

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 867**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2011 PCT/US2011/067998**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2011 E 11852979 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2658868**

54 Título: **Análisis cuantitativo de la proteína Her3 mediante SRM/MRM**

30 Prioridad:

29.12.2010 US 201061428147 P

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

27.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 867 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 la proteína Her3 mediante SRM/MRM

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de proteína Tirosina Proteína Quinasa Receptora Her3 en una muestra biológica de tejido fijado con formalina.

Introducción

10 Se proporcionan péptidos específicos originados a partir de subsecuencias de la proteína Tirosina Proteína Quinasa Receptora erbB-3 y que se denominará Her3, y que también se conoce como proteína c-ErbB-3 similar a protooncogén, receptor de superficie celular Her3 de tipo tirosina quinasa y proteína ERBB3. La secuencia peptídica y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en análisis cuantitativos de Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM) basados en espectrometría de masas, que también se conocen como análisis cuantitativos de Monitorización de Reacción Múltiple (MRM), en lo sucesivo, análisis cuantitativos SRM/MRM. Se describe el uso de uno de estos péptidos para el análisis cuantitativo SRM/MRM de la proteína Her3.

15 Este análisis cuantitativo SRM/MRM se puede usar para detectar la presencia y medir los niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína Her3 y, por lo tanto, proporciona un medio para medir la cantidad de la proteína Her3 en una preparación de proteína dada obtenida a partir de una muestra biológica por espectrometría de masas.

20 Los análisis cuantitativos SRM/MRM descritos aquí pueden medir péptidos de Her3 directamente en muestras complejas de lisados de proteínas preparadas a partir de células obtenidas de muestras de tejido del paciente, tales como un tejido fijado en formalina del paciente con cáncer. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de tejido fijado en formalina se describen en la patente de EE.UU nº 7,473,532. Los métodos descritos en esa patente pueden llevarse a cabo convenientemente utilizando reactivos y protocolos de Liquid Tissue™ disponibles en Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

25 La fijación en formaldehído/formalina de tejidos extraídos quirúrgicamente de pacientes con cáncer es el protocolo aceptado en la práctica de la patología. Como resultado, el tejido fijado en formaldehído/formalina y embebido en parafina es la forma más ampliamente disponible de tejidos de esos pacientes. La fijación en formaldehído/formalina emplea típicamente soluciones acuosas de formaldehído, conocidas como formalina. La formalina del "100%" consiste en una solución saturada de formaldehído (aproximadamente 40% de formaldehído en volumen o 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizante, generalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común de conservar el tejido es remojar todo el tejido durante largos periodos de tiempo (de 8 a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra al 10%, seguido de la inclusión del tejido entero así fijado en cera de parafina durante un largo periodo de almacenamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido canceroso fijado en formalina serán los métodos más aceptados y más utilizados para el análisis del tejido del paciente con cáncer.

35 Los resultados del análisis cuantitativo SRM/MRM se pueden usar para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína Her3 dentro de las muestras de tejido específicas (por ejemplo, muestra de tejido con cáncer) del paciente o sujeto del cual se recolectó y conservó el tejido (muestra biológica). Esto no solo proporciona información diagnóstica sobre el cáncer, sino que también permite que un médico u otro profesional de la salud 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 del paciente se denomina análisis de diagnóstico complementario (del inglés, *companion diagnostic*). Por ejemplo, puede diseñarse un análisis de este tipo para diagnosticar la etapa o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que un paciente tiene más probabilidades de responder.

45 Rush J et al. (Rush et al., Nature Biotechnology, vol. 23, No. 1, 1 de enero de 2005, pp. 94-101) informan sobre el perfil de inmunoafinidad de la fosforilación de tirosina en células cancerosas.

Los documentos US 2009/099340 A1 y WO 2006/106840 A1 se refieren a sitios de fosforilación identificados en proteínas y vías de transducción de señales y que subyacen tras el carcinoma humano, y proporcionan anticuerpos específicos para el sitio de fosforilación y péptidos marcados con isotopos pesados para la detección y cuantificación selectiva de dichos sitios y proteínas fosforiladas, respectivamente.

50 El documento WO 2010/083252 A2 se refiere a composiciones, métodos y kits para identificar biomoléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos expresados en una muestra biológica que están asociados con la presencia, desarrollo o progresión de una enfermedad, incluido el cáncer.

55 Kocher T et al. (Kocher T et al., Journal of Proteome Research, vol. 8, No. 10, 2 de octubre de 2009, págs. 4743-4752) informan sobre una proteómica cuantitativa de alta precisión utilizando iTRAQ en un Orbitrap LTQ que constituye un nuevo método de espectrometría de masas.

Taylor P et al. (Taylor P et al., European Journal of Cancer, Suppl. Vol. 7, No. 4, 1 de octubre de 2009, p. 31) informan sobre la detección de PP118 y la cuantificación de la fosforilación del receptor de EGF en secciones de tumores fijadas en formalina mediante espectrometría de masas con monitorización de reacción seleccionada/múltiple.

5 Niroshini J et al. (Niroshini J et al., Journal of Proteome Research, vol. 10, No. 2, 30 de noviembre de 2010, pp. 896-906) informa sobre el desarrollo y la validación de un método de extracción para la minería cuantitativa del proteoma de un tejido fijado en formalina y embebido en parafina para investigaciones de biomarcadores.

Becker K-F et al. (Becker K-F y otros, Journal of Pathology, vol. 211, No. 2, 1 de febrero de 2007) informe sobre el análisis cuantitativo de proteínas de tejidos fijados en formalina y sus implicaciones para la investigación clínica traslacional y el diagnóstico molecular a escala nanométrica.

10 **Compendio**

El problema que subyace tras la presente invención se resuelve mediante el objeto de la reivindicación independiente adjunta; las realizaciones preferidas se pueden extraer de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

15 Más específicamente, el problema que subyace tras la presente invención se resuelve mediante un método para medir el nivel de la proteína Tirosina Proteína Quinasa Receptora Her3 en una muestra biológica de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un péptido fragmento de Her3 en un producto de digestión de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas, en donde el fragmento peptídico de Her3 se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 10; y calcular el nivel de proteína Her3 en dicha muestra; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

20 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 fragmento peptídico de Her3, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, nano-cromatografía líquida en fase inversa, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

25 En una realización, dicho producto de digestión proteico comprende un producto de digestión con proteasa. En una realización, dicho producto de digestión proteico comprende una digestión con tripsina.

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

En una realización, el tejido se obtiene a partir de un tumor. En una realización, la cuantificación del fragmento peptídico de Her3 comprende comparar una cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica diferente y separada.

30 En una realización, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de Her3 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno agregado de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de Her3 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que posee la misma secuencia de aminoácidos, y en donde el péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente.

35 En una realización, la detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en el producto de digestión de la proteína indica la presencia de la proteína Her3 y una asociación con el cáncer en el sujeto.

En una realización, el método comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3, o del nivel de dicha proteína Her3, con el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer.

40 En una realización, la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3, o del nivel de dicha proteína Her3, con el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos entre otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer.

45 En una realización, el método comprende además seleccionar para el sujeto del que se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento para el sujeto basándose en la presencia, ausencia o cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 o el nivel de proteína Her3.

En una realización, un agente terapéutico y/o la cantidad de un agente terapéutico que se ha de administrar al paciente del que se obtuvo dicha muestra biológica, se basa en la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 o en el nivel de proteína Her3.

50 En una realización, dicho agente terapéutico se une a la proteína Her3 y/o inhibe su actividad biológica.

En una realización, dicho péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 2.

Los análisis cuantitativos aquí descritos miden niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos específicos no modificados de la proteína Her3 y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína Her3. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados y restos de aminoácidos glicosilados que están presentes en los péptidos.

5 Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína Her3 se determinan por la metodología SRM/MRM, por ejemplo, comparando las áreas de los picos distintivos en SRM/MRM (por ejemplo, el área del pico distintivo o la intensidad del ion del fragmento integrado) de un péptido individual de Her3 en diferentes muestras (por ejemplo, una muestra control y una muestra preparada a partir de un tejido del paciente). Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de picos distintivos de SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos de Her3, donde cada péptido tiene su propio pico
10 distintivo SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína Her3 en una muestra biológica, con el contenido de proteína Her3 en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta manera, la cantidad de un péptido particular, o péptidos, de la proteína Her3, y por lo tanto la cantidad de la proteína Her3, se determina con relación al mismo péptido Her3, o péptidos, en 2 o más muestras biológicas en las mismas condiciones experimentales. Además, la cuantificación relativa se puede determinar para un péptido dado, o péptidos, a partir de
15 la proteína Her3 dentro de una sola muestra, comparando el área del pico distintivo para ese péptido por la metodología SRM/MRM con el área del pico distintivo para otro péptido diferente, o péptidos, de una proteína diferente, o proteínas, dentro de la misma preparación de proteínas de la muestra biológica. De esta manera, la cantidad de un péptido particular de la proteína Her3, y por lo tanto la cantidad de la proteína Her3, se determinan una en relación con la otra dentro de la misma muestra. Estos enfoques generan la cuantificación de un péptido individual, o péptidos, de la
20 proteína Her3 con respecto a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades determinadas por el área de pico son relativas entre sí, independientemente de las cantidades absolutas peso a volumen o peso a peso del péptido Her3 en la preparación proteica de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre las áreas de los picos distintivos individuales entre diferentes muestras se normalizan a la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede realizar a través de muchos péptidos de múltiples proteínas y la proteína Her3 simultáneamente en una sola muestra y/o a través de muchas muestras para llegar a comprender mejor las cantidades relativas de las proteínas, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína Her3 se determinan, por ejemplo, mediante la metodología SRM/MRM, por la que el área del pico distintivo SRM/MRM de un péptido individual de la proteína Her3 en una muestra
30 biológica se compara con el área del pico distintivo SRM/MRM de una cantidad conocida de un patrón interno "añadido". En una realización, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido exacto de Her3 que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Dichos patrones internos marcados con isótopos se sintetizan de modo que el análisis de espectrometría de masas genera un pico distintivo SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinguible del pico distintivo del péptido de Her3 nativo y que puede usarse como un pico comparador. De este modo, cuando el patrón interno se añade en cantidades conocidas a una
35 preparación de proteína o péptido de una muestra biológica en cantidades conocidas y se analiza por espectrometría de masas, el área del pico distintivo SRM/MRM del péptido nativo se compara con el área del pico distintivo 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 absolutos para los fragmentos peptídicos se muestran según la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos y, por tanto, proteínas, simultáneamente en una sola muestra y/o en muchas muestras para comprender mejor las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

El método de análisis cuantitativo SRM/MRM se puede usar para facilitar el diagnóstico del estadio del cáncer, por
45 ejemplo, directamente en el tejido obtenido del paciente, tal como el tejido fijado en formalina, y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería más ventajoso para el tratamiento de ese paciente. El tejido canceroso que se extrae de un paciente ya sea mediante cirugía, como en el caso de la extirpación terapéutica de tumores parciales o completos, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de sospecha de enfermedad, se analiza para determinar si una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas están o no están presentes en el tejido de ese paciente. Además, el nivel de expresión de una proteína, o proteínas múltiples,
50 puede determinarse y compararse con un nivel "normal" o de referencia encontrado en tejido sano. Los niveles normales o de referencia de las proteínas encontradas en tejidos sanos pueden obtenerse a partir de, por ejemplo, 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 mediante el análisis de tejidos relevantes no afectados por el
55 cáncer.

Los análisis cuantitativos para determinar los niveles de proteína (por ejemplo, los niveles de Her3) también se pueden usar para diagnosticar el estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer mediante empleo de los niveles de Her3. 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 análisis cuantitativo SRM/MRM. El nivel o cantidad
60 puede normalizarse con relación al nivel total o cantidad 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 la cantidad de una proteína o péptido se puede determinar en base al volumen, expresado, por ejemplo, en concentración micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o la cantidad de proteína o péptido determinado por el

análisis cuantitativo SRM/MRM también se puede normalizar con relación al número de células analizadas. La información con respecto a Her3 se puede usar para ayudar a determinar el estadio o el grado de un cáncer mediante correlación del nivel de la proteína Her3 (o fragmentos peptídicos de la proteína Her3) con los niveles observados en los tejidos normales.

- 5 Una vez que se ha determinado el estadio y/o el grado, y/o las características de expresión de la proteína Her3 del cáncer, esa información se puede combinar con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente el tejido canceroso que se caracteriza, por ejemplo, por la expresión anómala de la proteína o proteínas (por ejemplo, Her3) que se analizaron. La información de un ensayo de proteína Her3 cotejada con una lista de agentes terapéuticos que se dirigen específicamente, por ejemplo, a la proteína Her3 o a las células/tejidos que expresan la proteína, define lo que se ha denominado un enfoque de *medicina personalizada* para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo descritos aquí forman la base de un enfoque de *medicina personalizada* mediante el uso de análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente para las decisiones de diagnóstico y tratamiento.

A continuación se describen ciertas realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones.

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

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

20 En una realización de la invención 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 Múltiples Reacciones Seleccionadas (mSRM).

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

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

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método comprende además cuantificar un fragmento peptídico de Her3 modificado o no modificado.

30 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la cuantificación del fragmento peptídico de Her3 comprende comparar una cantidad de uno o más péptidos fragmento de Her3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 8 a aproximadamente 45 restos de aminoácidos de Her3 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica diferente y separada.

35 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 ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la muestra biológica es tejido tumoral fijado en formalina que se ha procesado para cuantificar la cantidad de uno o más péptidos fragmento de Her3 modificados o no modificados que emplean el protocolo y reactivos de Liquid Tissue™.

40 También se describe una composición que comprende uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos en la Tabla 1 o anticuerpos contra estos.

La composición puede comprender el péptido de la Tabla 2 o un anticuerpo contra este.

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

45 Los 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 ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método comprende además evaluar y/o determinar el nivel (cantidad) o la secuencia de uno, dos, tres, cuatro o más ácidos nucleicos en dicho producto de digestión de proteína.

50 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dichos ácidos nucleicos tienen una longitud mayor que aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75 o 100 nucleótidos de longitud.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dichos ácidos nucleicos tienen una longitud

menor que aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 750, 1.000, 2.000, 4.000, 5.000, 7.500, 10.000, 15.000, o 20.000 nucleótidos de longitud.

- 5 En una realización de la invención tal como se define en las reivindicaciones, evaluar y/o determinar el nivel (cantidad) o la secuencia comprende, determinar ya sea la secuencia de nucleótidos de los ácidos nucleicos y/o una característica de los ácidos nucleicos por una cualquiera o más de: secuenciación de ácidos nucleicos, análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción, identificación por hibridación de ácidos nucleicos de una o más delecciones y/o inserciones, y/o determinación de la presencia de mutaciones, incluidas, entre otras, polimorfismos, transiciones y/o transversiones de un solo par de bases.

Descripción detallada

- 10 En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína Her3, preparado por ejemplo mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (*p.ej.* tripsina), se puede usar como péptido indicador sustituto para determinar la abundancia de proteína Her3 en una muestra utilizando un análisis cuantitativo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De manera similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contenga un resto de aminoácido en un sitio que se sabe que podría modificarse potencialmente en la proteína Her3 también podría usarse
15 para analizar el grado de modificación de la proteína Her3 en una muestra.

- Los péptidos fragmento de Her3 pueden generarse por diversos medios, incluido el uso del protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la patente de EE.UU. 7,473,532. El protocolo y los reactivos de Liquid Tissue™ son capaces de producir muestras peptídicas adecuadas para el análisis espectroscópico de masas a partir de tejido fijado en formalina y embebido en parafina por digestión proteolítica de las proteínas del tejido/muestra biológica. En el protocolo Liquid
20 Tissue™, el tejido/muestra biológica se mantiene a temperaturas elevadas en un tampón durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 80°C a aproximadamente 100°C durante un período de tiempo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas) para revertir 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, de manera ventajosa, es un tampón que no interfiere con el análisis espectrométrico de masas. A
25 continuación, el tejido/muestra biológica se trata con una o más proteasas, que incluyen, entre otras, tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para dañar el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y para licuar dicha muestra (por ejemplo, un período de tiempo de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37°C a 65°C). El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado biomolecular diluible, líquido y soluble.

- 30 Una vez que se preparan los lisados, los péptidos en las muestras pueden someterse a una variedad de técnicas que facilitan su análisis y medición por espectrometría de masas. En una realización, los péptidos se pueden separar mediante una técnica de afinidad, tal como, por ejemplo, una purificación de base inmunológica (*p. ej.*, cromatografía de inmutafinidad), cromatografía en medios selectivos de iones, o si los péptidos se modifican, mediante separación utilizando medios apropiados, tales como lectinas para la separación de péptidos modificados con carbohidratos. En
35 una realización, se emplea el método SISCAPA, que emplea la separación inmunológica de péptidos antes del análisis espectrométrico de masas. La técnica SISCAPA se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 7,632,686. En otras realizaciones, pueden usarse métodos de afinidad de las lectinas (por ejemplo, purificación por afinidad y/o cromatografía para separar péptidos de un lisado antes del análisis por espectrometría de masas. Los métodos para la separación de grupos de péptidos, incluidos los métodos basados en lectinas, se describen para ejemplo, en Geng
40 et al., J. Chromatography B, 752: 293-306 (2001). Las técnicas de cromatografía de inmutafinidad, las técnicas de afinidad de lectinas y otras formas de separación por afinidad y/o cromatografía (*p.ej.*, la fase inversa, la separación basada en el tamaño, el intercambio iónico pueden usarse 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 Her3 son inadecuadas o ineficaces para su uso en ensayos SRM/MRM basados en espectrometría de masas por razones que no son
45 evidentes de inmediato. En particular, se encontró que muchos péptidos trípticos de la proteína Her3 no podían detectarse de manera eficiente o en absoluto en un lisado de Liquid Tissue de tejido embebido en parafina y fijado en formalina. Como no fue posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo MRM/SRM, fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en los lisados reales de Liquid Tissue™ para
50 desarrollar un análisis cuantitativo SRM/MRM confiable y preciso para la proteína Her3. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían, por ejemplo, ser difíciles de detectar por espectrometría de masas, ya que no se ionizan bien o producen fragmentos distintos de otras proteínas, algunos péptidos también pueden tener una resolución fallida en la separación (por ejemplo, cromatografía líquida), o adherirse a artículos de vidrio o plástico. En consecuencia, los péptidos de la proteína Her3 que pueden ser detectados en un lisado de Liquid
55 Tissue (*p.ej.*, los péptidos en las Tablas 1 y 2) preparados a partir de una muestra de tejido fijado en formalina son los péptidos para los cuales se pueden emplear análisis cuantitativos SRM/MRM en un análisis cuantitativo de Her3 por SRM/MRM.

- Los péptidos Her3 encontrados en esta descripción (por ejemplo, las Tablas 1 y 2) se originaron a partir de la proteína Her3 mediante digestión con proteasas de todas las proteínas dentro de un lisado de Liquid Tissue™ complejo
60 preparado a partir de células obtenidas de tejido de cáncer fijado en formalina. A menos que se indique lo contrario,

5 en cada caso la proteasa era tripsina. El lisado de Liquid Tissue™ se analizó por espectrometría de masas para determinar los péptidos originados a partir de la proteína Her3 que se detectan y analizan por espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto específico preferido de péptidos para el análisis espectrométrico de masas se basa en: 1) la determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en los análisis de espectrometría de masas de lisados de Liquid Tissue™; y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y las condiciones experimentales utilizadas en la preparación de un lisado por Liquid Tissue™. Esta última propiedad se extiende no solo a la secuencia de aminoácidos del péptido, sino también a la capacidad de un resto de aminoácido modificado dentro de un péptido para sobrevivir en forma modificada durante la preparación de la muestra.

Tabla 1

Péptido	Secuencia peptídica
SEQ ID NO: 1	ELANEFTR
SEQ ID NO: 2	LAEVPDLLEK
SEQ ID NO: 3	IYISANR
SEQ ID NO: 4	AFQGPQHAPHVHY [Phosphoryl] AR
SEQ ID NO: 5	SLEATDSAFDNPDY [Phosphoryl] WHSR
SEQ ID NO: 6	DGGGPGGDY [Phosphoryl] AAMGACPASEQGY [Phosphoryl] EEMR
SEQ ID NO: 7	DGGGPGGDY [Phosphoryl] AAMGACPASEQGYEEMR
SEQ ID NO: 8	DGGGPGGDYAAMGACPASEQGY [Phosphoryl] EEMR
SEQ ID NO: 9	DGGGPGGDYAAMGACPASEQGYEEMR
SEQ ID NO: 10	ANDALQVLGLLFLSLAR

10

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa isotópica mono	Estado de carga del precursor	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
SEQ ID NO: 10	A NDA LQVLGLLFLSLAR	1700.96938	2	850.9879761	876.5296	y8
			2		989.6137	y9
			2		1088.682	y10
			2		1216.741	y11
			2		1329.825	y12
			2		1400.862	y13

15

20

25

Los lisados de proteínas de las células obtenidas directamente a partir de tejido fijado en formalina (formaldehído) se prepararon con los reactivos de Liquid Tissue™ y el protocolo que conlleva la recolección de células en un tubo de muestra a través de la microdissección del tejido, seguida del calentamiento de las células en el tampón de Liquid Tissue™ durante un período de tiempo prolongado. Una vez que la reticulación inducida por formalina ha sido afectada negativamente, los tejidos/células se digieren luego de manera predecible utilizando una proteasa, como por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a la tripsina proteasa. Cada lisado de proteína se convierte en una colección de péptidos mediante la digestión de polipéptidos intactos con la proteasa. Cada lisado de Liquid Tissue™ se analizó (p. ej., mediante espectrometría de masas con trampa de iones) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos, en los que los datos se presentaron como identificación de tantos péptidos como pudieron identificarse mediante espectrometría de masas de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteínas. Se emplea un espectrómetro de masas con trampa de iones u otra forma de espectrómetro de masas que sea capaz de realizar un perfilado global para la identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un solo lisado de proteína/péptidos complejos. Sin embargo, los espectrómetros de masas con trampa de iones pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para realizar el perfilado global de péptidos. Aunque el análisis cuantitativo SRM/MRM se puede desarrollar y realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluido un MALDI, una trampa de iones o un cuadrupolo triple, la plataforma de instrumentos que suele considerarse como la más ventajosa para el análisis

cuantitativo de SRM/MRM es una plataforma de instrumentos de triple cuadrupolo.

Una vez que se identificaron tantos péptidos como fue posible en un solo análisis de MS de un solo lisado en las condiciones empleadas, esa lista de péptidos se recopiló y se usó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados de Liquid Tissue™ y la gran lista de péptidos se agrupó en un solo conjunto de datos. Se puede considerar que ese tipo de conjunto de datos representa los péptidos que se pueden detectar en el tipo de muestra biológica que se analizó (después de la digestión con proteasa), y específicamente en un lisado de Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y por lo tanto incluye los péptidos para proteínas específicas, como por ejemplo la proteína Her3.

Los péptidos trípticos Her3 identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas del receptor Her3 incluyen uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, cada uno de los cuales se enumeran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados de Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido embebido en parafina y fijado en formalina. Por lo tanto, cada uno de los péptidos en la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más más de los péptidos enumerados en la Tabla 1, y particularmente las combinaciones con el péptido encontrado en la Tabla 2) son candidatos para su uso en el análisis cuantitativo SRM/MRM para la proteína Her3 en muestras biológicas humanas, incluso directamente en tejido de paciente fijado en formalina.

Los péptidos trípticos Her3 enumerados en la Tabla 1 incluyen aquellos detectados a partir de múltiples lisados de Liquid Tissue™ de múltiples tejidos diferentes fijados en formalina de órganos humanos diferentes, incluidos próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el análisis cuantitativo SRM/MRM de la proteína Her3 en tejido fijado en formalina. El análisis adicional de los datos de estos experimentos indicó que no se observa preferencia por ningún péptido específico de ningún sitio específico del órgano. Por lo tanto, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos SRM/MRM de la proteína Her3 en un lisado de Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado en formalina que se origina a partir de cualquier muestra biológica o de cualquier sitio de órgano en el cuerpo.

Los péptidos en la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (por ejemplo, uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más de esos péptidos) en la Tabla 1, y en particular las combinaciones con el péptido también encontrado en la Tabla 2, pueden analizarse mediante métodos que no dependen de la espectroscopia de masas, incluidos, entre otros, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información dirigida a la cantidad de péptido(s) (absoluta o relativa), la información se puede emplear en cualquiera de los métodos descritos en este documento, incluida la indicación (diagnóstico) de la presencia de cáncer en un sujeto, la determinación del estadio/grado/estado del cáncer, la provisión de un pronóstico, o la determinación de la terapia o el régimen de tratamiento para un sujeto/paciente.

La presente divulgación incluye composiciones que comprenden uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más de los péptidos en la Tabla 1. Las composiciones pueden comprender péptido en la Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden incluir uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más péptidos que están marcados isotópicamente. Cada uno de los péptidos puede marcarse con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en: ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , ^2H o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína Her3, estén o no marcados con isótopos, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). Es posible que las composiciones no contengan uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o nueve o más péptidos de Her3, y en particular péptidos que aparecen en Tabla 1 o Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales desecados o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosas), matrices o manchas de inmunotransferencias.

Una consideración importante al realizar un análisis cuantitativo SRM/MRM es el tipo de instrumento que puede emplearse en el análisis de los péptidos. 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 cuadrupolo triple, actualmente se considera que la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo de SRM/MRM es una plataforma de instrumentos 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 constar de cientos de miles a millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas en una célula.

Para implementar de la manera más eficiente el análisis cuantitativo SRM/MRM para cada péptido originado a partir de la proteína Her3, 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 triple cuadrupolo), para que realice el análisis correcto y enfocado de los péptidos dirigidos específicos, de modo que

el ensayo se pueda realizar de manera efectiva.

La información adicional sobre los péptidos diana en general, y sobre los péptidos específicos de Her3, puede incluir una 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. Se muestra información adicional sobre péptidos que se puede usar para desarrollar un análisis cuantitativo SRM/MRM para la proteína Her3, por ejemplo, para uno (1) de los péptidos de Her3 de la lista en la Tabla 1 y se muestra en la Tabla 2. Información adicional similar descrita para esta un (1) péptido de Her3 mostrado por ejemplo en la Tabla 2 puede prepararse, obtenerse y aplicarse al análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1.

El método que se describe a continuación se utilizó para: 1) identificar los péptidos candidatos de la proteína Her3 que se pueden usar para un análisis cuantitativo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína Her3, 2) desarrollar un análisis cuantitativo SRM/MRM individual, o varios, para péptidos diana de la proteína Her3 para correlacionar y 3) aplicar análisis cuantitativos para el diagnóstico del cáncer y/o la elección de la terapia óptima.

Método de ensayo

1. Identificación de péptidos fragmento candidatos para SRM/MRM para determinar la proteína Her3

a. Preparar un lisado de proteínas Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada en formalina utilizando una o varias proteasas (que pueden o no incluir tripsina) para digerir proteínas.

b. Analizar todos los fragmentos de proteínas en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína Her3, donde los fragmentos peptídicos individuales no contienen modificaciones peptídicas como las fosforilaciones o glicosilaciones.

c. Analizar todos los fragmentos de proteínas en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína Her3 que tienen modificaciones peptídicas como, por ejemplo, restos fosforilados o glicosilados.

d. Todos los péptidos generados por un método de digestión específico de la proteína Her3 de longitud completa, entera, potencialmente pueden medirse, pero los péptidos preferidos utilizados para el desarrollo del análisis cuantitativo SRM/MRM son aquellos que se identifican mediante espectrometría de masas directamente en un complejo lisado de proteína Liquid Tissue™ preparado a partir de una muestra biológica fijada en formalina.

e. Los péptidos que están específicamente modificados (fosforilados, glicosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan, y por lo tanto pueden detectarse, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina, se identifican como péptidos candidatos para determinar las modificaciones peptídicas de la proteína Her3.

2. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos de la proteína Her3

a. El análisis cuantitativo SRM/MRM en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple para péptidos de fragmentos individuales identificados en un lisado Liquid Tissue™ se aplica a péptidos de la proteína Her3.

i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento peptídico para las condiciones de cromatografía óptimas, que incluyen, entre otras, electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar, nanocromatografía líquida en fase inversa, cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía líquida de fase inversa.

ii. Determine la masa mono isotópica del péptido, el estado de carga precursora para cada péptido, el valor m/z precursor para cada péptido, los iones de transición m/z para cada péptido y el tipo de ion de cada ion de transición para cada fragmento peptídico con el fin de desarrollar un análisis cuantitativo SRM/MRM para cada péptido.

iii. Después se puede realizar el análisis cuantitativo SRM/MRM utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de cuadrupolo triple donde cada péptido tiene un pico distintivo SRM/MRM único y característico que define con precisión el análisis cuantitativo SRM/MRM único como se realiza en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

b. Realizar un análisis de SRM/MRM de modo que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína Her3 que se detecte, en función del área del pico distintivo único de SRM/MRM en un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, pueda indicar la cantidad relativa y la cantidad absoluta de la proteína en un lisado de proteína particular.

i. La cuantificación relativa se puede lograr mediante:

1. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína Her3 comparando el área del pico distintivo SRM/MRM de un péptido de Her3 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra

biológica fijada en formalina con el mismo área del pico distintivo SRM/MRM del mismo fragmento peptídico de Her3 en al menos un segundo, tercero, cuarto o más lisados de Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas en formalina.

5 2. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína Her3 comparando el área del pico distintivo SRM/MRM de un péptido de Her3 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formalina con las áreas de los picos distintivos SRM/MRM desarrolladas a partir de fragmentos peptídicos de otras proteínas, en otras muestras originadas a partir de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área del pico distintivo SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento peptídico se normaliza con relación a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

10 3. Determinación del aumento o la disminución de la presencia de la proteína Her3 comparando el área del pico distintivo SRM/MRM para un péptido Her3 dado con las áreas de los picos distintivos SRM/MRM de otros fragmentos peptídicos originados a partir de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada en formalina con el fin de normalizar los niveles cambiantes de la proteína Her3 con relación a los niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.

15 4. Estos ensayos pueden aplicarse tanto a fragmentos peptídicos no modificados como a fragmentos peptídicos modificados de la proteína Her3, donde las modificaciones incluyen pero no se limitan a 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.

20 ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área del pico distintivo SRM/MRM para un fragmento peptídico dado de la proteína Her3 en una muestra biológica individual con el área del pico distintivo SRM/MRM de un patrón interno de fragmento peptídico añadido al lisado de proteínas de la muestra biológica.

25 1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico de la proteína Her3 que se está interrogando. Este patrón se añade a una muestra en cantidades conocidas, y el área del pico distintivo SRM/MRM se puede determinar tanto para el patrón interno de fragmento peptídico como para el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de las áreas de ambos picos.

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

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

35 a. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína Her3 y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, como se entiende en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína Her3 al estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral del paciente.

40 b. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína Her3 y demostrar la correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en donde esta correlación ya se ha demostrado en este campo o se puede demostrar en el futuro a través de estudios de correlación a través de cohortes de pacientes y tejido de esos pacientes. Una vez que este análisis confirme las correlaciones previamente establecidas o las que se establecerán en el futuro, se puede utilizar el método de ensayo para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

45 La evaluación de los niveles de proteína Her3 en los tejidos según el análisis del tejido de un paciente, fijado en formalina, puede proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéuticamente relevante sobre cada paciente en particular. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el método es un método para medir el nivel de la proteína Her3 en una muestra biológica, comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de Her3, modificados o no modificados, en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína Her3 modificada o no modificada en dicha muestra; y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. En una realización relacionada de la invención como se define en las reivindicaciones, la cuantificación de uno o más fragmentos peptídicos de Her3 comprende determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos peptídicos de Her3 en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde cada uno de los fragmentos peptídicos de Her3 en la muestra biológica se comparan 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 estables pesados seleccionados de ¹⁸Oh, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos. De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, el método para medir el nivel de la proteína Her3 en una muestra biológica descrita en el presente documento (o fragmentos peptídicos como sustitutos de la misma) 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 Her3 pueden emplearse para determinar el estadio de diagnóstico/grado/estado de un cáncer mediante correlación (por ejemplo, comparación) del nivel de receptor Her3 encontrado en un tejido con el nivel de esa proteína encontrado en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

5 Debido a que tanto los ácidos nucleicos como las proteínas se pueden analizar a partir de la misma preparación biomolecular de Liquid Tissue, es posible generar información adicional sobre el diagnóstico de la enfermedad y las decisiones de tratamiento farmacológico a partir de la misma muestra. Por ejemplo, la proteína Her3 es un receptor de tirosina quinasa que es capaz de estimular el crecimiento celular descontrolado (cáncer) mediante la activación de rutas de proteínas de señal celular específicas. Si ciertas células expresan Her3 a niveles elevados, cuando se
10 analizan por SRM, los datos pueden proporcionar información sobre el estado de las células y su potencial de crecimiento descontrolado, la resistencia potencial al fármaco y el desarrollo de cánceres. Al mismo tiempo, la información sobre el estado del gen Her3 y/o los ácidos nucleicos y las proteínas que codifica (por ejemplo, las moléculas de ARNm y sus niveles de expresión o variaciones de empalme) se puede obtener a partir de los ácidos nucleicos presentes en la misma preparación biomolecular. Por ejemplo, la información sobre Her3 y/o una, dos, tres,
15 cuatro o más proteínas adicionales puede evaluarse mediante el examen de los ácidos nucleicos que codifican esas proteínas. Dichos ácidos nucleicos pueden examinarse, por ejemplo, mediante uno o más métodos de secuenciación, análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción, identificación de deleciones, inserciones y/o determinación de la presencia de mutaciones, incluidos, entre otros, polimorfismos de un solo par de bases, transiciones y/o transversiones.

20 **Listado de secuencias**

<110> Krizman, David
Thyparambil, Sheeno
Hembrough, Todd

<120> Análisis cuantitativo de proteína Her3 mediante SRM/MRM

25 <130> 01152.8021.WO00

<150> US 61/428,147

<151> 29/12/2011

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> péptido de Her3

<400> 1

Glu Leu Ala Asn Glu Phe Thr Arg

1 5

<210> 2

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de Her3

<400> 2

Leu Ala Glu Val Pro Asp Leu Leu Glu Lys

45 1 5 10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> péptido de Her3

<400> 3
 Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg
 1 5

<210> 4
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido de Her3

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 4
 Ala Phe Gln Gly Pro Gly His Gln Ala Pro His Val His Tyr Ala Arg
 1 5 10 15

15 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> péptido de Her3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> FOSFORILACIÓN

25 <400> 5
 Ser Leu Glu Ala Thr Asp Ser Ala Phe Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His
 1 5 10 15

Ser Arg

<210> 6
 <211> 26
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido de Her3

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 40 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 6
 Asp Gly Gly Gly Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Ala Met Gly Ala Cys Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Glu Gln Gly Tyr Glu Glu Met Arg
 20 25

45 <210> 7
 <211> 26
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de Her3

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 7

Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Ala	Met	Gly	Ala	Cys	Pro
1				5					10					15	

Ala	Ser	Glu	Gln	Gly	Tyr	Glu	Glu	Met	Arg
			20					25	

10 <210> 8

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> péptido de Her3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> FOSFORILACIÓN

20 <400> 8

Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Ala	Met	Gly	Ala	Cys	Pro
1				5					10					15	

Ala	Ser	Glu	Gln	Gly	Tyr	Glu	Glu	Met	Arg
			20					25	

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de Her3

<400> 9

Asp	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Ala	Met	Gly	Ala	Cys	Pro
1				5					10					15	

Ala	Ser	Glu	Gln	Gly	Tyr	Glu	Glu	Met	Arg
			20					25	

30 <210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> péptido de Her3

<400> 10

Ala	Asn	Asp	Ala	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Ala	Arg
1				5					10					15	

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para medir el nivel de la proteína tirosina-proteína quinasa receptora Her3 en una muestra biológica de tejido fijado en formalina, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de un fragmento peptídico de Her3 en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas, en el que el fragmento peptídico de Her3 se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 10; y calcular el nivel de proteína Her3 en dicha muestra; y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.
- 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 dicho fragmento peptídico de Her3, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, nano cromatografía líquida en fase inversa, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- 3.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho producto de digestión de proteínas comprende una digestión con proteasa.
- 15 **4.** El método de la reivindicación 3, en el que dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con tripsina.
- 5.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el tejido fijado en formalina es un tejido embebido en parafina.
- 6.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tejido se obtiene a partir de un tumor.
- 20 **7.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cuantificación del fragmento peptídico de Her3 comprende comparar una cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica diferente y separada.
- 8.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la cuantificación de dicho fragmento peptídico de Her3 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en una muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido de una cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de Her3 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.
- 25 **9.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 en el producto de digestión de proteína indica la presencia de proteína Her3 y una asociación con cáncer en el sujeto.
- 30 **10.** El método de la reivindicación 9, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3, o el nivel de dicha proteína Her3, con el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer.
- 11.** El método de la reivindicación 10, en el que la correlación de los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3, o el nivel de dicha proteína Her3 con el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio de diagnóstico/grado/estado del cáncer.
- 35 **12.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además seleccionar para el sujeto del que se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento para el sujeto en función de la presencia, ausencia o cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 o del nivel de proteína Her3.
- 40 **13.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que un agente terapéutico y/o una cantidad de un agente terapéutico que se va a administrar al paciente del que se obtuvo dicha muestra biológica, se basa en la cantidad de dicho fragmento peptídico de Her3 o en el nivel de proteína Her3.
- 14.** El método de la reivindicación 13, en el que dicho agente terapéutico se une a la proteína Her3 y/o inhibe su actividad biológica.
- 45 **15.** El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho péptido es el péptido de la SEQ ID NO: 2.