ensayo de SRM/MRM para determinar la cantidad del péptido fragmento de la proteína IR que se detecta para determinar la cantidad relativa y/o absoluta de la(s) proteína(s) IR-A y/o IR-B en un lisado de proteína.
 - i. La cuantificación relativa se puede lograr por:
 1. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido del IR dado detectado en un lisado por *Liquid Tissue*TM de una muestra biológica fijada en formalina con la misma área de pico distintivo de SRM/MRM del mismo péptido fragmento del IR en al menos un segundo, tercero, cuarto o más lisados por *Liquid Tissue*TM de al menos una segunda, tercera y cuarta muestras biológicas fijadas en formalina.
 2. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM de un péptido IR dado detectado en un lisado por *Liquid Tissue*TM de una muestra biológica fijada en formalina con áreas de picos distintivos de SRM/MRM desarrolladas a partir péptidos fragmentos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área del pico distintivo de SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento de péptido se normalizan a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.
 3. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, comparando el área del pico distintivo de SRM/MRM para un péptido IR dado con las áreas de picos distintivos de SRM/MRM de otros péptidos fragmentos derivados de diferentes proteínas en el mismo lisado por *Liquid Tissue*TM de la muestra biológica fijada en formalina para normalizar los niveles cambiantes de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo varias condiciones celulares.
 4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a péptidos fragmentos no modificados como a péptidos fragmentos modificados de la proteína IR, donde las modificaciones incluyen, aunque in limitación, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera que se determinan las cantidades relativas de péptidos no modificados.
 - ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado o la proteína de la que se deriva puede lograrse comparando el área de pico distintivo de SRM/MRM para un péptido fragmento dado de la proteína IR en una muestra biológica individual con el área de pico distintivo de SRM/MRM de un patrón interno de péptido fragmento introducido en el lisado de proteína de la muestra biológica.

El patrón interno es una versión sintética marcada del péptido fragmento de la proteína IR que está siendo buscado (o una proteína o polipéptido que comprende la versión sintética marcada del péptido fragmento de que se libera en la proteólisis). El patrón se introduce en una muestra en cantidades conocidas, y se puede determinar el área de pico distintivo de RM/MRM tanto para el patrón interno del péptido fragmento como para el péptido fragmento natural en la muestra biológica por separado, seguido por la comparación de ambas áreas de picos.

Esto se puede aplicar a péptidos fragmentos no modificados y péptidos fragmentos modificados, donde las modificaciones incluyen, aunque sin limitación, fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles absolutos de péptidos modificados se pueden determinar de la misma manera que se determinaron los niveles absolutos de péptidos no modificados.

La evaluación de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, los niveles en los tejidos basados en el análisis de tejido fijado en formalina, derivado de pacientes o derivados de sujetos, pueden proporcionar diagnóstico, pronóstico e información terapéuticamente relevante sobre cada paciente o sujeto particular. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método para medir el nivel de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, en una muestra biológica humana, comprende detectar y cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR en un producto de digestión de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, en donde los péptidos fragmentos del IR se seleccionan del grupo que consiste en los péptidos de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 5; y calcular el nivel de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, en dicha muestra; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. En una realización relacionada de la invención como se define en las reivindicaciones, la cuantificación de uno o más péptidos fragmentos del IR comprende determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmentos del IR en una muestra biológica humana por comparación con un péptido patrón interno añadido en cantidad conocida, en donde cada uno de los péptidos fragmentos del IR en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, el patrón interno es un péptido patrón interno marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos pesados estables seleccionados de ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o sus combinaciones.

El método para medir el nivel de la proteína IR, y/o las isoformas IR-A y/o IR-B, en una muestra biológica descrita en la presente memoria (o péptidos fragmentos como sustitutos de las mismas) puede usarse como un indicador de diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los resultados de las mediciones del nivel de la proteína IR, y/o las isoformas IR-A y/o IR-B, se pueden emplear para determinar el estadio/grado/estado de diagnóstico de un cáncer correlacionando (por ejemplo, comparando) el nivel de la proteína IR y/o las isoformas IR-A y/o IR-B, encontradas en un tejido con el nivel de dicha proteína encontrado en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

Debido a que tanto los ácidos nucleicos como las proteínas se pueden analizar en la misma preparación biomolecular por *Liquid Tissue*TM es posible generar a partir de la misma muestra información adicional sobre el diagnóstico de la enfermedad y las decisiones de tratamiento con fármacos. Por ejemplo, la proteína IR es un receptor de tirosina-quinasa que es capaz de estimular el crecimiento celular no controlado (cáncer) por la activación de vías de proteínas señal de células específicas. Si el IR es expresado por ciertas células en niveles aumentados, cuando se analiza por SRM, los datos pueden proporcionar información sobre el estado de las células y se puede obtener su potencial de crecimiento descontrolado, resistencia potencial a fármacos y desarrollo de cánceres. Al mismo tiempo, se puede obtener información sobre el estado del gen IR y/o los ácidos nucleicos y las proteínas que codifica (por ejemplo, moléculas de mRNA y sus niveles de expresión o variaciones de empalme, particularmente las que conducen a las isoformas IR-A e IR-B) a partir de ácidos nucleicos presentes en la misma preparación biomolecular. Por ejemplo, se puede evaluar la información sobre el IR y/o sus isoformas, y/o una, dos, tres, cuatro o más proteínas adicionales examinando los ácidos nucleicos que codifican esas proteínas. Esos ácidos nucleicos se pueden examinar, por ejemplo, por uno o más. dos o más, o tres o más de: métodos de secuenciación, realización de análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción, identificación de deleciones, inserciones y/o determinación de la presencia de mutaciones incluyendo, aunque sin limitación, polimorfismos, transiciones y/o transversiones de un solo par de bases.

Lista de secuencias

- <110> Expression Pathology Inc
- <120> Ensayo de SRM/MRM para la proteína receptor de insulina
- <130> 01152.8029.WO00
- <150> US 61/585,202
- <151> 2012-01-10
- <160> 5
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT

ES 2 676 829 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Phe Glu Asp Tyr Leu His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Pro Ser
1 5 10 15

Arg Lys

10 <210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Phe Glu Asp Tyr Leu His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Pro Ser
1 5 10 15

15 Arg

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 4

Thr Phe Glu Asp Tyr Leu His Asn Val Val Phe Val Pro Arg Lys
1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Phe Glu Asp Tyr Leu His Asn Val Val Phe Val Pro Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para medir el nivel de la proteína receptor de insulina (IR) y/o sus isoformas IR-A y/o IR-B, en una muestra biológica humana de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, en donde los péptidos fragmentos del IR se seleccionan del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5; y calcular el nivel de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B en dicha muestra; y en donde 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 producto de digestión de proteínas antes de detectar y cuantificar la cantidad de dichos uno o más péptidos fragmentos del IR, en donde preferiblemente dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de líquidos, cromatografía de líquidos en fase nano-inversa, cromatografía de líquidos de alta resolución y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.
- 15 **3.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión por proteasa.
- 20 **4.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión por tripsina.
- 25 **5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas con trampa de iones, espectrometría de masas con cuadrupolo triple, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI, y/o espectrometría de masas con tiempo de vuelo, en donde preferiblemente el modo de espectrometría de masas usado es monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), monitorización de reacciones múltiples (MRM), y/o monitorización de reacciones seleccionadas múltiples (mSRM) o cualquiera de sus combinaciones.
- 30 **6.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el tejido es tejido incrustado en parafina.
- 35 **7.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el tejido se obtuvo de un tumor.
- 40 **8.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la cuantificación del péptido fragmento del IR comprende comparar una cantidad de dichos uno o más péptidos fragmentos del IR en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento del IR en una muestra biológica diferente y separada.
- 45 **9.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cuantificación de uno o más péptidos fragmentos del IR comprende determinar la cantidad de cada uno de los péptidos fragmentos en una muestra biológica por comparación con una cantidad conocida de un péptido patrón interno añadido, en donde cada uno de los péptidos fragmentos del IR en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos, y en donde el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente .
- 50 **10.** El método de la reivindicación 9, en donde el péptido patrón interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos pesados estables seleccionados de ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o sus combinaciones.
- 11.** El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la detección y cuantificación de la cantidad de dichos uno o más péptidos fragmentos del IR en el producto de digestión de proteínas indica la presencia de la proteína IR, IR-A y/o IR-B, y una asociación con cáncer en un paciente o sujeto.
- 12.** El método de la reivindicación 11, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer y más preferiblemente en donde la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de uno o más péptidos fragmentos del IR, o la cantidad de dicha proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos procedentes de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio /grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 13.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además seleccionar para un paciente o sujeto del que se obtuvo una muestra biológica un tratamiento basado en la presencia, ausencia, o cantidad de dichos uno o más péptidos fragmentos del IR o la cantidad de la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B, dirigiéndose preferiblemente el tratamiento a las células cancerosas que expresan la proteína IR, la isoforma IR-A y/o la isoforma IR-B.