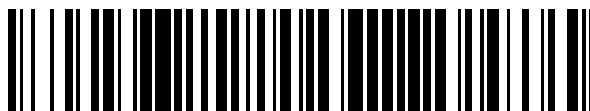


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 427**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011** **E 16195288 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 3144394**

54 Título: **Análisis cuantitativo de formas truncadas de HER2 por la técnica SRM/MRM**

30 Prioridad:

08.12.2010 US 421206 P

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

10.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KRIZMAN, DAVID B.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 719 427 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

Análisis cuantitativo de formas truncadas de HER2 por la técnica SRM/MRM

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de proteína Her2 en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de una muestra biológica de tejido fijado con formalina.

Introducción

10 Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína Her2 de longitud completa (también conocida como el protooncogén Neu, c-ErbB-2, receptor de superficie celular de tipo tirosina quinasa HER2, p185erbB2 o CD340). La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en un análisis cuantitativo por Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM) basado en espectrometría de masas, que también se puede denominar análisis cuantitativo por Monitorización de Reacción Múltiple (MRM), en lo sucesivo análisis cuantitativo SRM/MRM.

15 Este análisis cuantitativo SRM/MRM se puede usar para detectar la presencia y medir cuantitativamente la cantidad de la proteína Her2 de longitud completa y al mismo tiempo detectar y medir cuantitativamente la cantidad de una versión truncada de la proteína Her2 de longitud completa en muestras biológicas. Este análisis cuantitativo es útil para determinar si la proteína Her2 dentro de las células cancerosas está en forma de longitud completa o truncada y puede llevarse a cabo directamente en células obtenidas de tejido de pacientes con cáncer, como por ejemplo tejido de cáncer fijado con formalina. Este análisis cuantitativo SRM/MRM es muy importante para los pacientes con cáncer individuales porque se pueden usar diferentes agentes terapéuticos y estrategias de tratamiento para tratar la enfermedad de un paciente con un cáncer en particular en función de: 1) qué forma de la proteína Her2 (de longitud completa o truncada) se expresa en su cáncer particular, y 2) las cantidades absolutas y relativas de cada forma (la proporción de Her2 de longitud completa a truncada) presentes en sus células cancerosas. Por lo tanto, se pueden tomar decisiones de tratamiento óptimas sobre un paciente con cáncer individual según el conocimiento que este análisis cuantitativo SRM/MRM proporciona para las células cancerosas de ese paciente.

25 El documento WO 2008/097229 A1 se relaciona con un método para la detección de HER-2 en una muestra biológica utilizando espectrometría de masas, en donde se detecta un péptido fragmento de HER-2 libre de cisteína.

La publicación Adam PJ et al. (JBC papers in press, 1 de enero de 2002, pp. 1-60) informa sobre un análisis proteómico completo de las membranas celulares del cáncer de mama que revela proteínas únicas con funciones potenciales en el cáncer clínico.

30 La publicación Troise F et al. (FEBS Journal 278, (2011): 1156-1166) informa sobre un novedoso epítipo de ErbB2 dirigido por inmunosagentes antitumorales humanos.

El documento EP 1 568 373 A3 se relaciona con la inducción de la respuesta inmunitaria celular a HER2/neu utilizando composiciones de péptidos y ácidos nucleicos.

35 La publicación Huang Y et al. (Clinical Immunology 111 (2004) 202-209) informa sobre un método de alto rendimiento de proteo-genómica para identificar objetivos de anticuerpos asociados con enfermedades malignas.

Sumario de la invención

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

40 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de proteína Her2 en un producto de digestión de la proteína preparado a partir de una muestra biológica de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar un péptido de Her2 en dicho producto de digestión de la proteína preparada a partir de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína Her2 en dicha muestra, en donde dicho péptido es el péptido de SEQ ID NO: 7 y en donde dicho nivel es un nivel absoluto.

45 En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión de proteínas antes de detectar dichos péptidos.

En una realización, dicho producto de digestión de la proteína comprende un producto de digestión con proteasa o un producto de digestión con tripsina.

En una realización, la muestra biológica se obtiene a partir de un tumor.

50 En una realización, la cuantificación del péptido fragmento de Her2 comprende comparar la cantidad de dicho péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento de Her2 en una muestra

biológica diferente y separada.

En una realización, la cuantificación del péptido fragmento de Her2 comprende determinar la cantidad de dicho péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido en cantidad conocida, en donde tanto el péptido nativo en la muestra biológica como el péptido patrón interno corresponden a la misma secuencia de aminoácidos.

En una realización, la detección y cuantificación del péptido fragmento de Her2 en el producto de digestión de la proteína indica la presencia de la proteína Her2 y una asociación con el cáncer en el sujeto.

En una realización, el método comprende además correlacionar una cantidad detectada y cuantificada del péptido fragmento de Her2 con la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.

En una realización, el método comprende además seleccionar un tratamiento para el sujeto basándose en la presencia, ausencia o niveles cuantificados de dicho péptido fragmento de Her2 en el producto de digestión de proteínas.

En una realización, el método comprende además seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico dirigido específicamente a la proteína Her2 para su administración al sujeto, en donde la decisión de tratamiento sobre qué agente y qué cantidad de agente se utiliza para el tratamiento se basa en los niveles específicos de proteína Her2 en la muestra biológica.

En una realización, dicho agente terapéutico es un agente que se une específicamente a la proteína Her2 e inhibe su actividad biológica.

En una realización, dicho agente terapéutico es herceptin, trastuzumab o lapatinib.

Descripción detallada

Se proporcionan diez (10) péptidos específicos a partir de la proteína Her2 unida a la membrana celular y se describen las características particulares de los péptidos. También se proporciona un análisis cuantitativo de diagnóstico útil para determinar la presencia y la cantidad (en comparación con la cantidad de Her2 de longitud completa) de versiones truncadas de la proteína Her2 de longitud completa en células obtenidas a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE). Muchos péptidos se obtienen a partir del dominio intracelular (ICD) de la proteína Her2 de longitud completa, mientras que otros muchos se derivan del dominio extracelular (ECD) de la proteína Her2 de longitud completa. Los péptidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

ID SEQ:	Secuencia peptídica	Ubicación
SEQ ID NO: 1	SLTEILK	Dominio extracelular
SEQ ID NO: 2	GGVLIQR	Dominio extracelular
SEQ ID NO: 3	VLQGLPR	Dominio extracelular
SEQ ID NO: 4	LPASPETHLDMLR	Dominio extracelular
SEQ ID NO: 5	NNQLALTLIDTNR	Dominio extracelular
SEQ ID NO: 6	GIWIPDGENVK	Dominio intracelular
SEQ ID NO: 7	ELVSEFSR	Dominio intracelular
SEQ ID NO: 8	FWIQNEDLGASPLDSTFYR	Dominio intracelular
SEQ ID NO: 9	SGGGDLTLGLEPSEEEAPR	Dominio intracelular
SEQ ID NO: 10	GLQSLPTHDPSPQLQR	Dominio intracelular

Se ha determinado ventajosamente que estos péptidos están optimizados para el análisis de proteínas por espectrometría de masas y para su uso en un análisis cuantitativo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. Más específicamente, este análisis cuantitativo SRM/MRM puede medir cualquier combinación de 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 estos péptidos directamente en muestras complejas de lisado de proteínas preparadas a partir de células conseguidas a partir de muestras de tejido de pacientes, tal como tejido de paciente de cáncer fijado con formalina. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se mide al menos un péptido intracelular y uno extracelular. En otra realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se mide cualquier combinación de uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más péptidos intracelulares y uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más péptidos extracelulares. Midiendo al menos uno o más péptidos intracelulares y uno o más péptidos extracelulares, se puede determinar la cantidad o proporción de diversas formas del receptor Her2.

Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de tejido fijado con formalina se describen en la patente de EE.UU. N° 7,473,532. Los métodos descritos en la patente de EE.UU. N° 7,473,532 pueden llevarse a cabo convenientemente utilizando reactivos de tejido líquido y el protocolo disponible de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína Her2, preparado por ejemplo por digestión con una proteasa de especificidad conocida (*p.ej.* tripsina), se puede usar como informante suplente para determinar la abundancia de proteína Her2 en una muestra utilizando un análisis cuantitativo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De manera similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contiene un resto de aminoácido en un sitio que se sabe que podría modificarse potencialmente en la proteína Her2 también puede usarse potencialmente para analizar cuantitativamente el grado de modificación de la proteína Her2 en una muestra. Sin embargo, sorprendentemente, se ha encontrado que muchas de las numerosas secuencias peptídicas potenciales de la proteína Her2 son inadecuadas o ineficaces para el uso en análisis cuantitativos SRM/MRM basados en espectrometría de masas. Los péptidos son, por ejemplo, difíciles de detectar por espectrometría de masas, o son inestables en las condiciones usadas para obtener los péptidos de la proteína madre. Se ha encontrado que especialmente este es el caso cuando se analizan lisados de proteínas preparados a partir de tejido fijado con formalina utilizando el protocolo Liquid Tissue proporcionado en la patente de EE.UU. N° 7,473,532. El protocolo y los reactivos Liquid Tissue son capaces de preparar péptidos a partir de tejido embebido en parafina y fijado con formalina para el análisis de espectrometría de masas sometiendo el tejido a las siguientes etapas experimentales. Primero, el tejido se coloca en un tubo que contiene un tampón donde el tejido se calienta en el tampón durante un período prolongado de tiempo a temperaturas elevadas. El tampón es un tampón neutro, un tampón basado en Tris o un tampón que contiene un detergente, y ventajosamente es un tampón que no interfiere con el análisis espectrométrico de masas. A continuación, el tejido se trata con una o más proteasas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, tripsina, quimotripsina y/o pepsina. Inesperadamente, se encontró que era necesario identificar experimentalmente péptidos candidatos modificados y no modificados en lisados de tejido líquido reales para desarrollar un análisis cuantitativo SRM/MRM confiable y preciso para la proteína Her2. En particular, se encontró que muchos péptidos trípticos de la proteína Her2 no podían detectarse eficazmente o en absoluto en un lisado Liquid Tissue de tejido embebido en parafina fijado con formalina. En consecuencia, los péptidos de la proteína Her2 que pueden detectarse en un lisado Liquid Tissue preparado a partir de una muestra de tejido fijado con formalina son los péptidos para los cuales se pueden desarrollar análisis cuantitativos de SRM/MRM para determinar versiones de longitud completa o truncadas de la proteína Her2 en una muestra biológica.

La forma más amplia y ventajosamente disponible de tejidos procedentes de tejidos de pacientes con cáncer es tejido embebido en parafina, fijado con formalina. La fijación con formaldehído/formalina de tejido extirpado quirúrgicamente es con diferencia el método más común para preservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada en la práctica clásica de patología. Las disoluciones acuosas de formaldehído se denominan formalina. Formalina "100%" consiste en una disolución 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 la que se conserva el tejido es sumergir todo el tejido durante prolongados períodos de tiempo (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra al 10%, seguido de la inclusión del tejido entero fijo en cera de parafina para su almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Por lo tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido canceroso fijado con formalina serán los métodos más aceptados y más utilizados para el análisis del tejido del paciente con cáncer.

Los resultados del análisis cuantitativo SRM/MRM se pueden usar para correlacionar los niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína Her2 de longitud completa y la presencia de formas truncadas de la proteína Her2 de longitud completa dentro del cáncer específico del paciente del cual se recogió y conservó el tejido. Esto no solo proporciona información de diagnóstico sobre el cáncer, sino que también permite que un médico u otro profesional médico determine la terapia adecuada para el paciente. Un análisis cuantitativo de este tipo 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 *análisis cuantitativo de diagnóstico complementario*. Por ejemplo, un análisis cuantitativo de este tipo puede diseñarse para diagnosticar la etapa o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que un paciente tiene más probabilidades de responder. La identificación de formas específicas de proteína Her2 truncada no es importante para este análisis cuantitativo. El hecho de que el truncamiento de Her2 es responsable de la resistencia a los fármacos que inhiben la actividad de la proteína Her2, y la capacidad de detectar y cuantificar el grado de truncamiento permite una predicción precisa de si un cáncer puede o no ser resistente a los antagonistas de Her2.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar mediante el método de espectrometría de masas por monitorización de reacción seleccionada. En este método, la detección de dos o más péptidos de la lista en la Tabla 1, donde los péptidos identifican tanto el ICD como el ECD en un análisis cuantitativo MRM/SRM de un lisado de tejido líquido preparado a partir de tejido FFPE, indica la presencia de la proteína Her2 de longitud completa en las células obtenidas de tejido FFPE. A la inversa, la ausencia de uno o más péptidos de la lista en la Tabla 1 que se obtienen específicamente a partir del ECD, con la detección simultánea del uno o más péptidos del ICD, indica que la proteína Her2 está presente en forma truncada. Además, una reducción en la cantidad cuantitativa de la señal MRM/SRM del péptido, del uno o más péptidos ECD en comparación con la señal MRM/SRM del uno o más péptidos ICD (la proporción) indica al menos la presencia de una versión o más versiones truncadas de la proteína Her2 y la proporción de señales del péptido ECD a señales del péptido ICD indica la proporción de proteína Her2 truncada a proteína Her2 de longitud completa. Los métodos se realizan directamente sobre células cancerosas obtenidas a partir del tejido canceroso del paciente, lo más preferiblemente por el método de microdissección del tejido, y son importantes para el tratamiento del cáncer porque diferentes reactivos terapéuticos interactúan e inactivan las formas truncadas y de longitud completa de la proteína Her2, respectivamente. Por consiguiente, determinar si la proteína Her2 está presente en una forma de longitud completa y/o en una forma truncada en las células cancerosas de un paciente, permite seleccionar uno o más agentes terapéuticos apropiados para administrar al paciente con el fin de matar las células cancerosas restantes en el paciente.

La detección de péptidos y la determinación de los niveles cuantitativos de estos péptidos de Her2 se determinan mediante espectrometría de masas mediante la metodología SRM/MRM, con la que se determina el área del pico cromatográfico característico de SRM/MRM de cada péptido dentro de una mezcla compleja de péptidos presente en un lisado Liquid Tissue. Los niveles cuantitativos de la proteína Her2 se determinan después mediante la metodología SRM/MRM, por lo que el área del pico cromatográfico característico de SRM/MRM de cada uno de los péptidos individuales de la proteína Her2 en una muestra biológica se compara con el área del pico cromatográfico característico de SRM/MRM de una cantidad conocida de un patrón interno "enriquecido" para cada uno de los péptidos individuales. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido de Her2 exacto que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Dichos patrones internos marcados con isótopos se sintetizan de manera que el análisis de espectrometría de masas genera un pico cromatográfico característico de SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinto del pico cromatográfico característico del péptido de Her2 nativo y que se puede usar como un pico comparativo. Por lo tanto, cuando el patrón interno se enriquece en cantidades conocidas en una preparación de proteína o péptido de una muestra biológica y se analiza por espectrometría de masas, el área del pico cromatográfico característico de SRM/MRM del péptido nativo se compara con el área del pico cromatográfico característico de SRM/MRM del péptido patrón interno, y esta comparación numérica indica la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de proteína original de la muestra biológica. Los datos cuantitativos para los fragmentos de péptidos se muestran según la cantidad de proteína analizada por muestra.

Para desarrollar el análisis cuantitativo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína Her2, el espectrómetro de masas necesita utilizar información adicional más allá de la simple secuencia de péptidos. Esa información adicional es importante para dirigir e instruir al espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo) para realizar el análisis cuantitativo correcto y enfocado de un péptido diana específico. Una consideración importante al realizar un análisis cuantitativo SRM/MRM es que dicho análisis cuantitativo puede realizarse de manera efectiva en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Ese 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 de todas las proteínas contenidas en una célula. La información adicional proporciona al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo las directivas correctas para permitir el análisis de un único péptido diana aislado dentro de un lisado de proteínas muy complejo que puede constar de cientos de miles a millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas en una célula. Aunque los análisis cuantitativos SRM/MRM se pueden desarrollar y realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluido un MALDI, una trampa de iones o un triple cuadrupolo, actualmente la plataforma de instrumentos más ventajosa para el análisis cuantitativo SRM/MRM, a menudo se considera una plataforma de instrumentos de triple cuadrupolo. La información adicional sobre los péptidos diana en general, y aproximadamente tres (3) péptidos específicos de Her2, puede incluir uno o más de la masa mono isotópica de cada péptido, su estado de carga precursora, el valor m/z precursor, los iones de transición m/z , y el tipo de ion de cada ion de transición. La información adicional necesaria como se describe para los diez (10) péptidos de Her2 se muestra con un ejemplo en la Tabla 2, pero también es necesaria para los otros péptidos contenidos en la Tabla 1, y esta información está implícita para cada uno de los otros péptidos listados en la Tabla 1 a modo de ejemplo de los tres (3) péptidos en la Tabla 2.

Tabla 2

ID SEQ	Secuencia peptídica	Masa monoisotópica	Estado de carga precursora	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de Ion
SEQ ID NO: 9	SGGGDLTLGLEPSEEEAPR	1912,901	2	957,458	914,421	y8
			2	957,458	1043,464	y9
			2	957,458	1213,569	y11
SEQ ID NO: 4	LPASPETHLDMLR	1478,755	3	493,925	534,27	y4
			3	493,925	556,282	y9
			3	493,925	635,316	y11
			3	493,925	647,354	y5
			3	493,925	784,413	y6
SEQ ID NO: 5	NNQLALTLIDTNR	1484,795	2	743,404	832,452	y7
			2	743,404	945,536	78
			2	743,404	1016,573	y9

La Figura 1 muestra los resultados de un análisis cuantitativo SRM/MRM realizado en un lisado Liquid Tissue de una línea celular que se ha fijado con formalina y a partir de la cual se ha preparado un lisado Liquid Tissue. Los resultados muestran la capacidad para detectar y cuantificar dos (2) péptidos del dominio extracelular de la proteína Her2 de longitud completa y para detectar y cuantificar un (1) péptido del dominio intracelular de la proteína Her2 de longitud completa. Los datos del análisis cuantitativo indican la presencia de picos cromatográficos característicos de SRM/MRM tanto para el patrón interno como para los péptidos endógenos para cada uno de los tres (3) péptidos en la muestra de tejido líquido preparada a partir de la línea celular fijada con formalina. Este análisis cuantitativo SRM/MRM se desarrolló para la cuantificación de la proteína Her2 y la determinación de la presencia de versiones truncadas de la proteína Her2 en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo utilizando la información especificada en las Tablas 1 y 2.

Ciertas realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cromatografía líquida en fase nano-inversa, cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el producto de digestión de proteínas de la muestra biológica se prepara mediante el protocolo Liquid Tissue.

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

En una realización de la invención tal como se define en las reivindicaciones, el modo de espectrometría de masas usado es Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM), Monitorización de Reacción Múltiple (MRM), y/o Monitorización de Reacción Seleccionada múltiple (mSRM).

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

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

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

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

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

- 5 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método comprende además detectar y cuantificar todos los diez (10) péptidos fragmentos de Her2.

- 10 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la cuantificación de los diez (10) péptidos fragmentos de Her2 comprende comparar una cantidad de cada péptido fragmento de Her2 correspondiente a una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 8 a aproximadamente 45 restos de aminoácidos de Her2 como se muestra en 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 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica diferente y separada.

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

- 15 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el péptido patrón interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados de ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o combinaciones de los mismos.

- 20 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el agente terapéutico incluye los diseñados para unirse específicamente a, e inhibir, la proteína Her2 de longitud completa o las versiones truncadas de la proteína Her2 y su actividad biológica, e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los fármacos herceptin, trastuzumab y lapatinib.

- 25 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la detección y cuantificación del nivel de proteína Her2 se puede combinar con la detección y cuantificación de otros péptidos de otras muchas proteínas, de modo que la decisión de tratamiento sobre qué agente y qué cantidad de agente se utiliza para el tratamiento se basa en niveles específicos del péptido fragmento de Her2 en combinación con otros péptidos/proteínas en la muestra biológica.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la muestra biológica es tejido tumoral fijado con formalina que se ha procesado para el análisis cuantitativo de los péptidos fragmentos de Her2 modificados o no modificados por el protocolo y los reactivos Liquid Tissue.

- 30 Se describe una composición que comprende 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 aislados de las SEQ ID NOs: 1-10.

También se describe una composición que comprende:

- (i) uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más, péptidos intracelulares de Her2; y
(ii) uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más péptidos extracelulares de Her2, en donde dichos péptidos intracelulares y extracelulares se seleccionan de péptidos que tienen la secuencia de las SEQ ID NOs: 1-10.

Dicha composición puede estar libre o sustancialmente libre de otros péptidos derivados de Her2.

Dichos péptidos pueden ser péptidos patrón interno marcados isotópicamente que comprenden uno o más, dos o más, o tres o más, isótopos estables pesados seleccionados de ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o combinaciones de los mismos.

- 40 Dicha composición puede ser sustancialmente pura o libre de otros componentes celulares seleccionados de cualquier combinación de otras proteínas, membranas, lípidos y ácidos nucleicos.

Dichos péptidos pueden ser péptidos patrón internos marcados isotópicamente que comprenden uno o más, dos o más, o tres o más, isótopos estables pesados seleccionados de ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o combinaciones de los mismos.

Listado de secuencias

- 45 <110> Expression Pathology Inc

<120> Análisis cuantitativo de formas truncadas de HER2 por la técnica SRM/MRM

- 50 <130> E 10026 EP/D-I

<150> 61/421,206
 <151> 2010-12-08
 5 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
 15 1 5
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
 1 5
 25 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 3
 Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg
 1 5
 35 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 4
 Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg
 1 5 10
 50 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 6
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys
 1 5 10
 60 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 719 427 T3

```

<400> 7
Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg
1           5

5  <210> 8
    <211> 21
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

10 <400> 8
    Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp
    1           5           10           15

        Ser Thr Phe Tyr Arg
            20

15 <210> 9
    <211> 19
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 9
    Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu
    1           5           10           15

        Ala Pro Arg

20 <210> 10
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

25 <400> 10
    Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg
    1           5           10           15

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir el nivel de proteína Her2 en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de una muestra biológica de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar un péptido de Her2 en dicho producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína Her2 en dicha muestra, en donde dicho péptido es el péptido de SEQ ID NO: 7 y en donde dicho nivel es un nivel absoluto.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión de proteínas antes de detectar dichos péptidos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con proteasa o un producto de digestión con tripsina.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la muestra biológica se obtiene a partir de un tumor.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la cuantificación del péptido fragmento de Her2 comprende comparar la cantidad de dicho péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica con la cantidad del mismo péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica diferente y separada.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la cuantificación del péptido fragmento de Her2 comprende determinar la cantidad de dicho péptido fragmento de Her2 en una muestra biológica mediante la comparación con un péptido patrón interno añadido en una cantidad conocida, en donde tanto el péptido nativo en la muestra biológica y el péptido patrón interno corresponden a la misma secuencia de aminoácidos.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la detección y cuantificación del péptido fragmento de Her2 en el producto de digestión de proteínas indica la presencia de la proteína Her2 y una asociación con el cáncer en el sujeto.
8. El método de la reivindicación 7, que comprende además correlacionar una cantidad detectada y cuantificada del péptido fragmento de Her2 con la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además seleccionar un tratamiento para el sujeto basado en la presencia, ausencia o niveles cuantificados de dicho péptido fragmento de Her2 en el producto de digestión de proteínas.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico dirigido específicamente a la proteína Her2 para su administración al sujeto, en donde la decisión de tratamiento sobre qué agente y qué cantidad de agente se usa para el tratamiento se basa en niveles específicos de la proteína Her2 en la muestra biológica.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho agente terapéutico es un agente que se une específicamente e inhibe la actividad biológica de la proteína Her2.
12. El método de la reivindicación 11, en donde dicho agente terapéutico es herceptin, trastuzumab o lapatinib.

Figura 1

