

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 977**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2012 PCT/US2012/056961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13044261**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2012 E 12832855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2758779**

54 Título: **Ensayo MRM/SRM para la proteína receptor de muerte 5**

30 Prioridad:

22.09.2011 US 201161538096 P

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

16.01.2018

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;
THYPARAMBIL, SHEENO y
LIAO, WEI-LIAO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 977 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 MRM/SRM para la proteína receptor de muerte 5

Introducción

5 La presente invención se refiere a un método para medir la cantidad de la proteína DR5 en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina.

Se proporcionan péptidos específicos derivados de subsecuencias de la proteína Receptor de Muerte 5 (DR5, por sus siglas en inglés). Las secuencias peptídicas y los iones de fragmentación/transición para cada péptido son particularmente útiles en un ensayo de Monitorización de Reacciones Seleccionadas (SRM, por sus siglas en inglés) basada en espectrometría de masas, que también se puede denominar ensayo de Monitorización de Reacciones Múltiples (MRM, por sus siglas en inglés). Dichos ensayos se denominan en la presente memoria SRM/MRM. Se describe el uso de péptidos para el análisis SRM/MRM cuantitativo de las proteínas DR5.

10 Este ensayo SRM/MRM se puede utilizar para medir niveles cuantitativos *relativos* o *absolutos* de uno o más de los péptidos específicos de la proteína DR5. Esto proporciona un medio para medir la cantidad de la proteína DR5 en una preparación de proteína dada obtenida a partir de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

Más específicamente, el ensayo SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisado de proteínas preparadas a partir de células obtenidas a partir de muestras de tejido de pacientes, tales como tejido de pacientes con cáncer fijado con formalina. Los métodos de preparación de muestras de proteínas de tejido fijado con formalina se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.473.532. Los métodos descritos en la Patente de EE.UU. N° 7.473.532 se pueden llevar a cabo convenientemente utilizando reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible de OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

Los resultados del ensayo SRM/MRM, donde las proteínas se analizan individual o simultáneamente, se pueden utilizar para correlacionar cantidades cuantitativas exactas y precisas de estas proteínas dentro de muestras de tejido específicas (p. ej., 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 a un médico u otro profesional médico determinar la terapia apropiada para el paciente con cáncer. Tal 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 un ensayo de *diagnóstico acompañante*. Por ejemplo, tal ensayo se puede diseñar para diagnosticar el estadio o grado de un cáncer y determinar un agente terapéutico al que es más probable que responda un paciente.

Peng D et al. (Peng D et al., Int. J. Cancer: 122, 1303-1310 (2008)) informan sobre un enfoque proteómico para la identificación de alteraciones en adenocarcinomas relacionados con Barrett.

Yang T et al. (Yang T et al., Chinese Journal of Cancer, March 2007, vol. 26, no. 3, pp 264-269) informan sobre un estudio mecanístico de Ciclina B1 antisentido en la inhibición de la tumorigénesis que utiliza técnicas proteómicas.

35 Walczak H et al. (Walczak H et al., The EMBO Journal, vol. 16, no. 17, pp 5386-5397, 1997) informan sobre TRAIL-R2 como un nuevo receptor mediador de apoptosis para TRAIL.

Compendio

El problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante el contenido de la reivindicación independiente adjunta. Las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

40 Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve mediante un método para medir la cantidad de proteína DR5 en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar el nivel de un fragmento peptídico de DR5 en un producto de digestión con proteasas de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína DR5 en dicha muestra, en donde el fragmento peptídico de DR5 es el péptido de SEQ ID NO: 1, y en donde la cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.

En una realización de la misma, el método comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión con proteasas antes de detectar y/o cuantificar el nivel de dicho fragmento peptídico de DR5, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida de fase nano inversa, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa.

50 En una realización de la misma, dicho producto de digestión con proteasas de dicha muestra biológica se prepara mediante el protocolo Liquid Tissue™.

En una realización de la misma, dicho producto de digestión con proteasas comprende una digestión con tripsina.

En una realización de la misma, dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem,

- espectrometría de masas de trampa de iones, espectrometría de masas de triple cuadrupolo, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI o espectrometría de masas de tiempo de vuelo, o cualquier combinación de las mismas, y en donde el método utilizado de espectrometría de masas es Monitorización de Reacciones Seleccionadas (SRM), Monitorización de Reacciones Múltiples (MRM) o Monitorización de Reacciones Seleccionadas múltiple (mSRM), o cualquier combinación de los mismos.
- 5 En una realización de la misma, el método comprende además cuantificar dicho fragmento peptídico de DR5.
- En una realización de la misma, dicho tejido se obtiene a partir de un tumor.
- 10 En una realización de la misma, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5 comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de DR5 en una muestra biológica diferente y separada.
- 15 En una realización de la misma, la cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en dicha muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de DR5 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos.
- En una realización de la misma, dicho péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados del grupo que consiste en ^{18}O , ^{17}O , ^{34}S , ^{15}N , ^{13}C , y ^2H , o combinaciones de los mismos.
- 20 En una realización de la misma, la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en dicho producto de digestión con proteasas indica la presencia de proteína DR5 modificada o no modificada y una asociación con cáncer en el sujeto.
- En una realización de la misma, el método comprende además correlacionar los resultados de detección y/o cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5, o la cantidad de la proteína DR5 con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 25 En una realización de la misma, se combina la correlación de los resultados de detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5, o la cantidad de la proteína DR5 con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer, con cantidades detectadas y/o cuantificadas de otras proteínas, o péptidos procedentes de otras proteínas, en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
- 30 En una realización de la misma, el método comprende además seleccionar para el sujeto, del que se obtiene la muestra biológica, un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 o la cantidad de proteína DR5.
- En una realización de la misma, el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células cancerosas que expresan proteína DR5.
- 35 Los ensayos de la invención tal como se define en las reivindicaciones miden niveles *relativos* o *absolutos* de un péptido específico no modificado de la proteína DR5 y también pueden medir niveles *absolutos* o *relativos* de un péptido modificado específico de la proteína DR5. Los ejemplos de modificaciones incluyen restos de aminoácidos fosforilados (p. ej., fosfotirosina, fosfoserina y fosfotreonina) y restos de aminoácidos glicosilados (p. ej., restos de asparagina glicosilada) que están presentes en los péptidos.
- 40 Los niveles cuantitativos *relativos* de la proteína DR5 se pueden determinar mediante la metodología SRM/MRM, por ejemplo, comparando las áreas de pico distintivo SRM/MRM (p. ej., el área de pico distintivo o la intensidad de iones de fragmentos integrados) del péptido de DR5 individual particular en diferentes muestras. Alternativamente, es posible comparar múltiples áreas de picos distintivos SRM/MRM para múltiples péptidos distintivos de DR5, donde cada péptido tiene su propio pico distintivo SRM/MRM específico, para determinar el contenido relativo de proteína DR5 en una muestra biológica con el contenido de proteína DR5 en una o más muestras biológicas adicionales o diferentes. De este modo, se determina la cantidad de un péptido particular, de la proteína DR5, y por lo tanto la cantidad de la proteína DR5, en relación con el mismo péptido de DR5 a través de 2 o más muestras biológicas bajo las mismas condiciones experimentales. Además, se puede determinar la cuantificación relativa para el péptido dado de la proteína DR5 dentro de una única muestra comparando el área de pico distintivo para ese péptido mediante metodología SRM/MRM con el área de pico distintivo para otro péptido diferente, o péptidos, de una proteína, o proteínas diferentes, dentro de la misma preparación de proteínas de la muestra biológica. De este modo, se determina la cantidad del péptido particular de la proteína DR5, y por lo tanto la cantidad de la proteína DR5, una respecto de la otra dentro de la misma muestra. Estas estrategias generan cuantificación del péptido individual de la proteína DR5 con la cantidad de otro péptido, o péptidos, entre muestras y dentro de muestras en donde las cantidades como se determina por el área de pico son relativas entre sí, independientemente de las cantidades de peso-volumen o de peso-peso absolutas del péptido de DR5 en la preparación de proteínas de la muestra biológica. Los datos cuantitativos relativos sobre áreas de pico distintivo individuales entre muestras diferentes se normalizan
- 55

5 con la cantidad de proteína analizada por muestra. La cuantificación relativa se puede realizar a través de muchos péptidos de múltiples proteínas y de la proteína DR5 simultáneamente en una muestra única y/o a través de muchas muestras para obtener información sobre cantidades relativas de proteína, de un péptido/proteína con respecto a otros péptidos/proteínas.

10 Los niveles cuantitativos *absolutos* de la proteína DR5 se determinan, por ejemplo, mediante la metodología SRM/MRM, por la cual se compara el área de pico distintivo SRM/MRM del péptido individual de la proteína DR5 en una muestra biológica con el área de pico distintivo SRM/MRM de un patrón interno "adicionado" añadido exógenamente. En una realización, el patrón interno es una versión sintética del mismo péptido exacto de DR5 que
15 contiene uno o más restos de aminoácidos marcados con uno o más isótopos pesados. Se sintetizan patrones internos marcados con isótopos adecuados de manera que cuando se analizan mediante espectrometría de masas, cada patrón genera un pico distintivo SRM/MRM predecible y consistente que es diferente y distinto del pico distintivo del péptido de DR5 nativo y que se puede utilizar como un pico de comparación. Así, cuando el patrón interno se adiciona en cantidad conocida a una preparación de proteínas de una muestra biológica y se analiza mediante espectrometría de masas, se puede comparar el área de pico distintivo SRM/MRM del péptido nativo de la muestra con el área de pico distintivo SRM/MRM del péptido patrón interno. Esta comparación numérica proporciona o la molaridad absoluta y/o el peso absoluto del péptido nativo presente en la preparación de la proteína original de la muestra biológica. Los datos cuantitativos absolutos para fragmentos peptídicos se muestran según la cantidad de
20 proteína analizada por muestra. La cuantificación absoluta se puede realizar a través de muchos péptidos y, por consiguiente proteínas, simultáneamente en una muestra única y/o a través de muchas muestras para obtener información sobre cantidades absolutas de proteínas en muestras biológicas individuales y en cohortes completas de muestras individuales.

25 El método de ensayo SRM/MRM de la invención como se define en las reivindicaciones se puede utilizar para ayudar al diagnóstico del estadio de cáncer, por ejemplo, directamente en tejido fijado con formalina derivado de paciente y para ayudar a determinar qué agente terapéutico sería más ventajoso para su uso en el tratamiento de ese paciente. Se analiza el tejido canceroso que se retira de un paciente ya sea mediante cirugía, tal como para la eliminación terapéutica de tumores parciales o enteros, o a través de procedimientos de biopsia realizados para determinar la presencia o ausencia de enfermedad sospechosa, para determinar si una proteína específica, o proteínas, y qué formas de proteínas, están o no presentes en ese tejido de paciente. Además, el nivel de expresión de una proteína, o de múltiples proteínas, se puede determinar y comparar con un nivel "normal" o nivel de referencia encontrado en tejido sano. Los niveles normales o de referencia de proteínas encontradas en tejido sano se pueden derivar, por ejemplo, de los tejidos relevantes de uno o más individuos que no tienen cáncer. Alternativamente, se pueden obtener niveles normales o de referencia para individuos con cáncer mediante análisis de tejidos relevantes no afectados por el cáncer.

35 Alternativamente, 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 proteína DR5 de la invención como se define en las reivindicaciones también se pueden utilizar para diagnosticar el estadio de cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de DR5. Los niveles de un péptido de DR5 individual se definen como la cantidad molar del péptido determinada por el ensayo SRM/MRM por la cantidad total de lisado de proteína analizado. La información con respecto a DR5 se puede por lo tanto utilizar para ayudar a determinar el estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína DR5 (o fragmentos de péptidos de la proteína DR5) con los niveles observados en tejidos normales.

45 Los ensayos de niveles de proteína DR5 de la invención como se define en las reivindicaciones también se pueden utilizar para diagnosticar el estadio de cáncer en un paciente o sujeto diagnosticado con cáncer empleando los niveles de DR5. Los niveles o cantidades de proteínas o péptidos se pueden definir como la cantidad expresada en moles, masa o peso de una proteína o péptido determinada por el ensayo SRM/MRM. El nivel o cantidad se puede normalizar para totalizar el nivel o cantidad de proteína u otro componente en el lisado analizado (p.ej., expresado en micromoles/microgramo de proteína o microgramos/microgramo de proteína). Además, el nivel o cantidad de una proteína o péptido se puede determinar en base al volumen, expresado, por ejemplo, en micromolar o nanogramos/microlitro. El nivel o cantidad de proteína o péptido como se determina mediante el ensayo SRM/MRM también se puede normalizar con el número de células analizadas. La información con respecto a DR5 se puede por lo tanto utilizar para ayudar a determinar el estadio o grado de un cáncer correlacionando el nivel de la proteína DR5 (o fragmentos peptídicos de la proteína DR5) con los niveles observados en tejidos normales.

55 Una vez que se ha determinado el estadio y/o grado, y/o las características de expresión de la proteína DR5 del cáncer, esa información se puede relacionar con una lista de agentes terapéuticos (químicos y biológicos) desarrollados para tratar específicamente tejido canceroso que se caracteriza por, ejemplo, expresión anormal de la proteína o proteínas (p. ej., DR5) que se ensayaron. Relacionar la información de un ensayo de proteína DR5 con una lista de agentes terapéuticos que se dirige específicamente, por ejemplo, a la proteína DR5 o células/tejido que expresan la proteína, define lo que se ha denominado un enfoque de *medicina personalizado* para tratar la enfermedad. Los métodos de ensayo de la invención como se define en las reivindicaciones constituyen el fundamento de un enfoque de *medicina personalizada* utilizando el análisis de proteínas del propio tejido del paciente como fuente de decisiones de diagnóstico y tratamiento. La proteína DR5 se puede analizar individualmente o en combinación con otras proteínas en un enfoque de medicina personalizada para diagnosticar y
60

tratar cáncer.

Estos y otros aspectos de la presente descripción serán evidentes para el experto en la técnica a la vista de la descripción que se expone a continuación.

5 Descripción detallada

El ensayo de Monitorización de Reacciones Seleccionadas/Monitorización de Reacciones Múltiples (SRM/MRM) se puede utilizar para medir niveles cuantitativos relativos o absolutos de uno o más de los péptidos específicos de la proteína DR5, individualmente, en combinaciones, o simultáneamente, y por lo tanto proporcionar un medio para medir la cantidad de la proteína DR5 en una preparación de proteína dada obtenida a partir de una muestra biológica mediante espectrometría de masas.

Más específicamente, el ensayo SRM/MRM puede medir estos péptidos directamente en muestras complejas de lisado de proteínas preparadas a partir de células adquiridas a partir de muestras de tejido de paciente, tales como tejido de pacientes con cáncer fijado con formalina. Los métodos para preparar muestras de proteínas a partir de tejido fijado con formalina se describen en la patente de EE.UU. N° 7.473.532. Los métodos descritos en la patente de EE.UU. N° 7.473.532 se pueden llevar a cabo convenientemente utilizando reactivos Liquid Tissue™ y el protocolo disponible de OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

La forma de tejidos más ampliamente y ventajosamente disponible de tejido de pacientes con cáncer es tejido fijado con formalina, embebido en parafina. La fijación con formaldehído/formalina de tejido retirado quirúrgicamente es, de lejos, el método más común de conservar muestras de tejido canceroso en todo el mundo y es la convención aceptada para la práctica patológica estándar. Las soluciones acuosas de formaldehído se denominan formalina. La formalina del "100%" consiste en una solución saturada de formaldehído (esto es aproximadamente 40% en volumen o 37% en masa) en agua, con una pequeña cantidad de estabilizante, normalmente metanol para limitar la oxidación y el grado de polimerización. La forma más común en la que se conserva el tejido es remojar el tejido entero durante periodos de tiempo prolongados (8 horas a 48 horas) en formaldehído acuoso, comúnmente denominado formalina tamponada neutra del 10%, seguido por embeber el tejido entero fijado en cera de parafina para almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Así, los métodos analíticos moleculares para analizar el tejido canceroso fijado con formalina serán los métodos más aceptados y utilizados para el análisis de tejido de pacientes con cáncer.

En principio, se puede utilizar cualquier péptido predicho derivado de la proteína DR5, preparado por ejemplo mediante digestión con una proteasa de especificidad conocida (p. ej., tripsina) como indicador alternativo para determinar la abundancia de proteína DR5 en una muestra que utiliza un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas. De manera similar, cualquier secuencia peptídica predicha que contiene un resto de aminoácido en un sitio que se conoce por estar potencialmente modificado en la proteína DR5 también se podría utilizar potencialmente para ensayar el grado de modificación de la proteína DR5 en una muestra.

Los fragmentos peptídicos de DR5 se pueden generar de varias maneras que incluyen utilizar el protocolo Liquid Tissue™ descrito en la Patente de EE.UU. 7.473.532. El protocolo y los reactivos de Liquid Tissue™ producen 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/muestra biológica. Los reactivos y protocolos adecuados también están disponibles comercialmente en OncoPlexDx (anteriormente Expression Pathology Inc., Rockville, MD).

En el protocolo Liquid Tissue™, la muestra de tejido/muestra biológica se calienta en un tampón durante un periodo de tiempo prolongado (p. ej., desde aproximadamente 80°C a aproximadamente 100°C durante un periodo 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, (p. ej., un tampón base Tris, o un tampón que contiene un detergente). Después del tratamiento térmico, la muestra de tejido/muestra biológica se trata con una o más proteasas que incluye, pero no se limita a, tripsina, quimiotripsina, pepsina y endoproteinasa Lys-C durante un tiempo suficiente para interrumpir el tejido y la estructura celular de dicha muestra biológica y licuar la muestra. Las condiciones ilustrativas para el tratamiento con proteasa son de 30 minutos a 24 horas a una temperatura de 37°C a 65°C. De forma ventajosa, se emplean endoproteasas, y particularmente combinaciones de dos o tres endoproteasas, utilizadas ya sea simultáneamente o secuencialmente, para licuar la muestra. Por ejemplo, combinaciones adecuadas de proteasas pueden incluir, pero no se limitan a, combinaciones de tripsina, endoproteinasa Lys-C y quimiotripsina, tales como tripsina y endoproteinasa Lys-C. El resultado del calentamiento y la proteólisis es un lisado biomoléculas líquido, soluble y diluible. De forma ventajosa, este lisado líquido está libre de materia sólida o particulada que se puede separar del lisado por centrifugación.

Sorprendentemente, se encontró que muchas secuencias peptídicas potenciales de la proteína DR5 son inadecuadas o ineficaces para el uso en ensayos SRM/MRM basados en espectrometría de masas por razones que no son inmediatamente evidentes. 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 Liquid Tissue™ reales para desarrollar un ensayo SRM/MRM fiable y preciso para la proteína DR5. Aunque no se desea

estar limitado por ninguna teoría, se cree que algunos péptidos podrían ser, por ejemplo, difíciles de detectar mediante espectrometría de masas porque no se ionizan bien o producen fragmentos que no son distintos de aquellos generados a partir de otras proteínas. Los péptidos también pueden fallar para resolver bien en separación (p. ej., cromatografía líquida), o pueden adherirse a artículos de vidrio o plástico, lo que conduce a resultados erróneos en el ensayo SRM/MRM.

Los péptidos de DR5 (por ejemplo, Tablas 1 y 2 a continuación) se derivaron de la proteína DR5 por digestión con proteasa de todas las proteínas dentro de un lisado complejo Liquid Tissue™ preparado a partir de células adquiridas a partir de tejido canceroso fijado con formalina. A menos que se indique lo contrario, en cada caso la proteasa era tripsina. El lisado Liquid Tissue™ se analizó luego mediante espectrometría de masas para determinar aquellos péptidos derivados de la proteína DR5 que se detectan y analizan mediante espectrometría de masas. La identificación de un subconjunto preferido específico de péptidos para análisis de espectrometría de masas se basa en: 1) determinación experimental de qué péptido o péptidos de una proteína se ionizan en análisis de espectrometría de masas de lisados Liquid Tissue™ y 2) la capacidad del péptido para sobrevivir al protocolo y condiciones experimentales utilizadas en la preparación de un lisado Liquid Tissue™. Esta última propiedad se extiende no sólo 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.

Los lisados de proteínas de células obtenidas directamente de tejido fijado con formalina (formaldehído) se prepararon utilizando los reactivos y el protocolo Liquid Tissue™. Esto implica la recogida de células en un tubo de ensayo mediante microdissección de tejidos seguido de calentamiento de las células en el tampón Liquid Tissue™ durante un período prolongado de tiempo. Una vez que la reticulación inducida por formalina ha sido afectada negativamente, el tejido/células se digieren entonces hasta completarse de una manera predecible que utiliza una proteasa, tal como, tripsina. El experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otras proteasas, y en particular, endoproteasas en lugar de, o además de, tripsina. Cada lisado de proteína se utilizó para preparar una colección de péptidos mediante digestión de polipéptidos intactos con la proteasa o combinación de proteasas. Se analizó cada lisado Liquid Tissue™ (p. ej., mediante espectrometría de masas con trampa de iones) para realizar múltiples estudios proteómicos globales de los péptidos donde se presentaron los datos como identificación de tantos péptidos como se podían identificar mediante espectrometría de masas de todas las proteínas celulares presentes en cada lisado de proteína. Se puede emplear un espectrómetro de masas de trampa de iones u otra forma de un espectrómetro de masas que sea capaz de realizar perfiles globales para la identificación de tantos péptidos como sea posible de un solo complejo de lisado de proteína/péptido. Sin embargo, los espectrómetros de masas de trampa de iones pueden ser el mejor tipo de espectrómetro de masas para conducir el perfil global de péptidos. Aunque los ensayos SRM/MRM se puede desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones o triple cuadrupolo, una plataforma instrumental para el ensayo SRM/MRM se considera a menudo una plataforma instrumental de triple cuadrupolo.

Una vez que se identificaron tantos péptidos como fue posible en un solo análisis de espectrometría de masas de un solo lisado bajo las condiciones empleadas, entonces se recopiló la lista de péptidos identificados y se utilizó para determinar las proteínas que se detectaron en ese lisado. Este proceso se repitió para múltiples lisados Liquid Tissue™, y la gran lista de péptidos se recopiló en un solo conjunto de datos. El conjunto de datos resultante representa los péptidos que se pueden detectar en el tipo de muestra biológica que se analizó (después de la digestión con proteasas) y específicamente en un lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica, y por lo tanto incluye los péptidos para proteínas específicas, tales como por ejemplo, la proteína DR5.

Los péptidos trípticos de DR5 identificados como útiles en la determinación de cantidades absolutas o relativas de la proteína DR5 incluyen uno o más, dos o más, o tres de los péptidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, cada uno de los cuales se muestran en la Tabla 1. Cada uno de esos péptidos se detectó mediante espectrometría de masas en lisados Liquid Tissue™ preparados a partir de tejido embebido en parafina fijado con formalina. Así, cada uno de los péptidos en la Tabla 1, o cualquier combinación de esos péptidos (p. ej., uno o más, dos o más, o tres de esos péptidos citados en la Tabla 1) son candidatos para el uso en el ensayo cuantitativo SRM/MRM para la proteína DR5 en muestras biológicas humanas, que incluye directamente en tejido de paciente fijado con formalina. La Tabla 2 muestra información adicional con respecto a los péptidos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia peptídica
SEQ ID NO: 1	LLVPANEGDPTETLR
SEQ ID NO: 2	IEDHLLSSGK
SEQ ID NO: 3	DASVHTLLDALETGER

Tabla 2

SEQ ID	Secuencia Peptídica	Masa Monoisotópica	Estado de carga del precursor	m/z del precursor	Transición m/z	Tipo de ion
SEQ ID NO: 1	LLVPANEGDPTETLR	1623,847	2	812,931	716,393	y ⁶
			2	812,931	888,442	y ⁸
			2	812,931	1017,484	y ⁹
			2	812,931	1131,527	y ¹⁰
			2	812,931	1299,617	y ¹²
SEQ ID NO:2	IEDHLLSSGK	1097,572	2	549,793	491,282	y ⁵
			2	549,793	604,366	y ⁶
			2	549,793	741,425	y ⁷
			2	549,793	856,452	y ⁸
SEQ ID NO: 3	DASVHTLLDALETGER	1838,937	2	920,4749756	888,478	
			2	920,4749756	1003,505	y ⁹
			2	920,4749756	1116,589	y ¹⁰
			2	920,4749756	1229,673	y ¹¹

5 Los péptidos trípticos de DR5 enumerados en la Tabla 1 incluyen aquellos detectados a partir de múltiples lisados Liquid Tissue™ de múltiples tejidos fijados con formalina diferentes de diferentes órganos humanos, que incluye próstata, colon y mama. Cada uno de esos péptidos se considera útil para el ensayo cuantitativo SRM/MRM de la proteína DR5 en tejido fijado con formalina. El análisis adicional de datos de estos experimentos indicó que no se observa preferencia para ningún péptido específico de ningún sitio específico del órgano. Así, se cree que cada uno de estos péptidos es adecuado para llevar a cabo ensayos SRM/MRM de la proteína SPARC en un lisado Liquid Tissue™ de cualquier tejido fijado con formalina que procede de cualquier muestra biológica o de cualquier parte de

10 órgano en el cuerpo.

Una consideración para llevar a cabo un ensayo SRM/MRM es el tipo de instrumento que se puede emplear en el análisis de los péptidos. Aunque el ensayo SRM/MRM se puede desarrollar y llevar a cabo en cualquier tipo de espectrómetro de masas, que incluye un MALDI, trampa de iones, o triple cuadrupolo, la plataforma instrumental más ventajosa para el ensayo SRM/MRM se considera a menudo una plataforma instrumental de triple cuadrupolo. Ese tipo de espectrómetro de masas se puede considerar el instrumento más adecuado para analizar un solo péptido diana aislado 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.

15

Con el fin de implementar más eficazmente un ensayo SRM/MRM para cada péptido derivado de la proteína DR5 es deseable utilizar información además de la secuencia peptídica en el análisis. Esta información adicional se puede utilizar para dirigir e instruir el espectrómetro de masas (p. ej., un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo), para realizar el análisis correcto y enfocado de péptido/s diana específico, tal que el ensayo se pueda realizar de manera efectiva.

20

La información adicional sobre péptidos diana en general, y sobre péptidos de DR5 específicos, puede incluir uno o más de la masa monoisotópica del péptido, su estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los iones de transición m/z y el tipo de ion de cada ion de transición. La información adicional de péptidos que se puede utilizar para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la proteína DR5 se muestra en la Tabla 2.

25

Los métodos descritos a continuación se pueden utilizar para: 1) identificar péptidos candidatos de la proteína DR5

que se pueden utilizar para un ensayo SRM/MRM basado en espectrometría de masas para la proteína DR5, 2) desarrollar ensayos, o ensayos multiplexados individuales SRM/MRM para el péptido diana de la proteína DR5 con el fin de correlacionarse con el cáncer y 3) aplicar ensayos de DR5 cuantitativos para el diagnóstico de cáncer y/o la elección de la terapia óptima para el cáncer.

Métodos de ensayo

I. Identificación de fragmentos peptídicos candidatos de SRM/MRM para la proteína DR5.

- a. Preparar un lisado de proteína Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina que utiliza una proteasa o proteasas (que puede o no incluir tripsina), para digerir proteínas.
- 10 b. Analizar todos los fragmentos proteicos en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem con trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína DR5, donde los fragmentos peptídicos individuales no contienen modificaciones peptídicas tales como fosforilaciones o glicosilaciones.
- 15 c. Analizar todos los fragmentos proteicos en el lisado Liquid Tissue™ en un espectrómetro de masas en tándem de trampa de iones e identificar todos los fragmentos peptídicos de la proteína DR5 que llevan modificaciones peptídicas tales como por ejemplo restos fosforilados o glicosilados.
- 20 d. Se pueden medir potencialmente todos los péptidos generados mediante un método de digestión específico de toda la proteína DR5, de longitud completa, 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 proteína Liquid Tissue™ complejo preparado a partir de una muestra biológica fijada con formalina.
- 25 e. Los péptidos que se modifican específicamente (fosforilados, glicosilados, etc.) en el tejido del paciente y que se ionizan, y así se detectan, en un espectrómetro de masas cuando se analiza un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina, se identifican como péptidos candidatos para ensayar modificaciones de péptidos de la proteína DR5.

II. Ensayo de espectrometría de masas para fragmentos peptídicos de la proteína DR5.

- a. El ensayo SRM/MRM en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo para fragmentos peptídicos individuales identificados en un lisado Liquid Tissue™ se aplica a péptidos de la proteína DR5.
 - 30 i. Determinar el tiempo de retención óptimo para un fragmento peptídico para condiciones cromatográficas óptimas que incluye, pero no se limita a, electroforesis en gel, cromatografía líquida, electroforesis capilar, cromatografía líquida en fase nano-inversa, cromatografía líquida de alta resolución o cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
 - 35 ii. Determinar la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor para cada péptido, el valor m/z del precursor para cada péptido, los iones de transición m/z para cada péptido y el tipo iónico de cada ión de transición para cada fragmento peptídico con el fin de desarrollar un ensayo SRM/MRM para cada péptido.
 - 40 iii. El ensayo SRM/MRM se puede llevar a cabo utilizando la información de (i) y (ii) en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo donde cada péptido tiene un pico distintivo SRM/MRM característico y único que define con precisión el único ensayo SRM/MRM realizado en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.
- b. Realizar el análisis SRM/MRM de modo que la cantidad del fragmento peptídico de la proteína DR5 que se detecta, en función del único área de pico distintivo SRM/MRM de un análisis de espectrometría de masas SRM/MRM, puede indicar tanto la cantidad relativa como la absoluta de la proteína DR5 en un lisado de proteína particular.
 - 45 i. La cuantificación relativa se puede lograr mediante:
 - 50 1. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína DR5 comparando el área de pico de distintivo SRM/MRM de un péptido de DR5 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con el mismo área de pico distintivo SRM/MRM del mismo fragmento peptídico de DR5 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. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína DR5 comparando el área de pico distintivo SRM/MRM de un péptido de DR5 dado detectado en un lisado Liquid Tissue™ de una muestra biológica fijada con formalina con áreas de pico distintivo SRM/MRM

desarrolladas a partir de fragmentos peptídicos de otras proteínas, en otras muestras derivadas de fuentes biológicas diferentes y separadas, donde la comparación del área de pico distintivo SRM/MRM entre las 2 muestras para un fragmento peptídico se normaliza a la cantidad de proteína analizada en cada muestra.

3. Determinación de la presencia aumentada o disminuida de la proteína DR5 comparando el área de pico distintivo SRM/MRM para un péptido de DR5 dado con las áreas de pico distintivo SRM/MRM de otros fragmentos peptídicos derivados de diferentes proteínas dentro del mismo lisado Liquid Tissue™ de la muestra biológica fijada con formalina con el fin de normalizar los niveles cambiantes de proteína DR5 a niveles de otras proteínas que no cambian sus niveles de expresión bajo diversas condiciones celulares.

4. Estos ensayos se pueden aplicar tanto a fragmentos peptídicos no modificados como a fragmentos peptídicos modificados de la proteína DR5, donde las modificaciones incluyen pero no se limitan a fosforilación y/o glicosilación, y donde los niveles relativos de péptidos modificados se determinan del mismo modo que la determinación de cantidades relativas de péptidos no modificados.

ii. La cuantificación absoluta de un péptido dado se puede lograr comparando el área de pico distintivo SRM/MRM para un fragmento peptídico dado de la proteína DR5 en una muestra biológica individual con el área de pico distintivo SRM/MRM de un patrón de fragmento peptídico interno añadido en el lisado de proteína de la muestra biológica.

1. El patrón interno es una versión sintética marcada del fragmento peptídico de la proteína DR5 que está siendo cuestionada. Este patrón se añade a una muestra en cantidades conocidas y se puede determinar el área del pico distintivo SRM/MRM tanto para el patrón de fragmento peptídico interno como para el fragmento peptídico nativo en la muestra biológica por separado, seguido por la comparación de ambas áreas de pico.

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

III. Aplicar la cuantificación de fragmento peptídico al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

a. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína DR5 y demostrar que la asociación previamente determinada, así entendida en el campo del cáncer, de la expresión de la proteína DR5 con el estadio/grado/estado del cáncer en el tejido tumoral del paciente está confirmada.

b. Realizar la cuantificación relativa y/o absoluta de los niveles de fragmentos peptídicos de la proteína DR5 individualmente, en combinaciones, o todos simultáneamente, 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 a través de estudios de correlación entre cohortes de pacientes y tejido de aquellos pacientes. Una vez que las correlaciones previamente establecidas o las correlaciones derivadas en el futuro son confirmadas mediante este ensayo, entonces el método de ensayo se puede utilizar para determinar la estrategia de tratamiento óptima.

La información que se muestra en la Tabla 2 es necesaria para desarrollar un ensayo SRM/MRM para la cuantificación de la proteína DR5 en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Las características específicas y únicas sobre estos péptidos de DR5 se desarrollaron por análisis de todos los péptidos de DR5 en unos espectrómetros de masas de trampa de iones y/o de triple cuadrupolo. Esa información incluye la masa monoisotópica del péptido, el estado de carga del precursor, el valor m/z del precursor, los valores de transición m/z del precursor y los tipos de iones de cada una de las transiciones identificadas. Esa información se debe determinar experimentalmente para cada uno de los péptidos candidatos SRM/MRM directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina; porque, curiosamente, no todos los péptidos de la proteína DR5 se pueden detectar en tales lisados que utilizan SRM/MRM como se describe en la presente memoria, que indica que los péptidos de DR5 no detectados no se pueden considerar péptidos candidatos para desarrollar un ensayo SRM/MRM para el uso en cuantificación de péptidos/proteínas directamente en lisados Liquid Tissue™ de tejido fijado con formalina.

Utilizando esta información, se pueden desarrollar ensayos cuantitativos SRM/MRM para la proteína DR5, y la evaluación de los niveles de proteína DR5 en tejidos basados en el análisis de tejido tumoral derivado de paciente fijado con formalina puede proporcionar información diagnóstica, pronóstica y terapéuticamente relevante sobre cada paciente con cáncer particular.

Esta descripción proporciona métodos para medir el nivel de la proteína DR5 en una muestra biológica, que comprende detectar y/o cuantificar la cantidad de uno o más fragmentos peptídicos de DR5 modificados o no modificados en un producto de digestión de proteínas preparado a partir de la muestra biológica que utiliza

5 espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína DR5 modificada o no modificada en la muestra; y en donde el nivel es un nivel relativo o un nivel absoluto. Esta descripción también proporciona un método para cuantificar uno o más fragmentos peptídicos de DR5, en donde el método comprende determinar la cantidad de uno o más de los fragmentos peptídicos de DR5 en una muestra biológica por comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde cada uno de los fragmentos peptídicos de DR5 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 estables pesados seleccionados entre ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.

10 Los métodos para medir los niveles de la proteína DR5 en una muestra biológica se describen en la presente memoria (o fragmentos peptídicos como sustitutos de los mismos) son útiles como indicadores de diagnóstico de cáncer en un paciente o sujeto. Los resultados de las mediciones de niveles de la proteína DR5 se pueden emplear para determinar el estadio/grado/estado de diagnóstico de un cáncer correlacionando (p. ej., comparando) el nivel de proteína DR5 encontrado en un tejido con el nivel de estas proteínas encontradas en los tejidos normales y/o

15 cancerosos o precancerosos.

Realizaciones

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el producto de digestión comprende un producto de digestión con proteasas.

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

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

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

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

25 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el fragmento peptídico de DR5 es un fragmento peptídico de DR5 modificado o no modificado.

También se describe una composición que comprende uno, dos o tres de los péptidos en la Tabla 1 o anticuerpos de los mismos, dicha composición que excluye opcionalmente uno, dos, tres o más péptidos de DR5 que no son péptidos de SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3.

30 La composición puede comprender dos, o tres de los péptidos de la Tabla 2 o anticuerpos de los mismos.

Lista de secuencias

<110> Expression Pathology Inc.

35 <120> Ensayo MRM/SRM para la Proteína Receptor de Muerte 5

<130> 01552 DR5

<150> US 61/538,096

40 <151> 2011-09-22

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

45 <210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 1

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

55 <210> 2

<211> 10

ES 2 649 977 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 2

Ile Glu Asp His Leu Leu Ser Ser Gly Lys
1 5 10

10 <210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 3

Asp Ala Ser Val His Thr Leu Leu Asp Ala Leu Glu Thr Leu Gly Glu
1 5 10 15

Arg

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la cantidad de la proteína DR5 en una muestra biológica humana de tejido fijado con formalina, que comprende detectar y/o cuantificar el nivel de un fragmento peptídico de DR5 en un producto de digestión con proteasas de dicha muestra biológica utilizando espectrometría de masas; y calcular el nivel de proteína DR5 en dicha muestra, en donde el fragmento peptídico de DR5 es el péptido de SEQ ID NO: 1, y en donde la cantidad es una cantidad relativa o una cantidad absoluta.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionar dicho producto de digestión con proteasa antes de detectar y/o cuantificar el nivel de dicho fragmento peptídico de DR5, en donde dicha etapa de fraccionamiento se selecciona del grupo que consiste en cromatografía líquida, cromatografía líquida en fase nano-inversa, cromatografía líquida de alta resolución, y cromatografía líquida de alta resolución inversa.
3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicho producto de digestión con proteasa de dicha muestra biológica se prepara mediante el protocolo Liquid Tissue™.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho producto de digestión con proteasa comprende un producto de digestión con tripsina.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicha espectrometría de masas comprende espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas con trampa de iones, espectrometría de masas de triple cuadrupolo, espectrometría de masas MALDI-TOF, espectrometría de masas MALDI o espectrometría de masas de tiempo de vuelo, o cualquier combinación de las mismas, y en donde el método de espectrometría de masas utilizado es la Monitorización de Reacciones Seleccionadas (SRM), la Monitorización de Reacciones Múltiples (MRM) o la Monitorización de Reacciones Seleccionadas múltiple (mSRM), o cualquier combinación de las mismas.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además cuantificar dicho fragmento peptídico de DR5.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde dicho tejido se obtiene a partir de un tumor.
8. El método de la reivindicación 6, en donde la cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5 comprende comparar la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en una muestra biológica con la cantidad del mismo fragmento peptídico de DR5 en una muestra biológica diferente y separada.
9. El método de la reivindicación 6, en donde la cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5 comprende determinar la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en dicha muestra biológica mediante comparación con un péptido patrón interno añadido de cantidad conocida, en donde dicho fragmento peptídico de DR5 en la muestra biológica se compara con un péptido patrón interno que tiene la misma secuencia de aminoácidos.
10. El método de reivindicación 9, en donde dicho péptido patrón interno es un péptido marcado isotópicamente que comprende uno o más isótopos estables pesados seleccionados del grupo que consiste en ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁴S, ¹⁵N, ¹³C, ²H o combinaciones de los mismos.
11. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 en dicho producto de digestión con proteasas indica la presencia de proteína DR5 modificada o no modificada y una asociación con el cáncer en el sujeto.
12. El método de reivindicación 11, que comprende además correlacionar los resultados de detección y/o cuantificación de dicho fragmento peptídico de DR5, o la cantidad de la proteína DR5 con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
13. El método de reivindicación 12, en donde la correlación de los resultados de detección y/o cuantificación de la cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5, o la cantidad de la proteína DR5 con el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer se combina con las cantidades detectadas y/o cuantificadas de otras proteínas, o péptidos de otras proteínas, en un formato múltiple para proporcionar información adicional sobre el estadio/grado/estado de diagnóstico del cáncer.
14. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además seleccionar para el sujeto, del que se obtiene la muestra biológica, un tratamiento basado en la presencia, ausencia o cantidad de dicho fragmento peptídico de DR5 o la cantidad de proteína DR5.
15. El método de reivindicación 14, en donde el tratamiento o el agente terapéutico se dirige a células cancerosas que expresan proteína DR5.