

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 326**

51 Int. Cl.:

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2011 PCT/US2011/067439**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2011 E 11853571 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2659267**

54 Título: **Ensayo SRM/MRM de proteína c-MET**

30 Prioridad:

27.12.2010 US 201061427396 P

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

25.03.2020

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:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 750 326 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo SRM/MRM de proteína c-MET

5 Campo

La presente invención está relacionada con un método para medir el nivel de la Proteína del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (cMET) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina.

10 Introducción

Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos denominada cMET, y también como del receptor HGF/SF, del protooncogén c-Met, del receptor del factor de dispersión y de la proteína tirosina cinasa Met. La secuencia peptídica y fragmentación/iones de transición para cada péptido son particularmente útiles en ensayos de Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM por sus siglas en inglés) basados en espectrometría de masas, que también pueden denominarse ensayos de Monitorización de Reacción Múltiple (MRM), en lo sucesivo denominados ensayos SRM/MRM. Se describe el uso de uno de estos péptidos para el análisis cuantitativo SRM/MRM de la proteína cMET.

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

25 Los ensayos SRM/MRM descritos en el presente documento pueden medir péptidos cMET directamente en muestras complejas de lisado de proteínas preparadas a partir de células obtenidas de muestras de tejidos de pacientes, tal como tejidos de pacientes con cáncer fijados con formalina. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de tejido fijado con formalina se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 7.473.532. Los métodos descritos en esa patente pueden llevarse a cabo convenientemente usando reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD).

30 La fijación en formaldehído/formalina de tejidos extirpados quirúrgicamente de pacientes con cáncer es la convención aceptada en la práctica de patología. Como resultado, el tejido embebido en parafina fijado con formaldehído/formalina es la forma de tejidos más ampliamente disponible de esos pacientes. La fijación en formaldehído/formalina generalmente emplea soluciones acuosas de formaldehído denominado formalina. La formalina al "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 estabilizador, generalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en la que se preserva el tejido es remojar todo el tejido durante largos períodos de tiempo (de 8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra al 10 %, seguido de embeber todo el tejido fijado en cera de parafina para almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Por lo tanto, los métodos analíticos moleculares para analizar tejido canceroso fijado con formalina serán los métodos más aceptados y más utilizados para el análisis de tejido de pacientes con cáncer.

45 Los resultados del ensayo SRM/MRM se pueden usar para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína cMET dentro de las muestras de tejidos específicas (por ejemplo, muestra de tejido canceroso) del paciente o sujeto de quien se recogió y conservó el tejido (muestra biológica). 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. Dicho ensayo que proporciona información diagnóstica y terapéuticamente importante sobre los niveles de expresión de proteínas en un tejido enfermo u otra muestra de paciente se denomina ensayo de *diagnóstico complementario*. Por ejemplo, dicho ensayo puede diseñarse para diagnosticar el estadio o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que es más probable que responda un paciente.

50 El documento WO 2009/141141 A1 está relacionado con un método para la determinación de un ensayo MRM o SRM para una proteína de interés, un péptido de interés o un grupo de proteínas/péptidos de interés o un proteoma completo.

55 El documento US 2004/009568 A1 está relacionado con la identificación, aislamiento, purificación y caracterización del dominio catalítico de la cinasa del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos humanos (hHGFR).

60 El documento WO 2010/053717 A1 está relacionado con métodos y composiciones para predecir la respuesta del paciente al tratamiento del cáncer utilizando los biomarcadores YAP-1, bcl-2, VEGF-c, c-met y claudina-4.

Sumario

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

5 Más específicamente, el problema se resuelve mediante un método para medir el nivel de la Proteína del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (cMET) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento de péptido cMET de la SEQ ID NO: 1 en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica humana usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína cMET en dicha muestra; y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto.

10 En una realización, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión de proteínas antes de detectar y/o cuantificar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET.

15 En una realización, dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con proteasas.

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

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

En una realización, el método comprende además cuantificar el fragmento de péptido cMET comprende comparar una cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento de péptido cMET en una muestra biológica diferente y separada.

25 En una realización, cuantificar dicho fragmento de péptido cMET comprende determinar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en una muestra biológica en comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que dicho fragmento de péptido cMET 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.

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

35 En una realización, detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en el producto de digestión de proteínas indica la presencia de proteína cMET y una asociación con el cáncer en el sujeto.

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

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

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

55 En una realización, el método comprende además seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para administrar al paciente del que se obtuvo dicha muestra biológica, en el que el agente terapéutico y/o la cantidad de agente terapéutico a administrar se basa en la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET o el nivel de proteína cMET.

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

60 Los ensayos descritos en el presente documento miden niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos no modificados específicos de la proteína cMET y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína cMET. Ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados y restos de aminoácidos glicosilados que están presentes en los péptidos.

65 Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína cMET se determinan mediante la metodología SRM/MRM, por ejemplo, mediante la comparación de áreas máximas de firma SRM/MRM (por ejemplo, área máxima de firma o intensidad de iones de fragmento integrado) de un péptido cMET individual en diferentes muestras (por ejemplo, un muestra de control y una muestra preparada a partir de tejido de un paciente). Como alternativa, es posible

comparar múltiples áreas máximas de firma SRM/MRM para múltiples péptidos de firma cMET, donde cada péptido tiene su propio pico de firma SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína cMET en una muestra biológica con el contenido de proteína cMET en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta manera, la cantidad de un péptido, o péptidos particulares, a partir de la proteína cMET, y por lo tanto la cantidad de la proteína cMET, se determina en relación con el mismo péptido o a los mismos péptidos cMET, a través de 2 o más muestras biológicas en las mismas condiciones experimentales. Además, la cuantificación relativa se puede determinar para un péptido o péptidos dados, a partir de la proteína cMET dentro de una sola muestra comparando el área máxima de firma para ese péptido mediante la metodología SRM/MRM con el área máxima de firma para otro péptido o péptidos diferentes, a partir de una proteína, o proteínas diferentes, dentro de la misma preparación de proteínas de la muestra biológica. De esta manera, la cantidad de un péptido particular a partir de la proteína cMET, y por lo tanto la cantidad de la proteína cMET, se determina uno con respecto a otro dentro de la misma muestra. Estos enfoques generan la cuantificación de un péptido, o péptidos individuales, a partir de la proteína cMET a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de las muestras en las que las cantidades determinadas por el área máxima son relativas entre sí, independientemente del peso absoluto a volumen o peso a peso del péptido cMET en la preparación de proteínas a partir de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre áreas máximas de firma 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 cMET simultáneamente en una sola muestra y/o en muchas muestras para obtener información sobre las cantidades relativas de proteínas, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína cMET se determinan mediante, por ejemplo, la metodología SRM/MRM por la cual el área máxima de firma SRM/MRM de un péptido individual de la proteína cMET en una muestra biológica se compara con el área máxima de firma SRM/MRM de una cantidad conocida de un patrón interno "añadido". En una realización, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido cMET exacto que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Tales patrones internos marcados con isótopos se sintetizan para que el análisis de espectrometría de masas genere un pico de firma SRM/MRM predecible y consistente que sea diferente y distinto del pico de firma del péptido cMET natural y que pueda usarse como un pico de comparación. Por lo tanto, cuando el patrón interno se añade en cantidades conocidas en una preparación de proteínas o péptidos a partir de una muestra biológica y se analiza por espectrometría de masas, el área máxima de firma SRM/MRM del péptido natural se compara con el área máxima de firma SRM/MRM del péptido patrón interno, y esta comparación numérica indica la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido natural presente en la preparación de proteína original de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para fragmentos de péptidos se muestran de acuerdo con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar en muchos péptidos y, por lo tanto, en proteínas, simultáneamente en una sola muestra y/o en muchas muestras para obtener información sobre las cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes enteras de muestras individuales.

El método de ensayo SRM/MRM se puede usar para ayudar al diagnóstico del estadio del cáncer, por ejemplo, directamente en el tejido derivado del paciente, tal como tejido fijado con formalina, y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería más ventajoso para su uso en el tratamiento de ese paciente. Se analiza tejido canceroso que se elimina de un paciente mediante cirugía, tal como para la extirpación terapéutica de tumores parciales o completos, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de sospecha de enfermedad, para determinar si una proteína o proteínas específicas y qué formas de proteínas están presentes en ese tejido del paciente. Por otro lado, el nivel de expresión de una proteína, o proteínas múltiples, puede determinarse y compararse con un nivel "normal" o de referencia que se encuentra en el tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas encontrados en tejido sano pueden derivar, por ejemplo, de tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Como alternativa, se pueden obtener niveles normales o de referencia para individuos con cáncer mediante el análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer.

Los ensayos de niveles de proteínas (por ejemplo, niveles de cMET) también se pueden usar para diagnosticar es estadio del cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer mediante el empleo de los niveles de cMET. 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 determinados por el ensayo SRM/MRM. El nivel o la cantidad pueden normalizarse para totalizar el nivel o la 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 cantidad de una proteína o péptido puede determinarse basándose en el volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o la cantidad de proteína o péptido según lo determinado por el ensayo SRM/MRM también se puede normalizar al número de células analizadas. La información sobre cMET se puede utilizar, por lo tanto, para ayudar a determinar es estadio o el grado de un cáncer al correlacionar el nivel de la proteína cMET (o fragmentos de péptidos de la proteína cMET) con los niveles observados en tejidos normales.

Una vez que se ha determinado el estadio y/o grado, y/o las características de expresión de la proteína cMET del cáncer, esa información se puede hacer coincidir con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente el tejido canceroso que se caracteriza por, por ejemplo, expresión anormal de la proteína o proteínas (p. ej., cMET) que se analizaron. Hacer coincidir la información de un ensayo de proteína

- 5 cMET con una lista de agentes terapéuticos que se dirigen específicamente, por ejemplo, a la proteína cMET 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 en el presente documento forman la base de un enfoque de *medicina personalizada* mediante el uso de análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente de decisiones de diagnóstico y tratamiento.
- 10 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, nano-cromatografía de líquidos en fase inversa, cromatografía de líquidos de alto rendimiento o cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa.
- 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™.
- 20 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con tripsina.
- 25 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 triple cuadrupolo, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI y/o espectrometría de masas de tiempo de vuelo.
- 30 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el modo de espectrometría de masas utilizado es Monitorización de Reacción Seleccionada (SRM), Monitorización de Reacción Múltiple (MRM) y/o Monitorización de Reacción Seleccionada Múltiple (mSRM).
- 35 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tejido es tejido embebido en parafina.
- 40 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tumor es un tumor primario.
- 45 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el tumor es un tumor secundario.
- 50 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, cuantificar el fragmento del péptido cMET comprende comparar una cantidad de un fragmento de péptido cMET que comprende una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 8 a aproximadamente 45 restos de aminoácidos de cMET como se muestra en la SEQ ID NO: 1 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento de péptido cMET en una muestra biológica diferente y separada.
- 55 También se divulga 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 diez o más de los péptidos en la Tabla 1 o anticuerpos de los mismos.
- 60 La composición puede comprender uno o dos de los péptidos de la Tabla 2 o anticuerpos de los mismos.
- 65 La composición puede ser sustancialmente pura o sin otros componentes celulares seleccionados de cualquier combinación de otras proteínas, membranas, lípidos y/o ácidos nucleicos.
- En una composición ejemplar, dichos péptidos son péptidos patrones 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 o determinar el nivel (cantidad) o secuencia de uno, dos, tres o más ácidos nucleicos en dicho producto de digestión de proteínas.
- En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, los ácidos nucleicos codifican, uno cualquiera o más, dos cualquiera o más o los tres de cMet, IGF-1R, EGFR, o fragmentos de cualquiera de ellos, y/o son secuencias antisentido de uno cualquiera o más, dos cualquiera o más o los tres de cMet, IGF-1R, EGFR o fragmentos de cualquiera de ellos.
- En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, dichos fragmentos tienen independientemente una longitud mayor de aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 50 nucleótidos de longitud.
- En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, evaluar o determinar la secuencia comprende, determinar la secuencia de nucleótidos mediante uno o más métodos de secuenciación, realizar análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción, identificar deleciones, inserciones y/o determinar la presencia de mutaciones, incluidos, pero sin limitación, polimorfismos de un solo par de bases, transiciones y/o transversiones.

Descripción detallada

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

Los fragmentos de péptidos cMET pueden generarse por una variedad de medios, incluido el uso del protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la Patente de Estados Unidos 7.473.532. El protocolo Liquid Tissue™ y los reactivos son capaces de producir muestras de péptidos adecuadas para el análisis espectroscópico de masas a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina mediante digestión proteolítica de las proteínas en la muestra de tejido/biológica. En el protocolo Liquid Tissue™, el tejido /muestra biológica se calienta en un tampón durante un período prolongado de tiempo a temperaturas elevadas (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, ventajosamente, es un tampón que no interfiere con el análisis de espectrometría de masas. A continuación, la muestra de tejido/biológica se trata con una o más proteasas, incluidas, pero sin limitación, tripsina, quimiotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para alterar el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y 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 de biomoléculas líquido, soluble y diluible.

Una vez que los lisados están preparados, 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 pueden separarse mediante una técnica de afinidad, como por ejemplo una purificación basada en inmunología (p. ej., cromatografía de inmovilización, cromatografía sobre medios selectivos de iones, o si los péptidos se modifican, mediante separación usando medios apropiados, tales como lectinas para la separación de péptidos modificados con carbohidratos. En una realización, el método SISCAPA, que emplea la separación inmunológica de péptidos antes del análisis de espectrometría de masas. La técnica SISCAPA se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.632.686. En otras realizaciones, los métodos de afinidad por lectina (p. ej., la purificación y/o cromatografía por afinidad pueden usarse para separar los péptidos de un lisado antes del análisis por espectrometría de masas. Se describen métodos para la separación de grupos de péptidos, incluidos los métodos basados en lectina, por ejemplo, en Geng et al., J. Chromatography B, 752:293-306 (2001). Las técnicas de cromatografía por inmovilización, las técnicas de afinidad por lectina y otras formas de separación y/o cromatografía por afinidad (p. ej., fase inversa, separación basada en el tamaño, intercambio iónico) pueden usarse en cualquier combinación adecuada para facilitar el análisis de péptidos por espectrometría de masas.

Sorprendentemente, se descubrió que muchas posibles secuencias peptídicas de la proteína cMET son inadecuadas o ineficaces para su uso en ensayos SRM/MRM basados en espectrometría de masas por razones que no son evidentes de inmediato. En particular, se descubrió que muchos péptidos trípticos de la proteína cMet no podían detectarse de manera eficaz o en absoluto en un lisado de Liquid Tissue a partir de tejido fijado con formalina embebido en parafina. Como no fue posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo MRM/SRM, fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en lisados de Liquid Tissue™ reales para desarrollar un ensayo SRM/MRM confiable y preciso para la proteína cMET. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que algunos péptidos pueden, por ejemplo, ser difíciles de detectar por espectrometría de masas, ya que no se ionizan bien o producen fragmentos distintos de otras proteínas, los péptidos también pueden fallar al resolverse bien en la separación (por ejemplo, cromatografía de líquidos), o adherirse a artículos de vidrio o plástico. Por consiguiente, aquellos péptidos de la proteína cMet que pueden detectarse en un lisado de Liquid Tissue (por ejemplo, los péptidos en las Tablas 1 y 2) preparados a partir de una muestra de tejido fijada en formalina son los péptidos para los que pueden emplearse ensayos SRM/MRM en un ensayo SRM/MRM de cMET.

Los péptidos cMET encontrados en diversas realizaciones de la presente divulgación (por ejemplo, Tablas 1 y 2) derivaron de la proteína cMET mediante la digestión por proteasas de todas las proteínas dentro de un lisado complejo de Liquid Tissue™ preparado a partir de células obtenidas de tejido canceroso fijado con formalina. A menos que se indique otra cosa, en cada caso la proteasa fue tripsina. Después se analizó el lisado de Liquid Tissue™ por espectrometría de masas para determinar aquellos péptidos derivados de la proteína cMET que se detectan y analizan por espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto específico de péptidos preferido para el análisis por espectrometría de masas se basa en: 1) la determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en 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 de 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	SNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTK
SEQ ID NO: 2	ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFR
SEQ ID NO: 3	GHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVK
SEQ ID NO: 4	TKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFK
SEQ ID NO: 5	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQR
SEQ ID NO: 6	EVFNILQAAYVSKPGAQLAR
SEQ ID NO: 7	GDLTIANLGTSEGR
SEQ ID NO: 8	QIKDLGSELVR
SEQ ID NO: 9	FINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVR
SEQ ID NO: 10	ITDIGEVSQFLTEGIIMK
SEQ ID NO: 11	AFFMLDGILSK
SEQ ID NO: 12	NLNSVSVPR
SEQ ID NO: 13	TEFTTALQR

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia peptídica	Masa Isotópica Mono	Estado de Carga Precursora	Precursor m/z	Transición m/z	Tipo de ion
SEQ ID NO: 11	AFFMLDGILSK	1241,65986	2	621,333008	632,3608	y6
			2	621,333008	745,4449	y7
			2	621,333008	876,4854	y8
			2	621,333008	1023,554	y9
			2	621,333008	1170,622	y10
			2	621,333008	1241,659	y11
SEQ ID NO: 12	NLNSVSVPR	985,54252	2	493,273987	557,34	y5
			2	493,273987	644,3721	y6
			2	493,273987	758,415	y7
			2	493,273987	871,499	y8
			2	493,273987	985,542	y9

- 5 Los lisados de proteínas de las células obtenidas directamente del tejido fijado con formalina (formaldehído) se prepararon utilizando los reactivos y el protocolo Liquid Tissue™ que implica recoger células en un tubo de muestra a través de microdissección de tejido seguida de calentamiento de las células en el tampón Liquid Tissue™ durante un período prolongado de tiempo. Una vez que la reticulación inducida por formalina se ha visto afectada negativamente, el tejido/células se digieren hasta su finalización de manera predecible usando una proteasa, como por ejemplo, pero sin limitación, la proteasa tripsina. Cada lisado de proteínas se convierte en una colección de péptidos por digestión de polipéptidos intactos con la proteasa. Se analizó cada lisado de Liquid Tissue™ (p. ej., Mediante espectrometría de masas con trampa iónica) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos donde los datos se presentaron como identificación de tantos péptidos como podrían identificarse por espectrometría de masas a partir de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteínas. Se emplea un espectrómetro de masas con trampa iónica u otra forma de un espectrómetro de masas que sea capaz de realizar perfiles globales para la identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un único lisado de proteínas/péptidos complejo. Sin embargo, los espectrómetros de masas con trampa iónica pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para realizar perfiles globales de péptidos. Aunque el ensayo SRM/MRM se puede desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluido un MALDI, con trampa iónica o de triple cuadrupolo, con frecuencia se considera que la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo 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 EM de un solo lisado en las condiciones empleadas, se cotejó esa lista de péptidos y se usó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados Liquid Tissue™, y la gran lista de péptidos se cotejó 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 Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y por lo tanto incluye los péptidos para proteínas específicas, tal como por ejemplo la proteína cMET.

30 Los péptidos tripticos de cMET identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas del receptor de cMET incluyen uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más de los péptidos de las 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, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, algunos

de los cuales se enumeran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó por espectrometría de masas en lisados Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido fijado con formalina embebido en parafina. 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 diez o más de esos péptidos mencionados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con los péptidos encontrados en la Tabla 2) son candidatos para su uso en el ensayo cuantitativo SRM/MRM para la proteína cMET en muestras biológicas humanas, incluso directamente en tejido del paciente fijado con formalina.

Los péptidos trípticos de cMET enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados a partir de múltiples lisados Liquid Tissue™ de múltiples tejidos diferentes fijados con formalina de diferentes órganos humanos, incluida la próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo SRM/MRM de la proteína cMET en tejido fijado con formalina. Un análisis de datos adicional de estos experimentos indicó que no se observa preferencia por ningún péptido específico de ningún sitio específico de los órganos. Por lo tanto, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos SRM/MRM de la proteína cMET sobre un lisado Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado con formalina que se origina a partir de cualquier muestra biológica o de cualquier sitio de los órganos del 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 diez o más de esos péptidos mencionados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con los péptidos también encontrados en la Tabla 2) se analizan mediante métodos que no dependen de la espectroscopía de masas, incluyendo, pero sin limitación, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtenga la información dirigida a la cantidad de péptidos (absoluta o relativa), la información puede emplearse en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, incluida la indicación (diagnóstico) de la presencia de cáncer en un sujeto, determinando el estadio/grado/estado del cáncer, que proporciona un pronóstico o determina las terapias 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 diez o más de los péptidos en la Tabla 1. Las composiciones pueden comprender los péptidos 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 diez 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 cMET, estén o no marcados con isótopos, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). Las composiciones no tienen que contener uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, o diez o más péptidos de cMET, y particularmente péptidos que aparecen en la Tabla 1 o en la Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales secos o liofilizados, soluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosas), matrices o manchas.

Una consideración importante al realizar un ensayo SRM/MRM es el tipo de instrumento que puede emplearse en el análisis de los péptidos. Aunque los ensayos SRM/MRM se pueden desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, incluido un MALDI, con trampa iónica o de triple cuadrupolo, actualmente, con frecuencia, se considera que la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo SRM/MRM es una plataforma de instrumentos de triple cuadrupolo. Se puede considerar que ese tipo de espectrómetro de masas es el instrumento más adecuado para analizar un solo 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.

Para implementar de manera más eficaz el ensayo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína cMET, es deseable utilizar información además de la secuencia de péptidos en el análisis. Esa información adicional puede usarse para dirigir y dar instrucciones al espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo), para realizar el análisis correcto y enfocado de péptidos diana específicos, de modo que el ensayo pueda realizarse de forma eficaz.

La información adicional sobre los péptidos diana en general, y sobre péptidos específicos de cMET, puede incluir una o más de la masa mono isotópica de cada péptido, su estado de carga precursora, el valor m/z precursor, el m/z de los iones de transición y el tipo de ion de cada ion de transición. La información adicional de péptidos que se puede usar para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la proteína cMET se muestra, por ejemplo, para dos (2) de los péptidos cMET de la lista en la Tabla 1 y se muestra en la Tabla 2. Puede prepararse, obtenerse y aplicarse información adicional similar descrita para estos dos (2) péptidos cMET mostrados por ejemplo en la Tabla 2 para el análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1.

El método descrito a continuación se utilizó para: 1) identificar los péptidos candidatos de la proteína cMET que pueden usarse para un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína cMET, 2) desarrollar ensayos SRM/MRM individuales, o ensayos, para péptidos diana de la proteína cMET para correlacionarlos y 3) aplicar ensayos cuantitativos para el diagnóstico de cáncer y/o la elección de la terapia óptima.

Método de Ensayo

1. Identificación de fragmentos de péptidos candidatos para SRM/MRM para la proteína cMET

a. Preparar un lisado de proteínas Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada con formalina usando una proteasa o proteasas, (que pueden incluir o no 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 iónica e identificar todos los fragmentos de péptidos de la proteína cMET, donde los fragmentos de péptidos individuales no contienen modificaciones peptídicas tales como fosforilaciones o glicosilaciones

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

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

e. Los péptidos que se modifican específicamente (fosforilados, glicosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan, y por lo tanto pueden detectarse, en un espectrómetro de masas al analizar un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina se identifican como péptidos candidatos para el análisis modificaciones peptídicas de la proteína cMET

2. Ensayo de Espectrometría de Masas para Fragmentos de Péptidos de la proteína cMET

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

i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento de péptido para condiciones de cromatografía óptimas, que incluyen pero sin limitación, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, nano-cromatografía de líquidos en fase inversa, cromatografía de líquidos de alto rendimiento o cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa

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

iii. El ensayo SRM/MRM se puede llevar a cabo utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo donde cada péptido tiene un pico de firma SRM/MRM característico y único que define con precisión el ensayo único SRM/MRM tal como se realiza en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo

b. Realizar el análisis SRM/MRM para que la cantidad del fragmento de péptido de la proteína cMET que se detecta, en función del área máxima de firma SRM/MRM única a partir de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, pueda indicar tanto cantidad relativa como absoluta de la proteína en un lisado de proteínas particular.

i. La cuantificación relativa se puede lograr:

1. Determinando la presencia aumentada o disminuida de la proteína cMET comparando el área máxima de firma SRM/MRM de un péptido cMET dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con la misma área máxima de firma SRM/MRM del mismo fragmento de péptido cMET en al menos un segundo, tercer, cuarto o más lisados Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas con formalina

2. Determinando la presencia aumentada o disminuida de la proteína cMET comparando el área máxima de firma SRM/MRM de un péptido cMET dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con las áreas máximas de firma SRM/MRM desarrolladas a partir de fragmentos de péptidos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área máxima de firma SRM/MRM entre las 2

muestras para un fragmento de péptido se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

3. Determinando la presencia aumentada o disminuida de la proteína cMET comparando el área máxima de firma SRM/MRM para un péptido cMET dado con las áreas máximas de firma SRM/MRM de otros fragmentos de péptidos derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada con formalina para normalizar los niveles cambiantes de la proteína cMET a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.

4. Estos ensayos pueden aplicarse tanto a fragmentos de péptidos no modificados como a fragmentos péptidos modificados de la proteína cMET, donde las modificaciones incluyen, pero sin limitación, fosforilación y/o glucosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan de la misma manera como se determinan las cantidades relativas de péptidos no modificados.

ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área máxima de firma SRM/MRM para un fragmento de péptido dado de la proteína cMET en una muestra biológica individual con el área máxima de firma SRM/MRM de un patrón de fragmentos de péptidos internos añadidos al lisado de proteínas de la muestra biológica

1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento de péptido de la proteína cMET que se está investigando. Este patrón se añade a una muestra en cantidades conocidas, y el área máxima de firma SRM/MRM se puede determinar tanto para el patrón interno de fragmento de péptido como para el fragmento de péptido natural en la muestra biológica por separado, seguido de la comparación de ambas áreas máximas

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

3. Aplicar la Cuantificación de Fragmentos de Péptidos al Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer

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

b. Realizar una cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos de péptidos de la proteína cMET y demostrar la correlación con los resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en la que esta correlación ya se ha demostrado en el campo o se puede demostrar en el futuro a través de estudios de correlación en cohortes de pacientes y tejidos de esos pacientes. Una vez que este ensayo confirma las correlaciones establecidas previamente o las correlaciones derivadas en el futuro, entonces, el método de ensayo puede usarse para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

La evaluación de los niveles de proteína cMET en los tejidos basada en el análisis de tejido derivado del paciente fijado con formalina puede proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéuticamente relevante sobre cada paciente en particular. Esta divulgación describe un método para medir el nivel de la proteína cMET en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos de péptidos cMET modificados o no modificados en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína cMET modificada o no modificada en dicha muestra; y en el que dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. La cuantificación de uno o más fragmentos de péptidos cMET puede comprender determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos de péptidos cMET en una muestra biológica en comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que cada uno de los fragmentos de péptidos cMET en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos. El patrón interno puede ser un péptido patrón interno marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos pesados estables seleccionados de ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

El método para medir el nivel de la proteína cMET en una muestra biológica descrita en el presente documento (o fragmentos de péptidos como sustitutos de los mismos) puede usarse como un indicador de diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. Los resultados de las mediciones del nivel de la proteína cMET pueden emplearse para determinar el estadio/grado/estado de diagnóstico de un cáncer correlacionando (por ejemplo, comparando) el nivel del receptor cMET encontrado en un tejido con el nivel de esa proteína encontrada en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

Debido a que tanto los ácidos nucleicos como las proteínas pueden analizarse a partir de la misma preparación biomolecular Liquid Tissue, es posible generar información adicional sobre el diagnóstico de enfermedades y las decisiones de tratamiento farmacológico a partir de la misma muestra. Por ejemplo, la proteína cMet es un receptor de tirosina cinasa que es capaz de estimular el crecimiento celular incontrolado (cáncer) mediante la activación de rutas específicas de proteínas de señales celulares. Si determinadas células expresan cMet a mayores niveles, cuando SRM lo analiza puede proporcionar información sobre el estado de las células y se puede obtener su potencial para el crecimiento incontrolado y el desarrollo de cánceres.

Otros receptores de tirosina cinasas, tales como IGF-1R y EGFR, también pueden desempeñar el mismo papel que cMet en las células. Cada una de esas tres proteínas puede indicar un crecimiento celular incontrolado a través de vías de señales celulares relacionadas, y cada una puede proporcionar resistencia a fármacos a una célula que está recibiendo terapia dirigida para una de estas proteínas. Por lo tanto, es ventajoso analizar la presencia de cualquier combinación, o las tres, de esas proteínas simultáneamente para determinar si ha surgido sobreexpresión o mutaciones que conducen a la actividad de la tirosina cinasa en las células.

Los ensayos SRM/MRM de dos o más de cMet, IGF-1R y/o EGFR, pueden realizarse junto con uno o más ensayos para determinar si una, dos o las tres proteínas están activadas o no, y pueden dar lugar a resistencia a fármacos. Dichos ensayos incluyen evaluar la secuencia de los ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARN o ADNc) que codifican esas proteínas para determinar si las mutaciones asociadas con una mayor actividad de la tirosina cinasa están presentes en las células utilizadas para generar los lisados de péptidos utilizados para el análisis SRM/MRM. Por ejemplo, el estado de mutación del ácido nucleico del campo de activación de la proteína EGFR puede ser importante para las decisiones de tratamiento con agentes terapéuticos anti-EGFR. Por lo tanto, al proporcionar análisis de ácidos nucleicos y proteínas tanto del estado de la proteína como del estado de la mutación en la misma preparación Liquid Tissue, se puede obtener mucha más información para tomar decisiones sobre la estrategia de tratamiento, y ventajosamente a partir de la misma muestra. Los ensayos SRM/MRM de cMet pueden realizarse mientras se realizan análisis mutacionales de IGF-1R y/o EGFR utilizando ácidos nucleicos a partir del mismo lisado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para medir el nivel de la Proteína del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (cMET) en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y cuantificar la cantidad de un fragmento de péptido cMET de la SEQ ID NO: 1 en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de dicha muestra biológica humana usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína cMET 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/o cuantificar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho producto de digestión de proteínas comprende un producto de digestión con proteasas.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido es tejido embebido en parafina.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que el tejido se obtiene de un tumor.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que cuantificar el fragmento de péptido cMET comprende comparar una cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento de péptido cMET en una muestra biológica diferente y separada.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en el que cuantificar dicho fragmento de péptido cMET comprende determinar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en una muestra biológica en comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en el que dicho fragmento de péptido cMET 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.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en el que el péptido patrón interno marcado isotópicamente comprende uno o más isótopos pesados estables seleccionados de ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, en el que detectar y cuantificar la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET en el producto de digestión de proteínas indica la presencia de proteína cMET y una asociación con el cáncer en el sujeto.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, que comprende además correlacionar los resultados de dicha detección y cuantificación de la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET, o el nivel de dicha proteína cMET con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 45 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 de péptido cMET, o el nivel de dicha proteína cMET con la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer se combina con la detección y/o cuantificación de la cantidad de otras proteínas o péptidos de otras proteínas en un formato multiplexado para proporcionar información adicional sobre la etapa/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, que comprende además seleccionar para el sujeto del que se obtuvo dicha muestra biológica un tratamiento para aplicar al sujeto basándose en la presencia, ausencia o cantidad de dicho fragmento de péptido cMET o el nivel de proteína cMET.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, que comprende además seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para administrar al paciente del que se obtuvo dicha muestra biológica, en el que el agente terapéutico y/o la cantidad de agente terapéutico a administrar se basa en la cantidad de dicho fragmento de péptido cMET o el nivel de proteína cMET.
- 55 14. El método de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en el que dicho agente terapéutico se une a la proteína cMET y/o inhibe su actividad biológica.