

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 753**

51 Int. Cl.:

**G01N 31/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010 E 17001320 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3260859**

54 Título: **Ensayo de SRM/MRM de la proteína del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1)**

30 Prioridad:

**22.12.2009 US 289382 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.10.2020**

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 2 786 753 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Ensayo de SRM/MRM de la proteína del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1)

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con un método basado en espectrometría de masas para seleccionar un tratamiento para un paciente humano que padece un cáncer caracterizado por la elevada expresión de la proteína del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) en comparación con el nivel de expresión de IRS1 en tejido normal.

Introducción

10 Se desvelan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína del sustrato 1 del receptor de insulina y que se denominará IRS1. La secuencia de péptidos y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en una monitorización de la reacción seleccionada (SRM) basada en espectrometría de masas, que también se puede denominar un ensayo de monitorización de la reacción múltiple (MRM), y se denominará SRM/MRM. Se describe información sobre el uso de péptidos para el análisis cuantitativo de SRM/MRM de la proteína IRS1.

15 Este ensayo de SRM/MRM se puede usar para medir niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína IRS1 y, por tanto, proporcionan un medio de medición de la cantidad de proteína IRS1 en una preparación de proteína dada obtenida de una muestra biológica por espectrometría de masas.

20 Más específicamente, el ensayo de SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en complejos lisados de muestras de proteína preparadas a partir de células obtenidas de muestras de tejido de paciente, tales como tejido de paciente con cáncer fijado en formol. Los métodos de preparación de las muestras de proteína a partir de tejido fijado en formol se describen en la patente de EE. UU. N° 7.473.532. Los métodos descritos en la patente de EE. UU. N° 7.473.532 se pueden llevar a cabo convenientemente usando reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible de Expression Pathology Inc. (Rockville, MD). El documento de patente WO 2009/092338 desvela la proteína IRS1 como biomarcador en muestras derivadas de pacientes con cáncer, por ejemplo en tejidos fijados en formol, para determinar la sensibilidad de pacientes con cáncer hacia la terapia elegida. Los niveles de expresión de la proteína IRS1 se determinan usando métodos inmunoanalíticos y basados en espectrometría de masas.

25 La forma más ampliamente y ventajosamente disponible de tejidos de tejido de pacientes con cáncer es el tejido fijado en formol incorporado en parafina. La fijación en formaldehído/formol de tejido quirúrgicamente extirpado es con diferencia el método más común de preservación de muestras de tejido de cáncer en todo el mundo y es el convenio aceptado para la práctica de patología convencional. Las disoluciones acuosas de formaldehído se denominan formol. "100 %" de formol consiste en una disolución saturada de formaldehído (que es aproximadamente 40 % en volumen o 37 % en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizador, normalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en la que el tejido se preserva es impregnando el tejido completo durante periodos prolongados de tiempo (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado 10 % de formol tamponado neutro, seguido por incorporación del tejido completo fijado en cera de parafina durante almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Así, los métodos analíticos moleculares para analizar tejido de 35 cáncer fijado en formol serán los métodos más aceptados y considerablemente utilizados para el análisis de tejido de pacientes con cáncer.

40 Se pueden usar resultados del ensayo de SRM/MRM para correlacionar niveles cuantitativos exactos y precisos de la proteína IRS1 dentro de las muestras de tejido específico (por ejemplo, muestra de tejido de cáncer) del paciente o sujeto del que se recogió y preservó 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 una terapia apropiada 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 llama un *ensayo diagnóstico con fines terapéuticos*. Por ejemplo, dicho ensayo se puede diseñar para diagnosticar la etapa o el grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que es más probable que responda un paciente.

45 Yi Z et al. (J Am Soc Mass Spectrom 2006, 17: 562-567) informan sobre la cuantificación de la fosforilación de la proteína IRS1 por HPLC-ESI-EM/EM.

Sumario

El problema subyacente a la presente invención se resuelve por la materia de las reivindicaciones independientes adjuntas; realizaciones preferidas pueden ser tomadas de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

50 Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por un método de selección de un tratamiento para un paciente humano que padece un cáncer caracterizado por elevada expresión de la proteína IRS1 en comparación con el nivel de expresión de IRS1 en tejido normal, que comprende:

medir por espectrometría de masas la cantidad de un fragmento peptídico IRS1 en un digesto de proteína preparado a partir de una muestra de tejido tumoral del paciente fijado en formol y, opcionalmente, calcular la cantidad de proteína

IRS1 en dicha muestra a partir de la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1; y seleccionar un tratamiento basado en la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 o, si se calcula, la cantidad de la proteína IRS1 en dicha muestra, en donde el fragmento peptídico IRS1 es SEQ ID NO:70 o SEQ ID NO:76.

5 Los ensayos descritos en el presente documento miden niveles *relativos* o *absolutos* de péptidos no modificados específicos de la proteína IRS1, y también pueden medir niveles absolutos o relativos de péptidos modificados específicos de la proteína IRS1. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados y restos de aminoácidos glucosilados que están presentes en los péptidos.

10 Se determinan niveles cuantitativos *relativos* de la proteína IRS1 por la metodología SRM/MRM, por ejemplo, comparando áreas de los picos distintivos de SRM/MRM (por ejemplo, área de los picos distintivos o intensidad integrada de iones de fragmentos) de un péptido IRS1 individual en diferentes muestras. Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de los picos distintivos de SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos IRS1, donde cada péptido tiene su propio pico distintivo de SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína IRS1 en una muestra biológica con el contenido de proteína IRS1 en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De esta forma, la cantidad de un péptido particular, o péptidos, de la proteína IRS1, y por tanto la cantidad de la proteína IRS1, se determina con respecto al mismo péptido IRS1, o péptidos, a través de 2 o más muestras biológicas en las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para un péptido, o péptidos, dados a partir de la proteína IRS1 dentro de una muestra individual comparando el área de los picos distintivos para ese péptido por metodología de SRM/MRM con el área de los picos distintivos para otro péptido diferente, o péptidos, de una proteína diferente, o proteínas, dentro de la misma preparación de proteínas a partir de la muestra biológica. De esta forma, la cantidad de un péptido particular de la proteína IRS1, y por tanto la cantidad de la proteína IRS1, se determina la una con respecto a la otra dentro de la misma muestra. Estos enfoques generan cuantificación de un péptido individual, o péptidos, de la proteína IRS1 con respecto a la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades como se han determinado por área de los picos son relativas entre sí, independientemente del peso absoluto con respecto al volumen o peso con respecto a las cantidades de peso del péptido IRS1 en la preparación de proteína a partir de la muestra biológica. Se normalizaron los datos cuantitativos relativos sobre las áreas de los picos distintivos individuales entre diferentes muestras 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 IRS1 simultáneamente en una muestra individual y/o a través de muchas muestras para adquirir información sobre las cantidades relativas de proteína, un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

30 Se determinan niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína IRS1 por, por ejemplo, la metodología de SRM/MRM por la cual el área de los picos distintivos de SRM/MRM de un péptido individual de la proteína IRS1 en una muestra biológica se compara con el área de los picos distintivos de SRM/MRM de un patrón interno enriquecido. En una realización, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido IRS1 exacto que contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Dichos patrones internos marcados con isótopo se sintetizan de manera que cuando se analizan por espectrometría de masas generan un pico distintivo de SRM/MRM predecible y coherente que es diferente y distinto del pico distintivo del péptido IRS1 nativo y que se pueden usar como un pico comparador. Así, cuando el patrón interno se enriquece en una preparación de proteína a partir de una muestra biológica en cantidades conocidas y se analiza por espectrometría de masas, el área de los picos distintivos de SRM/MRM del péptido nativo se compara con el área de los picos distintivos de SRM/MRM del péptido de patrón interno, y esta comparación numérica indica o la molaridad absoluta y/o peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de proteína original a partir de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para los fragmentos peptídicos se presentan según la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos, y así proteínas, simultáneamente en una muestra individual y/o a través de muchas muestras para obtener información sobre cantidades absolutas de proteína en muestras biológicas individuales y en cohortes enteras de muestras individuales.

50 El método de ensayo de SRM/MRM se puede usar para ayudar en el diagnóstico de la etapa del cáncer, por ejemplo, directamente en tejido derivado de paciente, tal como tejido fijado en formol, y para ayudar en la determinación de qué agente terapéutico sería el más ventajoso para su uso en el tratamiento de ese paciente. El tejido de cáncer que se extirpa de un paciente o mediante cirugía, tal como para extirpación terapéutica de tumores parciales o completos, o mediante procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de posible enfermedad, se analiza para determinar si están presentes en ese tejido de paciente una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas. Además, el nivel de expresión de una proteína, o múltiples proteínas, se puede determinar y comparar con un nivel "normal" o de referencia encontrado en tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas encontrados en tejido sano se pueden obtener de, por ejemplo, los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Alternativamente, los niveles normales o de referencia se pueden obtener para individuos con cáncer por análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer. Los ensayos de niveles de proteína (por ejemplo, niveles de IRS1) también se pueden usar para diagnosticar la etapa de cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de IRS1. Niveles o cantidades de proteínas o péptidos se pueden definir como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o péptido determinado por el ensayo de SRM/MRM. El nivel o cantidad se puede normalizar al nivel o cantidad total de proteína u otro componente en el lisado analizado (por ejemplo, expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramo de proteína). Además, el nivel o cantidad de una proteína o péptido se puede determinar basado en volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o cantidad de proteína o péptido como se ha determinado por el ensayo de

SRM/MRM también se puede normalizar al número de células analizadas. La información referente a IRS1 se puede así usar para ayudar en la determinación de la etapa o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína IRS1 (o fragmentos peptídicos de la proteína IRS1) con los niveles observados en tejidos normales. Una vez se ha determinado la etapa y/o grado, y/o expresión de IRS1 de proteínas características del cáncer, esa información se puede 5 corresponder con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente tejido de cáncer que se caracteriza por, por ejemplo, expresión anormal de la proteína o proteína(s) (por ejemplo, IRS1) que se ensayaron. La información de correspondencia de un ensayo de proteínas IRS1 con una lista de agentes terapéuticos que direcciona específicamente, por ejemplo, la proteína IRS1 o células/tejido que expresan la proteína, define lo que se ha denominado un *enfoque de medicina personalizado* para tratar enfermedad. Los métodos de 10 ensayo descritos en el presente documento forman la base de un *enfoque de medicina personalizado* usando análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente para decisiones de diagnóstico y tratamiento.

#### Descripción detallada

En principio, cualquier péptido predicho derivado de la proteína IRS1, preparado por ejemplo digiriendo con una proteasa de especificidad conocida (por ejemplo, tripsina), se puede usar como indicador sustituto para determinar la 15 abundancia de la proteína IRS1 en una muestra usando un ensayo de SRM/MRM basado en espectrometría de masas. Similarmente, cualquier secuencia de péptidos predicha que contiene un resto de aminoácido en un sitio que se conoce que está posiblemente modificado en la proteína IRS1 también se podría usar posiblemente para ensayar el grado de modificación de la proteína IRS1 en una muestra.

Los fragmentos de péptido IRS1 se pueden generar mediante una variedad de medios que incluyen usar el protocolo Liquid Tissue™ proporcionado en la patente de EE. UU. 7.473.532. El protocolo Liquid Tissue™ y los reactivos son capaces de producir muestras de péptido adecuadas para el análisis de espectroscopía de masas de tejido incorporado en parafina fijado en formol por digestión proteolítica de las proteínas en el tejido/muestra biológica. En el protocolo Liquid Tissue™, el tejido/biológico se calienta en un tampón durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, desde aproximadamente 80 °C hasta aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo desde aproximada- 20 mente 10 minutos hasta aproximadamente 4 horas) para invertir o liberar la reticulación de proteínas. El tampón empleado es un tampón neutro (por ejemplo, un tampón basado en Tris, o un tampón que contiene un detergente). Tras el tratamiento térmico, el tejido/muestra biológica se trata con una o más proteasas, que incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para romper el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y licuar dicha muestra (por ejemplo, un periodo de tiempo desde 30 minutos hasta 24 horas a una temperatura desde 37 °C hasta 65 °C). El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado de biomoléculas líquido, soluble, diluible.

Sorprendentemente, se encontró que muchas posibles secuencias de péptidos de la proteína IRS1 eran inadecuadas o ineficaces para su uso en los ensayos de SRM/MRM basados en espectrometría de masas por motivos que no eran inmediatamente evidentes. Como no era posible predecir los péptidos más adecuados para el ensayo de MRM/SRM, 35 fue necesario identificar experimentalmente péptidos modificados y no modificados en los actuales lisados de Liquid Tissue™ para desarrollar un ensayo de SRM/MRM fiable y preciso para la proteína IRS1. Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, se cree que algunos péptidos podrían ser, por ejemplo, difíciles de detectar por espectrometría de masas, ya que no se ionizan bien o producen fragmentos distintos de otras proteínas, los péptidos también pueden dejar de resolverse bien en la separación (por ejemplo, cromatografía de líquidos), o adherirse a utensilios de vidrio o 40 plástico.

Los péptidos IRS1 de la presente divulgación (por ejemplo, Tablas 1 y 2) se obtuvieron de la proteína IRS1 por digestión con proteasa de todas las proteínas dentro de un lisado complejo de Liquid Tissue™ preparado a partir de células obtenidas de tejido de cáncer fijado en formol. A menos que se indique de otro modo, en cada caso la proteasa fue tripsina. El lisado de Liquid Tissue™ se analizó entonces por espectrometría de masas para determinar los péptidos 45 derivados de la proteína IRS1 que se detectan y analizan por espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto preferido específico de péptidos para el análisis de espectrometría de masas se basa en: 1) determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en el análisis de espectrometría de masas de lisados de Liquid Tissue™, y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y las condiciones experimentales usadas 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 50 para sobrevivir en forma modificada durante la preparación de muestras.

Tabla 1

<b>Tabla 1 SEQ ID NO.</b>	<b>Secuencia de péptidos</b>
SEQ ID NO: 1	EVWQVILKPKGLGQTK
SEQ ID NO: 2	GLGQTKNLIGIYRLCLTSK
SEQ ID NO: 3	GSGDYMPMSPKSVSAPQQIINPIR
SEQ ID NO: 4	LCGAAGGLENLNYIDLVLK
SEQ ID NO: 5	LNSEAAAVVLQLMNIRR
SEQ ID NO: 6	LWTNGVGGHSHVLPHPK
SEQ ID NO: 7	NKHLVALYTR
SEQ ID NO: 8	PKGLGQTKNLIGIYR
SEQ ID NO: 9	RSIPLESCFNINK
SEQ ID NO: 10	RTHSAGTSPTITHQK
SEQ ID NO: 11	SQSSSNCSNPISVPLRRHHLNPPPSQVGLTR
SEQ ID NO: 12	SVSAPQQIINPIRR
SEQ ID NO: 13	TISFVKLNSEAAAVVLQLMNIR
SEQ ID NO: 14	VDTAAQTNSRLAR
SEQ ID NO: 15	VIRADPQGCR
SEQ ID NO: 16	AASEAGGPAREYYENEK
SEQ ID NO: 17	AAWQESTGVEMGR
SEQ ID NO: 18	AAWQESTGVEMGRLGPAPPGAASICR
SEQ ID NO: 19	ADPQGCR
SEQ ID NO: 20	AMSDEFPRSK
SEQ ID NO: 21	AREQQQQQPLHPPEPK
SEQ ID NO: 22	ASSDGEGTMSRPASVDGSPVSPSTNR
SEQ ID NO: 23	CPSQLQPAPR
SEQ ID NO: 24	EEETGTEEYMK
SEQ ID NO: 25	CTPGTGLGTSPALAGDEAASAADLDNR
SEQ ID NO: 26	MDLGPGR
SEQ ID NO: 27	FFVLRAASEAGGP
SEQ ID NO: 28	GGNGHRCTPGTGLGTSPALAGDEAASAADLDNR
SEQ ID NO: 29	HHLNPPPSQVGLTR
SEQ ID NO: 30	HSAFVPTRSYPEEGLEMHPLER
SEQ ID NO: 31	GSGDYMPMSPK
SEQ ID NO: 32	VDTAAQTNSR
SEQ ID NO: 33	KVGILRK
SEQ ID NO: 34	LARPTRLSLGDPK
SEQ ID NO: 35	LHPPLNHSRIPMPASRCSPSATSPVLSLSSSTSGHGSTSDCLFPR
SEQ ID NO: 36	LLYAATADDSSSSTSSDSLGGGYCGAR
SEQ ID NO: 37	LSLGDPKASTLPR
SEQ ID NO: 38	LSTSSGR
SEQ ID NO: 39	PASVDGSPVSPSTNRTHAHR
SEQ ID NO: 40	PDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPSGR
SEQ ID NO: 41	PGELGGAPK
SEQ ID NO: 42	PRSKSQSSSNCSNPISVPLR

ES 2 786 753 T3

<b>Tabla 1 SEQ ID NO.</b>	<b>Secuencia de péptidos</b>
SEQ ID NO: 43	PTRLSLGDPKASTLPR
SEQ ID NO: 44	QSYVDTSPAAPVSYADMR
SEQ ID NO: 45	RHHLNNPPPSQVGLTR
SEQ ID NO: 46	HSSETFSSTPSATR
SEQ ID NO: 47	RSRTESITATSPASMVGK
SEQ ID NO: 48	RSEDLSAYASISFQK
SEQ ID NO: 49	SIPLESCFNINK
SEQ ID NO: 50	SKSQSSSNCSNPISVPLR
SEQ ID NO: 51	SRTESITATSPASMVGK
SEQ ID NO: 52	SSASVSGSPSDGGFISSEYSSPCDFR
SEQ ID NO: 53	SSEDLSAYASISFQKPEDR
SEQ ID NO: 54	SSFRSVTPDSLGHTPPA
SEQ ID NO: 55	GEEELSNYICMGGK
SEQ ID NO: 56	SVTPDSLGHTPPAR
SEQ ID NO: 57	SYPEEGLEMHPLER
SEQ ID NO: 58	TESITATSPASMVGK
SEQ ID NO: 59	VGNTVFPFAGAAVGGGGSSSSSEDEVK
SEQ ID NO: 60	VNLSPNRNQSAAK
SEQ ID NO: 61	GSGDYMPMSPK
SEQ ID NO: 62	ASSDGEGTMSRPASVDGSPVSPSTNR
SEQ ID NO: 63	SVSAPQQIINPIR
SEQ ID NO: 64	LCLTSKTISFVKLNSEAAWLQLMNIR
SEQ ID NO: 65	LEPSLPHPHHQLQPHLPR
SEQ ID NO: 66	LPGHRHSAFVPTR
SEQ ID NO: 67	SSEDLSAYASISFQK
SEQ ID NO: 68	PDSSTLHTDDGY[fosforil]MPMSPGVAPVPSGR
SEQ ID NO: 69	SPGEY[fosforil]VNIEFGSDQSGYLSGPVAFHSSPSVR
SEQ ID NO: 70	EQQQQQQLLHPPEPK
SEQ ID NO: 71	HSSASFENVWLRPGELGGAPK
SEQ ID NO: 72	LEYYENEK
SEQ ID NO: 73	LNSEAAAVLQLMNIR
SEQ ID NO: 74	LSLGDPK
SEQ ID NO: 75	NLIGIYR
SEQ ID NO: 76	TGIAAEEVSLPR
SEQ ID NO: 77	HLVALYTR

Tabla 2

Tabla 2 SEQ ID NO.	Secuencia de péptidos	Masa monoiso- tópica	Estado de carga del pre- cursor	Precursor m/z	Transi- ción m/z	Tipo de ión
SEQ ID NO: 22	ASSDGEGTMSRPASVDGSPVSPSTNR	2548,146	2	1275,07996	574,2938	y5
			2		857,447	y8
			2		1302,628	y13
			2		1373,665	y14
			2		1470,718	y15
			3	850,388977	944,4791	y9
			3		1001,5	y10
			3		1116,527	y11
			3		1215,596	y12
			3		1302,628	y13
			3		1373,665	y14
			3		1470,718	y15
SEQ ID NO: 70	EQQQQQQPLLHPPEPK	1923,98	2	962,997009	930,5402	y8
			2		1027,593	y9
			2		1155,651	y10
			2		1283,71	y11
			2		1411,769	y12
			3	642,333984	578,3294	y10
			3		704,3721	y6
			3		706,388	y12
			3		770,4172	y13
			3		817,4561	y7
			3		930,5402	y8
			3		1027,593	y9
			3		1155,651	y10
SEQ ID NO: 77	HLVALYTR	971,555	2	486,783997	552,3135	y4
			2		623,3506	y5
			2		722,419	y6
			2		835,5031	y7
			2		972,562	y8
SEQ ID NO: 71	HSSASFENVWLRPGELGGAPK	2238,118	2	1120,06604	825,4459	y9
			2		1280,71	y12
			2		1379,779	y13
			2		1493,822	y14
			3	747,046021	825,4459	y9
			3		981,5471	y10
			3		1008,021	y19
			3		1094,631	y11
			3		1280,71	y12

ES 2 786 753 T3

Tabla 2 SEQ ID NO.	Secuencia de péptidos	Masa monoiso- tópica	Estado de carga del pre- cursor	Precursor m/z	Transi- ción m/z	Tipo de ión
			3		1379,779	y13
			3		1493,822	y14
SEQ ID NO: 72	LEYYENEK	1086,487	2	544,25	390,1978	y3
			2		682,3037	y5
			2		845,367	y6
			2		974,4096	y7
			2		1087,494	y8
SEQ ID NO: 73	LNSEAAAWLQLMNIR	1740,956	2	871,484985	774,4285	y6
			2		855,4565	b8
			2		887,5126	y7
			2		986,581	y8
			2		1085,649	y9
			2		1156,687	y10
			2		1227,724	y11
			2		1298,761	y12
			2		1427,803	y13
SEQ ID NO: 74	LSLGDPK	728,407	2	365,209992	416,2134	y4
			2		529,2975	y5
			2		616,3295	y6
			2		729,4136	y7
			3	354,187012	406,2039	y4
			3		507,2516	y5
			3		594,2836	y6
			3		707,3677	y7
SEQ ID NO: 75	NLIGIYR	847,492	2	424,752991	451,2658	y3
			2		508,2873	y4
			2		621,3713	y5
			2		734,4554	y6
			2		848,4983	y7
SEQ ID NO: 44	QSYVDTSPAAPVSYADMR	1956,889	2	979,450989	938,4395	y8
			2		1009,477	y9
			2		1080,514	y10
			2		1177,567	y11
			2		1264,599	y12
			3	653,302979	655,2863	y5
			3		742,3183	y6
			3		841,3867	y7
			3		938,4395	y8
			3		1009,477	y9
			3		1080,514	y10

Tabla 2 SEQ ID NO.	Secuencia de péptidos	Masa monoiso- tópica	Estado de carga del pre- cursor	Precursor m/z	Transi- ción m/z	Tipo de ión
			3		1177,567	y11
SEQ ID NO: 63	SVSAPQQIINPIR	1421,799	2	711,906006	385,2552	y3
			2		499,2982	y4
			2		725,4663	y6
			2		853,5248	y7
			2		981,5834	y8
			2		1078,636	y9
			2		1149,673	y10
			2		1236,705	y11
			2		1335,774	y12
			2		1422,806	y13
SEQ ID NO: 57	SYPEEGLEMHPLER	1685,772	2	843,893005	514,2979	y4
			2		718,8453	y12
			2		911,4398	y7
			2		1024,524	y8
			2		1081,545	y9
			2		1210,588	y10
			2		1339,63	y11
			2		1436,683	y12
SEQ ID NO: 76	TGIAAEEVSLPR	1241,662	2	621,838013	272,1712	y2
			2		700,3983	y6
			2		829,4409	y7
			2		900,478	y8
			2		971,5151	y9
			2		1084,599	y10
			2		1141,621	y11
			2		1242,668	y12

Se prepararon lisados de proteínas de células obtenidas directamente de tejido fijado en formol (formaldehído) usando los reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo que implica recoger células en un tubo de muestra por microdissección de tejido, seguido por calentar las células en el tampón Liquid Tissue™ durante un periodo de tiempo prolongado. Una vez se había afectado negativamente la reticulación inducida por formol, entonces se digieren el tejido/células hasta el fin en un modo predecible usando una proteasa como, por ejemplo, que incluye pero no se limita a, la proteasa tripsina. Cada lisado de proteína se convierte en un conjunto de péptidos por digestión de polipéptidos intactos con la proteasa. Se analizó cada lisado de Liquid Tissue™ (por ejemplo, por espectrometría de masas con trampa iónica) para realizar múltiples estudios de proteómica global de los péptidos donde los datos se presentaron como identificación de tantos péptidos como se pudieran identificar por espectrometría de masas de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteína. Se emplea espectrómetro de masas con trampa de iones u otra forma de un espectrómetro de masas que sea capaz de realizar el perfilado global para identificación de tantos péptidos como sea posible a partir de un lisado complejo de proteína/péptido individual. Los espectrómetros de masas con trampa de iones, sin embargo, pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para realizar el perfilado global de péptidos. Aunque el ensayo de SRM/MRM se puede desarrollar y realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones, o triple cuadrupolo, se considera frecuentemente que la plataforma de instrumentos más ventajosa para el ensayo de SRM/MRM es una plataforma de instrumento de triple cuadrupolo.

Una vez se identificaron tantos péptidos como fue posible en un análisis de EM individual de un lisado individual en las condiciones empleadas, entonces se recopiló esa lista de péptidos y se usó para determinar las proteínas que se

detectaron en ese lisado. Ese proceso se repitió para múltiples lisados de Liquid Tissue™, y se reunió una lista muy grande de péptidos en un único 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 así incluye los péptidos para proteínas específicas, tales como, por ejemplo, la proteína IRS1.

Los péptidos trípticos IRS1 identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas del receptor de IRS1 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 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, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, y SEQ ID NO:77, cada uno de los cuales se enumera en la Tabla 1. Cada uno de los péptidos se detectó por espectrometría de masas en lisados de Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido fijado en formol incorporado en parafina. Así, cada uno de los péptidos en la Tabla 1, o cualquier combinación de los 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 los péptidos citados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con uno o más de los péptidos encontrados en la Tabla 2) son candidatos para su uso en ensayo cuantitativo de SRM/MRM para la proteína IRS1 en muestras biológicas humanas, que incluyen tejido de paciente fijado directamente en formol.

Los péptidos trípticos IRS1 enumerados en la Tabla 1 incluyen los detectados de múltiples lisados de Liquid Tissue™ de múltiples tejidos fijados en formol diferentes de diferentes órganos humanos que incluyen próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo de SRM/MRM de la proteína IRS1 en tejido fijado en formol. El análisis de datos adicional de estos experimentos indicó que no se observó preferencia para ningún péptido específico de ningún sitio de órgano específico. Así, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para realizar ensayos de SRM/MRM de la proteína IRS1 en un lisado de Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado en formol 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 diez o más de los péptidos citados en la Tabla 1, y particularmente combinaciones con los péptidos también encontrados en la Tabla 2) se pueden ensayar por métodos que no se basan en espectroscopía de masas, que incluyen, pero no se limitan a, métodos inmunológicos (por ejemplo, transferencia Western o ELISA). Independientemente de cómo se obtiene la información referida a la cantidad de péptido(s) (absoluta o relativa), la información se puede emplear en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, que incluye indicar (diagnosticar) la presencia de cáncer en un sujeto, determinar la etapa/grado/estado del cáncer, proporcionar un pronóstico, o determinar la pauta terapéutica o 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. En algunas realizaciones, las composiciones 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 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 isotópicamente marcados. Cada uno de los péptidos se puede marcar con uno o más isótopos seleccionados independientemente del grupo que consiste en:  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ , o combinaciones de los mismos. Las composiciones que comprenden péptidos de la proteína IRS1, tanto marcados con isótopo como no, no necesitan contener todos los péptidos de esa proteína (por ejemplo, un conjunto completo de péptidos trípticos). Opcionalmente, las composiciones no contienen 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 IRS1, y particularmente los péptidos que aparecen en la Tabla 1 o Tabla 2. Las composiciones que comprenden péptidos pueden estar en forma de materiales secados o liofilizados, disoluciones o suspensiones líquidas (por ejemplo, acuosas), matrices, o transferencias.

Una consideración importante para realizar un ensayo de SRM/MRM es el tipo de instrumento que se puede emplear en el análisis de los péptidos. Aunque los ensayos de SRM/MRM se pueden desarrollar y realizar en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones, o triple cuadrupolo, se considera frecuentemente que la plataforma de instrumento más ventajosa para el ensayo de SRM/MRM es una plataforma de instrumento de triple cuadrupolo. Se puede considerar que ese tipo de espectrómetro de masas es el instrumento más adecuado para analizar un péptido diana aislado individual dentro de un lisado de proteína muy complejo que puede consistir en cientos de miles a millones de péptidos individuales de todas las proteínas contenidas dentro de una célula.

Para implementar más eficientemente el ensayo de SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína IRS1, se

desea utilizar información, además de la secuencia de péptidos, en el análisis. Esa información adicional se puede usar en dirigir e instruir el espectrómetro de masas (por ejemplo, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo), para realizar el análisis correcto y enfocado de péptido(s) dirigido(s) específico(s), de forma que el ensayo se pueda realizar eficazmente.

5 La información adicional sobre los péptidos diana en general, y sobre los péptidos IRS1 específicos, puede incluir una o más de las masas monoisotópicas del péptido, su estado de carga de precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z, y el tipo de ión de cada ión de transición. La información de péptidos adicional que se puede usar para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la proteína IRS1 se muestra, por ejemplo, para doce (12) de los péptidos IRS1 a partir de la lista en la Tabla 1 y se muestra en la Tabla 2. La información adicional similar descrita para  
10 estos doce (12) péptidos IRS1 mostrados, por ejemplo, en la Tabla 2, se puede preparar, obtener y aplicar al análisis de los otros péptidos contenidos en la Tabla 1.

Se usó el método descrito a continuación para: 1) identificar péptidos candidatos de la proteína IRS1 que se puede usar para un ensayo de SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína IRS1, 2) desarrollar ensayo de SRM/MRM individual, o ensayos, para péptidos diana de la proteína IRS1 para correlación y 3) aplicar ensayos  
15 cuantitativos al diagnóstico del cáncer y/o elección de terapia óptima.

#### Método de ensayo

##### 1. Identificación de fragmentos peptídicos candidatos para SRM/MRM para la proteína IRS1

- a. Preparar un lisado de proteínas de Liquid Tissue™ a partir de una muestra biológica fijada en formol usando una proteasa o proteasas (que puede o pueden no incluir tripsina), para digerir proteínas
- 20 b. Analizar todos los fragmentos de proteínas en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína IRS1, donde fragmentos peptídicos individuales no contienen ninguna modificación de péptidos tal como fosforilaciones o glucosilaciones
- 25 c. Analizar todos los fragmentos de proteínas en el lisado de Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína IRS1 que llevan modificaciones de péptidos tales como, por ejemplo, restos fosforilados o glucosilados
- 30 d. Se pueden medir potencialmente todos los péptidos generados por un método de digestión específico de la proteína IRS1 entera de longitud completa, pero los péptidos preferidos usados para el desarrollo del ensayo de SRM/MRM son los que se identifican por espectrometría de masas directamente en un complejo lisado de proteínas de Liquid Tissue™ preparado a partir de una muestra biológica fijada en formol
- 35 e. Se identifican péptidos que son específicamente modificados (fosforilados, glucosilados, etc.) en tejido de paciente y que se ionizan, y así se detectan, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formol como péptidos candidatos para ensayar las modificaciones de péptidos de la proteína IRS1

##### 2. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos de la proteína IRS1

- a. Se aplica el ensayo de SRM/MRM en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para fragmentos peptídicos individuales identificados en un lisado de Liquid Tissue™ a péptidos de la proteína IRS1
  - 40 i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento peptídico para condiciones de cromatografía óptimas que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis en gel, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, nanocromatografía de líquidos de fase inversa, cromatografía líquida de alta resolución, o cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa
  - 45 ii. Determinar la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga de precursor para cada péptido, el valor m/z de precursor para cada péptido, los iones de transición m/z para cada péptido, y el tipo de ión de cada ión de transición para cada fragmento peptídico para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para cada péptido.
  - iii. Entonces se puede realizar el ensayo de SRM/MRM usando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo donde cada péptido tiene una característica y pico distintivo de SRM/MRM único que define con precisión el ensayo de SRM/MRM único como se  
50 realiza en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo
- b. Realizar el análisis de SRM/MRM de manera que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína IRS1 que se detecta, en función del área de los picos distintivos de SRM/MRM únicos de un análisis de espectrometría de masas de SRM/MRM, pueda indicar tanto la cantidad relativa como absoluta de la proteína en un lisado de proteínas particular.

i. La cuantificación relativa se puede lograr:

- 5 1. Determinando la elevada o reducida presencia de la proteína IRS1 comparando el área de los picos distintivos de SRM/MRM de un péptido IRS1 dado detectado en un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formol con la misma área de los picos distintivos de SRM/MRM del mismo fragmento peptídico IRS1 en al menos un segundo, tercer, cuarto o más lisados de Liquid Tissue™ de al menos una segunda, tercera, cuarta o más muestras biológicas fijadas en formol
- 10 2. Determinar la elevada o reducida presencia de la proteína IRS1 comparando el área de los picos distintivos de SRM/MRM de un péptido IRS1 dado detectado en un lisado de Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada en formol con áreas de los picos distintivos de SRM/MRM desarrolladas de fragmentos peptídicos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área de los picos distintivos de SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento peptídico se normalizó a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.
- 15 3. Determinar la elevada o reducida presencia de la proteína IRS1 comparando el área de los picos distintivos de SRM/MRM para un péptido IRS1 dado con las áreas de los picos distintivos de SRM/MRM de otros fragmentos peptídicos derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado de Liquid Tissue™ a partir de la muestra biológica fijada en formol para normalizar los niveles de cambio de la proteína IRS1 a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión en diversas condiciones celulares.
- 20 4. Estos ensayos se pueden aplicar a tanto fragmentos peptídicos no modificados como a fragmentos peptídicos modificados de la proteína IRS1, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glucosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan del mismo modo que se determinan cantidades relativas de péptidos no modificados.
- 25

ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área de los picos distintivos de SRM/MRM para un fragmento peptídico dado de la proteína IRS1 en una muestra biológica individual con el área de los picos distintivos de SRM/MRM de un fragmento peptídico interno estándar enriquecido en el lisado de proteína a partir de la muestra biológica

- 30 1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico de la proteína IRS1 que se está interrogando. Este patrón se enriquece en una muestra en cantidades conocidas, y el área de los picos distintivos de SRM/MRM se puede determinar para tanto el fragmento peptídico interno estándar como el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido por comparación de ambas áreas de los picos
- 35 2. Esto se puede aplicar a fragmentos peptídicos sin modificar y fragmentos peptídicos modificados, donde las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, fosforilación y/o glucosilación, y donde los niveles absolutos de péptidos modificados se pueden determinar del mismo modo que se determinan niveles absolutos de péptidos no modificados.

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

- 40 a. Realizar cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos de péptido de la proteína IRS1 y demostrar que se confirma la asociación previamente determinada, también entendida en el campo del cáncer, de la expresión de IRS1 de proteínas con la etapa/grado/estado de cáncer en tejido tumoral del paciente
- 45 b. Realizar cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos de péptido de la proteína IRS1 y demostrar la correlación con resultados clínicos de diferentes estrategias de tratamiento, en donde esta correlación ya se ha demostrado en el campo o se puede demostrar en el futuro mediante estudios de correlación a través de cohortes de pacientes y tejido de los pacientes. Una vez se confirman por este ensayo o correlaciones previamente establecidas o correlaciones derivadas en el futuro, entonces se puede usar el método de ensayo para determinar la estrategia de tratamiento óptima

50 La información mostrada en la Tabla 2 es necesaria para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para la cuantificación de la proteína IRS1 en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Se desarrollaron características específicas y únicas sobre estos péptidos IRS1 por análisis de todos los péptidos IRS1 en tanto una trampa de ión como un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Esa información incluye la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga precursor, el valor de m/z del precursor, los valores m/z de transición del precursor, y los tipos de iones de cada una de las transiciones identificadas. Esa información se debe determinar experimentalmente para todos y cada uno de los péptidos candidatos de SRM/MRM directamente en lisados de Liquid Tissue™ de tejido fijado en formol; debido a que, de forma interesante, no todos los péptidos de la proteína IRS1 se pueden detectar en dichos lisados

usando SRM/MRM como se describe en el presente documento, indica que los péptidos IRS1 no detectados no se pueden considerar péptidos candidatos para desarrollar un ensayo de SRM/MRM para su uso en cuantificar péptidos/proteínas directamente en lisados de Liquid Tissue™ de tejido fijado en formol.

5 Utilizando esta información, se pueden desarrollar ensayos cuantitativos de SRM/MRM para la proteína IRS1, y la evaluación de niveles de proteína IRS1 en tejidos basados en análisis de tejido fijado en formol derivado de paciente puede proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéuticamente relevante sobre cada paciente particular. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la presente divulgación describe un método para medir el nivel de la proteína IRS1 en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos IRS1 modificados o no modificados en un digesto de proteína preparado a partir de dicha muestra biológica usando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína IRS1 modificada o no modificada en dicha muestra; y en donde dicho nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. En una realización relacionada de la invención como se define en las reivindicaciones, el cuantificar uno o más fragmentos de péptido IRS1 comprende determinar la cantidad de cada uno de los fragmentos de péptidos IRS1 en una muestra biológica por comparación con un péptido de patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde cada uno de los fragmentos de péptidos IRS1 en la muestra biológica se compara con un péptido de 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 de patrón interno isotópicamente marcado que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados de <sup>18</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>34</sup>S, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H o combinaciones de los mismos.

20 El método de medición del nivel de la proteína IRS1 en una muestra biológica descrita en el presente documento (o fragmentos peptídicos como sustitutos de la misma) se puede usar como un indicador diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. En una realización, los resultados de mediciones del nivel de la proteína IRS1 se pueden emplear para determinar la etapa/grado/estado de diagnóstico de un cáncer por correlación (por ejemplo, comparando) el nivel de receptor de IRS1 encontrado en un tejido con el nivel de esa proteína encontrado en tejidos normales y/o cancerosos o precancerosos.

25 **Listado de secuencias**

<110> Expression Pathology Inc.

<120> Ensayo de SRM/MRM de la proteína del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1)

30 <130> E 10021 EP/D-I

<150> US 61/289.382

<151> 22-12-2009

35 <160> 77

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Péptido IRS

<400> 1

Glu	Val	Trp	Gln	Val	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Gly	Leu	Gly	Gln	Thr	Lys
1				5					10					15	

50 <210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido IRS

<400> 2

60 <210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 786 753 T3

Gly Leu Gly Gln Thr Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg Leu Cys Leu  
 1 5 10 15

Thr Ser Lys

5 <210> 3  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 3

Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys Ser Val Ser Ala Pro  
 1 5 10 15

Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg  
 20

15 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 4

Leu Cys Gly Ala Ala Gly Gly Leu Glu Asn Gly Leu Asn Tyr Ile Asp  
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Val Lys  
 20

25 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 5

Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg  
 1 5 10 15

Arg

40 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 6

ES 2 786 753 T3

Leu Trp Thr Asn Gly Val Gly Gly His His Ser His Val Leu Pro His  
 1 5 10 15

Pro Lys

5 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 7

Asn Lys His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg  
 1 5 10

15 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 8

Pro Lys Gly Leu Gly Gln Thr Lys Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg  
 1 5 10 15

30 <210> 9  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido IRS  
 35 <400> 9

Arg Ser Ile Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys  
 1 5 10

40 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 10

Arg Thr His Ser Ala Gly Thr Ser Pro Thr Ile Thr His Gln Lys  
 1 5 10 15

50 <210> 11  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido IRS

ES 2 786 753 T3

<400> 11

Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro Leu Arg  
 1                    5                    10                    15  
                   Arg His His Leu Asn Asn Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg  
                                   20                    25                    30

5

<210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 12

15

Ser Val Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg Arg  
 1                    5                    10

<210> 13  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Péptido IRS

25

<400> 13

Thr Ile Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu  
 1                    5                    10                    15

Gln Leu Met Asn Ile Arg  
 20

<210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 14

40

Val Asp Thr Ala Ala Gln Thr Asn Ser Arg Leu Ala Arg  
 1                    5                    10

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 15

50

Val Ile Arg Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg Arg  
 1                    5                    10

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 786 753 T3

<220>  
<223> Péptido IRS

5 <400> 16

Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg Leu Glu Tyr Tyr Glu Asn  
1 5 10 15

Glu Lys

<210> 17  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 17

Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val Glu Met Gly Arg  
1 5 10

20 <210> 18  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 18

30 Ala Ala Trp Gln Glu Ser Thr Gly Val Glu Met Gly Arg Leu Gly Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ser Ile Cys Arg  
20 25

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Péptido IRS

40 <400> 19

Ala Asp Pro Gln Gly Cys Arg  
1 5

45 <210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 20

Ala Met Ser Asp Glu Phe Arg Pro Arg Ser Lys  
1 5 10

55

ES 2 786 753 T3

<210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 10 <400> 21  
  
           Ala Arg Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu  
           1                  5                  10                  15  
  
           Pro Lys  
  
 <210> 22  
 15 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Péptido IRS  
  
 <400> 22  
  
           Ala Ser Ser Asp Gly Glu Gly Thr Met Ser Arg Pro Ala Ser Val Asp  
           1                  5                  10                  15  
  
           Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg  
                           20                  25  
 25  
 <210> 23  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Péptido IRS  
  
 <400> 23  
 35  
                   Cys Pro Ser Gln Leu Gln Pro Ala Pro Arg  
                   1                  5                  10  
  
 <210> 24  
 40 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Péptido IRS  
  
 <400> 24  
  
                   Glu Glu Glu Thr Gly Thr Glu Glu Tyr Met Lys  
                   1                  5                  10  
 50  
 <210> 25  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Péptido IRS

ES 2 786 753 T3

<400> 25

Cys Thr Pro Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser Pro Ala Leu Ala Gly Asp  
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn Arg  
 20 25

5

<210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 26

15

Met Asp Leu Gly Pro Gly Arg Arg  
 1 5

<210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Péptido IRS

25

<400> 27

Phe Phe Val Leu Arg Ala Ala Ser Glu Ala Gly Gly Pro Ala Arg  
 1 5 10 15

30

<210> 28  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 28

Gly Gly Asn Gly His Arg Cys Thr Pro Gly Thr Gly Leu Gly Thr Ser  
 1 5 10 15

Pro Ala Leu Ala Gly Asp Glu Ala Ala Ser Ala Ala Asp Leu Asp Asn  
 20 25 30

40

Arg

<210> 29  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Péptido IRS

50

<400> 29

ES 2 786 753 T3

His His Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg  
 1 5 10 15

5 <210> 30  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 30

His Ser Ala Phe Val Pro Thr Arg Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu  
 1 5 10 15

Met His Pro Leu Glu Arg  
 20

15 <210> 31  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 31

Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys  
 1 5 10

25 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 32

Val Asp Thr Ala Ala Gln Thr Asn Ser Arg  
 1 5 10

40 <210> 33  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 33

Lys Val Gly Tyr Leu Arg Lys  
 1 5

50 <210> 34  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido IRS

ES 2 786 753 T3

<400> 34

Leu Ala Arg Pro Thr Arg Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys  
 1 5 10

5 <210> 35  
 <211> 46  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 35

Leu His Pro Pro Leu Asn His Ser Arg Ser Ile Pro Met Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

15 Arg Cys Ser Pro Ser Ala Thr Ser Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Thr Ser Gly His Gly Ser Thr Ser Asp Cys Leu Phe Pro Arg  
 35 40 45

<210> 36  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido IRS

25 <400> 36

Leu Leu Tyr Ala Ala Thr Ala Asp Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser  
 1 5 10 15

Asp Ser Leu Gly Gly Gly Tyr Cys Gly Ala Arg  
 20 25

30 <210> 37  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 37

Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys Ala Ser Thr Leu Pro Arg  
 1 5 10

40 <210> 38  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 38

50 Leu Ser Thr Ser Ser Gly Arg  
 1 5

<210> 39

ES 2 786 753 T3

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 39

10 Pro Ala Ser Val Asp Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg Thr  
 1 5 10 15

His Ala His Arg  
 20

<210> 40  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido IRS

20 <400> 40

Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser  
 1 5 10 15

Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser Gly Arg  
 20 25

25 <210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 41

35 Pro Gly Glu Leu Gly Gly Ala Pro Lys  
 1 5

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido IRS

45 <400> 42

Pro Arg Ser Lys Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser  
 1 5 10 15

Val Pro Leu Arg  
 20

50 <210> 43  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 786 753 T3

<220>  
 <223> Péptido IRS

5 <400> 43

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

<210> 44  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS

15 <400> 44

Gln Ser Tyr Val Asp Thr Ser Pro Ala Ala Pro Val Ser Tyr Ala Asp  
 1 5 10 15

20 Met Arg

<210> 45  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido IRS

30 <400> 45

Arg His His Leu Asn Asn Pro Pro Pro Ser Gln Val Gly Leu Thr Arg  
 1 5 10 15

<210> 46  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido IRS

40 <400> 46

His Ser Ser Glu Thr Phe Ser Ser Thr Pro Ser Ala Thr Arg  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS

50 <400> 47

Arg Ser Arg Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val  
 1 5 10 15

55 Gly Gly Lys

<210> 48

ES 2 786 753 T3

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 48

10 Arg Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys  
 1 5 10 15

<210> 49  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido IRS

20 <400> 49

Ser Ile Pro Leu Glu Ser Cys Phe Asn Ile Asn Lys  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido IRS

30 <400> 50

Ser Lys Ser Gln Ser Ser Ser Asn Cys Ser Asn Pro Ile Ser Val Pro  
 1 5 10 15

35 Leu Arg

<210> 51  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 51

45 Ser Arg Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Lys

<210> 52  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido IRS

55 <400> 52

ES 2 786 753 T3

Ser Ser Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ile Ser  
 1 5 10 15

Ser Asp Glu Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Asp Phe Arg  
 20 25

5 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 53

Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys Gln  
 1 5 10 15

Pro Glu Asp Arg  
 20

15 <210> 54  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 54

Ser Ser Phe Arg Ser Val Thr Pro Asp Ser Leu Gly His Thr Pro Pro  
 1 5 10 15

25 Ala

<210> 55  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 55

Gly Glu Glu Glu Leu Ser Asn Tyr Ile Cys Met Gly Gly Lys  
 1 5 10

40 <210> 56  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 56

Ser Val Thr Pro Asp Ser Leu Gly His Thr Pro Pro Ala Arg  
 1 5 10

50 <210> 57  
 <211> 14

ES 2 786 753 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Péptido IRS

<400> 57

10 Ser Tyr Pro Glu Glu Gly Leu Glu Met His Pro Leu Glu Arg  
 1 5 10

<210> 58  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 58

20 Thr Glu Ser Ile Thr Ala Thr Ser Pro Ala Ser Met Val Gly Gly Lys  
 1 5 10 15

<210> 59  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido IRS

30 <400> 59

Val Gly Asn Thr Val Pro Phe Gly Ala Gly Ala Ala Val Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Val Lys  
 20 25

<210> 60  
 35 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 40 <223> Péptido IRS

<400> 60

Val Asn Leu Ser Pro Asn Arg Asn Gln Ser Ala Lys  
 1 5 10

45 <210> 61  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 61

55 Gly Ser Gly Asp Tyr Met Pro Met Ser Pro Lys  
 1 5 10

<210> 62

ES 2 786 753 T3

<211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 62

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

10 Gly Ser Pro Val Ser Pro Ser Thr Asn Arg  
 20 25

<210> 63  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 63

20 Ser Val Ser Ala Pro Gln Gln Ile Ile Asn Pro Ile Arg  
 1 5 10

<210> 64  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 64

Leu Cys Leu Thr Ser Lys Thr Ile Ser Phe Val Lys Leu Asn Ser Glu  
 1 5 10 15

Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg  
 20 25

35 <210> 65  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido IRS  
 <400> 65

Leu Glu Pro Ser Leu Pro His Pro His His Gln Val Leu Gln Pro His  
 1 5 10 15

45 Leu Pro Arg

<210> 66  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido IRS

ES 2 786 753 T3

<400> 66

Leu Pro Gly His Arg His Ser Ala Phe Val Pro Thr Arg  
 1 5 10

5 <210> 67  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido IRS

15 <400> 67

Ser Ser Glu Asp Leu Ser Ala Tyr Ala Ser Ile Ser Phe Gln Lys  
 1 5 10 15

20 <210> 68  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido IRS

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(12)  
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 68

Pro Asp Ser Ser Thr Leu His Thr Asp Asp Gly Tyr Met Pro Met Ser  
 1 5 10 15

Pro Gly Val Ala Pro Val Pro Ser Gly Arg  
 20 25

35 <210> 69  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido IRS

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 69

Ser Pro Gly Glu Tyr Val Asn Ile Glu Phe Gly Ser Asp Gln Ser Gly  
 1 5 10 15

Tyr Leu Ser Gly Pro Val Ala Phe His Ser Ser Pro Ser Val Arg  
 20 25 30

50 <210> 70  
 <211> 16  
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

ES 2 786 753 T3

<220>  
 <223> Péptido IRS

5 <400> 70

Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Leu Leu His Pro Pro Glu Pro Lys  
 1 5 10 15

<210> 71  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 71

His Ser Ser Ala Ser Phe Glu Asn Val Trp Leu Arg Pro Gly Glu Leu  
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Pro Lys  
 20

20 <210> 72  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 72

30 Leu Glu Tyr Tyr Glu Asn Glu Lys  
 1 5

<210> 73  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido IRS

40 <400> 73

Leu Asn Ser Glu Ala Ala Ala Val Val Leu Gln Leu Met Asn Ile Arg  
 1 5 10 15

45 <210> 74  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Péptido IRS

<400> 74

Leu Ser Leu Gly Asp Pro Lys  
 1 5

55 <210> 75  
 <211> 7

# ES 2 786 753 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 75

Asn Leu Ile Gly Ile Tyr Arg  
1 5

10 <210> 76  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 76

20 Thr Gly Ile Ala Ala Glu Glu Val Ser Leu Pro Arg  
1 5 10

25 <210> 77  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Péptido IRS

<400> 77

His Leu Val Ala Leu Tyr Thr Arg  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de selección de un tratamiento para un paciente humano que padece un cáncer caracterizado por elevada expresión de la proteína IRS1 en comparación con el nivel de expresión de IRS1 en tejido normal, que comprende:
- 5        medir por espectrometría de masas la cantidad de un fragmento peptídico IRS1 en un digesto de proteína preparado a partir de una muestra de tejido tumoral del paciente fijado con formol y, opcionalmente, calcular la cantidad de la proteína IRS1 en dicha muestra a partir de la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1; y
- seleccionar un tratamiento basado en la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 o, si se calcula, la cantidad de la proteína IRS1 en dicha muestra, en donde el fragmento peptídico IRS1 es SEQ ID NO:70 o SEQ ID NO:76.
- 10        2. El método de la reivindicación 1, en donde seleccionar un tratamiento comprende seleccionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico y/o la cantidad del agente terapéutico administrado se basa en la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 o, si se calcula a partir de la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1, la cantidad de proteína IRS1, y en donde dicho agente terapéutico se dirige a células cancerosas que expresan la proteína IRS1.
- 15        3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho agente terapéutico se dirige a proteína IRS1.
4. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la etapa de fraccionamiento de dicho digesto de proteínas antes de medir la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1.
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho digesto de proteínas comprende un digesto de proteasa.
- 20        6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el tejido es tejido incorporado en parafina.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde medir la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 en dicha muestra de tejido tumoral fijado en formol con la cantidad del mismo fragmento peptídico IRS1 en una muestra diferente y separada del paciente.
- 25        8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde medir la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico IRS1 en dicha muestra por comparación con un péptido de patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico IRS1 en la muestra se compara con un péptido de patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos; y en donde el péptido de patrón interno es un péptido isotópicamente marcado.