



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 637**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01922739 .6**

96 Fecha de presentación : **27.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1272665**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Composiciones y métodos para identificar y marcar células cancerosas originadas en el tubo digestivo.**

30 Prioridad: **27.03.2000 US 192229 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2010

73 Titular/es: **Thomas Jefferson University
Office of Technology Transfer
1020 Locust Street, Room M6
Philadelphia, Pennsylvania 19107-6799, US**

72 Inventor/es: **Waldman, Scott, A.;
Park, Jason y
Schulz, Stephanie**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Composiciones y métodos para identificar y marcar células cancerosas originadas en el tubo digestivo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico *in vitro* para detectar células cancerosas del canal alimentario, en particular cáncer de estómago y esofágico primario y metastático, y a kits y reactivos para realizar dichos métodos. La presente invención se refiere a compuestos y a métodos para la formación de imágenes *in vivo* y para el tratamiento de tumores que se originan en el canal alimentario, en particular de tumores de estómago y esofágicos primarios y metastáticos. La presente invención se refiere a métodos y a composiciones para fabricar y utilizar composiciones de fármacos, antisentido y de terapia génica dirigidas.

15 **Antecedentes de la invención**

Son necesarios reactivos, kits y métodos para seleccionar, diagnosticar y controlar individuos con cáncer que se origina en el canal alimentario, en particular cáncer de estómago y esofágico primario y metastático. Son necesarios reactivos, kits y métodos para identificar y confirmar que un cáncer de origen desconocido se origina en el canal alimentario, y para analizar muestras de tejido y de cáncer para identificar y confirmar un cáncer que se origina en el canal alimentario y para determinar el nivel de migración de dichas células cancerosas. Son necesarias composiciones que puedan dirigirse de modo específico a células de cáncer de estómago y esofágico. Son necesarios agentes de formación de imágenes que puedan unirse de modo específico a células de cáncer de estómago y esofágico. Son necesarios métodos mejorados para la formación de imágenes de células de cáncer de estómago y esofágico. Son necesarios agentes terapéuticos que puedan unirse de modo específico a células de cáncer de estómago y esofágico. Son necesarios métodos mejorados para tratar individuos sospechosos de padecer cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. Es necesaria una composición de vacuna para tratar el cáncer de estómago y esofágico. Es necesaria una composición de vacuna para tratar y prevenir el cáncer de estómago y esofágico. Son necesarios agentes terapéuticos que puedan transportar de modo específico compuestos terapéuticos génicos, compuestos antisentido y otros fármacos a las células de cáncer de estómago y esofágico.

Sumario de la invención

La descripción se refiere también a métodos *in vitro* para determinar si un individuo padece o no un cáncer que se origina en el canal alimentario, en particular cáncer de estómago y esofágico primario y metastático. La presente descripción se refiere a métodos *in vitro* para estudiar muestras de tejido no colorrectal y de fluidos corporales procedentes de un individuo para determinar si la GCC, que es expresada por células de colon normales y por células de tumor colorrectal, de estómago y esofágico, está siendo expresada o no por las células en muestras que no sean de colon. La presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC en muestras obtenidas fuera del tracto colorrectal es indicativa de la expresión de GCC, y es la prueba de que el individuo puede estar padeciendo un cáncer de colon metastatizado, o un cáncer de estómago y/o esofágico primario o metastático. En pacientes sospechosos de padecer un cáncer colorrectal, la presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC en muestras obtenidas fuera del tracto colorrectal apoya la conclusión de que el individuo padece cáncer colorrectal metastático. El diagnóstico del cáncer colorrectal metastático puede realizarse o confirmarse. En pacientes sospechosos de padecer cáncer de estómago o esofágico, la presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC en muestras obtenidas fuera del tracto colorrectal apoya la conclusión de que el individuo padece cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. El diagnóstico del cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático puede realizarse o confirmarse.

La descripción se refiere además a métodos *in vitro* para determinar si células tumorales sospechosas de ser cáncer de estómago o esofágico tienen un origen en el estómago o esofágico. La presente descripción se refiere a métodos *in vitro* para diagnosticar si un individuo sospechoso de padecer cáncer de estómago o esofágico padece cáncer de estómago o esofágico. La presente descripción se refiere a métodos *in vitro* para estudiar muestras de tumores procedentes de un individuo para determinar si la proteína GCC, que es expresada por células de tumor colorrectal, de estómago o esofágico, está siendo expresada o no por las células tumorales. La presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC en una muestra procedente de un paciente sospechoso de padecer cáncer de estómago o esofágico es indicativa de la expresión de GCC, y es la prueba de que el individuo puede estar padeciendo un cáncer de estómago o esofágico. En tumores sospechosos de ser tumores de estómago o esofágicos, la presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC apoya la conclusión de que los tumores son de cáncer de estómago o esofágico y el diagnóstico de cáncer de estómago o esofágico.

La descripción se refiere también a kits *in vitro* para practicar los métodos de la invención, y a reactivos y composiciones útiles como componentes en dichos kits *in vitro* de la invención.

Descripción de las realizaciones preferidas*Definiciones*

- 5 Tal como se emplea en la presente, el término “GCC” se refiere a la proteína celular expresada por células colorrectales normales, así como a células de cáncer colorrectal, de estómago y esofágico primario y metastatizado. En individuos normales, la GCC se encuentra exclusivamente en células del intestino, en particular en células del duodeno, del intestino delgado (yeyuno e íleon), del intestino grueso, del colon (ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide) y del recto.
- 10 Tal como se emplea en la presente, la expresión “fragmento funcional” tal como se emplea en la expresión “fragmento funcional de una transcripción del gen GCC” se refiere a fragmentos de la transcripción del gen GCC que son funcionales con respecto a moléculas de ácido nucleico con secuencias de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento funcional puede ser útil como sonda oligonucleotídica o de ácido nucleico, cebador, oligonucleótido antisentido o molécula de ácido nucleico o secuencia codificadora. La secuencia de nucleótidos que codifica proteínas GCC humanas se describe en F.J. Sauvage *et al.*, 1991, J. Biol. Chem., 266:17912-17918.
- 15 Tal como se emplea en la presente, la expresión “fragmento funcional” tal como se emplea en la expresión “fragmento funcional de una proteína GCC” se refiere a fragmentos de la proteína GCC que actúan de la misma manera que la proteína GCC con secuencias de longitud completa. Por ejemplo, un fragmento inmunogénicamente funcional de una proteína GCC comprende un epítipo reconocido por un anticuerpo anti-GCC. Un fragmento funcional de unión al ligando de GCC comprende una secuencia que forma una estructura que puede unirse a un ligando que reconoce y se une a la proteína GCC.
- 20 Tal como se emplea en la presente, la expresión “epítipo reconocido por un anticuerpo anti-proteína GCC” se refiere a los epítopos que son reconocidos de modo específico por un anticuerpo anti-proteína GCC.
- 25 Tal como se emplea en la presente, el término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos completos e intactos, y a sus fragmentos Fab y F(ab)₂. Los anticuerpos completos e intactos incluyen anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.
- 30 Tal como se emplea en la presente, la expresión “ligando de GCC” se refiere a compuestos que se unen de modo específico a una proteína GCC. Los anticuerpos que se unen a GCC son ligandos de GCC. Un ligando de GCC puede ser una proteína, un péptido o un no péptido.
- 35 Tal como se emplea en la presente, la expresión “agente activo” se refiere a compuestos que son agentes terapéuticos o agentes de formación de imágenes.
- 40 Tal como se emplea en la presente, el término “radioestable” se refiere a compuestos que no sufren descomposición radiactiva, es decir, compuestos que no son radiactivos.
- Tal como se emplea en la presente, la expresión “agente terapéutico” se refiere a compuestos quimioterapéuticos, toxinas, compuestos radioterapéuticos, agentes de transporte dirigido o agentes radiosensibilizantes.
- 45 Tal como se emplea en la presente, la expresión “compuesto quimioterapéutico” se refiere a compuestos que cuando se ponen en contacto con y/o se incorporan a una célula, producen un efecto en la célula que incluye provocar la muerte de la célula, inhibir la división de la célula o inducir la diferenciación.
- 50 Tal como se emplea en la presente, el término “toxina” se refiere a compuestos que cuando se ponen en contacto con y/o se incorporan en una célula producen la muerte de la célula.
- Tal como se emplea en la presente, la expresión “compuesto radioterapéutico” se refiere a radionúclidos que cuando se ponen en contacto con y/o se incorporan en una célula producen la muerte de la célula.
- 55 Tal como se emplea en la presente, la expresión “agente de transporte dirigido” se refiere a compuestos que pueden ser unidos y/o que pueden reaccionar con otros compuestos. Los agentes de transporte dirigido pueden emplearse para transportar compuestos quimioterapéuticos, toxinas, enzimas, compuestos radioterapéuticos, anticuerpos o agentes de formación de imágenes a células que tienen agentes de transporte dirigido asociados a ellas y/o para convertir o transformar de otra forma o potenciar a agentes activos coadministrados. Un agente de transporte dirigido puede
- 60 incluir un resto que constituye un primer agente que se transporta a la célula que, cuando se pone en contacto con un segundo agente, se convierte en un tercer agente que tiene la actividad deseada o provoca la conversión del segundo agente en un agente con la actividad deseada. El resultado es que el agente localizado facilita la exposición de un agente con una actividad deseada a la célula cancerosa.
- 65 Tal como se emplea en la presente, la expresión “agente radiosensibilizante” se refiere a agentes que aumentan la susceptibilidad de células a los efectos dañinos de la radiación ionizante. Un agente radiosensibilizante permite administrar unas dosis más bajas de radiación y aún proporciona una dosis terapéuticamente eficaz.

ES 2 346 637 T3

Tal como se emplea en la presente, la expresión “agente de formación de imágenes” se refiere a compuestos que pueden detectarse.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión “resto de unión a GCC” se refiere a la porción de un compuesto conjugado que constituye un ligando de GCC.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “resto activo” se refiere a la porción de un compuesto conjugado que constituye un agente activo.

10 Tal como se emplea en la presente, las expresiones “compuesto conjugado” y “composición conjugada” se utilizan de modo intercambiable y se refieren a un compuesto que comprende un resto de unión a GCC y un resto activo, y que es capaz de unirse a GCC. Los compuestos conjugados según la presente invención comprenden una porción que constituye un ligando de GCC y una porción que constituye un agente activo. Por tanto, los compuestos conjugados
15 según la presente invención son capaces de unirse de modo específico a la GCC e incluyen una porción que es un agente terapéutico o un agente de formación de imágenes. Las composiciones conjugadas pueden comprender reticulantes y/o moléculas que actúan como espaciadores entre los restos.

20 Tal como se emplea en la presente, el término y las expresiones “reticulante”, “agente reticulante”, “agente conjugante”, “agente de acoplamiento”, “reactivo de condensación” y “reticulante bifuncional” se utilizan de modo intercambiable y se refieren a grupos moleculares que se emplean para unir el ligando de GCC y el agente activo para formar, de esta manera, el compuesto conjugado.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión “cáncer colorrectal” incluye la definición médica bien aceptada que define el cáncer colorrectal como un trastorno médico caracterizado por un cáncer de células del tracto intestinal por debajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el colon sigmoide, y el recto). Además, tal como se emplea en la presente, la expresión “cáncer colorrectal” incluye también trastornos médicos que se caracterizan por un cáncer de células del duodeno y del intestino delgado (yeyuno e íleon). La definición de cáncer colorrectal empleada en la presente es
30 más amplia que la definición médica habitual, pero se proporciona como tal puesto que las células del duodeno y del intestino delgado también contienen GCC.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “cáncer de estómago” incluye la definición médica bien aceptada que define el cáncer de estómago como un trastorno médico caracterizado por un cáncer de células del estómago.

35 Tal como se emplea en la presente, la expresión “cáncer esofágico” incluye la definición médica bien aceptada que define el cáncer esofágico como un trastorno médico caracterizado por un cáncer de células del esófago.

40 Tal como se emplea en la presente, el término “metástasis” se refiere al proceso en el que células cancerosas que se originan en un órgano o una parte del cuerpo se trasladan a otra parte del cuerpo y continúan replicándose. Las células metastatizadas posteriormente forman tumores que también pueden metastatizar. Por tanto, la metástasis se refiere a la propagación del cáncer desde la parte del cuerpo en que aparece originariamente hacia otras partes del cuerpo.

45 Tal como se emplea en la presente, la expresión “células de cáncer colorrectal metastatizadas” se refiere a células de cáncer colorrectal que se han metastatizado. Las células de cáncer colorrectal metastatizadas se localizan en una parte del cuerpo que no sea el duodeno, el intestino delgado (yeyuno e íleon), el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el colon sigmoide, y el recto.

50 Tal como se emplea en la presente, la expresión “células de cáncer de estómago metastatizadas” se refiere a células de cáncer de estómago que se han metastatizado. Las células de cáncer de estómago metastatizadas se localizan en una parte del cuerpo que no sea el estómago.

55 Tal como se emplea en la presente, la expresión “células de cáncer esofágico metastatizadas” se refiere a células de cáncer colorrectal que se han metastatizado. Las células de cáncer esofágico metastatizadas se localizan en una parte del cuerpo que no sea el esófago.

60 Tal como se emplea en la presente, las expresiones “muestra no colorrectal” y “muestra extraintestinal” se utilizan de modo intercambiable y se refieren a una muestra de tejido o de fluido corporal procedente de una fuente que no sea tejido colorrectal. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de un tejido, tal como nódulos linfáticos. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de un tejido extraintestinal que es un adenocarcinoma de origen no confirmado. En algunas realizaciones preferidas, la muestra no colorrectal es una muestra de sangre.

65 Tal como se emplea en la presente, la expresión “un individuo que padece un adenocarcinoma de origen no confirmado” se refiere a un individuo que tiene un tumor cuyo origen no ha sido identificado de modo definitivo.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “un individuo sospechoso de ser susceptible al cáncer de estómago o esofágico” se refiere a un individuo que tiene un riesgo particular de desarrollar cáncer de estómago o esofágico. Los ejemplos de individuos que tienen un riesgo particular de desarrollar cáncer de estómago o esofágico son aquellos

cuya historia médica familiar indica una incidencia por encima de la media de cáncer de estómago o esofágico entre miembros de la familia y/o aquellos que ya han desarrollado cáncer de estómago o esofágico y que han sido tratados de modo eficaz y que, por tanto, se enfrentan a un riesgo de recaída y recurrencia.

5 Tal como se emplea en la presente, las expresiones “composición antisentido” y “moléculas antisentido” se utilizan de modo intercambiable y se refieren a compuestos que regulan la transcripción o la traducción hibridándose al ADN o ARN e inhibiendo y/o evitando que la transcripción o la traducción se produzca. Las moléculas antisentido incluyen moléculas de ácidos nucleicos y sus derivados y análogos. Las moléculas antisentido se hibridan con el ADN o ARN del mismo modo que lo hacen las secuencias de nucleótidos complementarias, independientemente de si la molécula
10 antisentido es una molécula de ácido nucleico o un derivado o análogo. Las moléculas antisentido pueden inhibir o prevenir la transcripción o la traducción de genes cuya expresión está ligada al cáncer.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “inmunógeno de GCC” se refiere a una proteína GCC o su fragmento, o una proteína que comprende éstos o su producto haptenizado, a células y partículas que muestran al
15 menos un epitopo de GCC, y a células haptenizadas y partículas haptenizadas que muestran al menos un epitopo de GCC.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “vector de expresión recombinante” se refiere a un plásmido, un fago, una partícula vírica u otro vector que, cuando se introduce en el hospedante apropiado, contiene los elementos
20 genéticos necesarios para dirigir la expresión de la secuencia codificadora que codifica la proteína. La secuencia codificadora está unida operablemente a las secuencias reguladoras necesarias. Los vectores de expresión son muy conocidos y están disponibles con facilidad. Los ejemplos de vectores de expresión incluyen plásmidos, fagos, vectores víricos y otras moléculas de ácidos nucleicos o vehículos que contienen moléculas de ácidos nucleicos útiles para transformar células hospedantes y facilitar la expresión de secuencias codificadoras.

25 Tal como se emplea en la presente, la expresión “transcripción ilegítima” se refiere a la expresión de bajo nivel o de fondo de genes específicos de tejido en células de otros tejidos. El fenómeno de la transcripción ilegítima por tanto proporciona copias de ARNm para una transcripción específica de tejido en otros tejidos. Si las técnicas de detección empleadas para detectar la expresión génica son suficientemente sensibles para detectar la transcripción ilegítima,
30 el nivel de expresión de la transcripción en muestras negativas debido a la transcripción ilegítima debe descontarse utilizando controles y/o ensayos cuantitativos y/o otros medios para eliminar la incidencia de falsos positivos debido a la transcripción ilegítima. Como alternativa, la detección de pruebas de la expresión del gen de GCC en una muestra se logra sin detectar la transcripción del gen de GCC presente debido a la transcripción ilegítima. Esto se logra utilizando técnicas que no sean suficientemente sensibles para detectar la transcripción del gen de GCC presente debido a la
35 transcripción ilegítima, que está presente como fondo.

La patente de EEUU nº 5.518.888, otorgada el 21 de mayo, 1996, la patente de EEUU nº 5.601.990, otorgada el 11 de febrero, 1997, la patente de EEUU nº 6.060.037, otorgada el 26 de abril, 2000, la patente de EEUU nº 5.962.220, otorgada el 5 de octubre, 1999, la patente de EEUU nº 5.879.656, otorgada el 9 de marzo, 1999, y la solicitud de patente
40 de EEUU nº de serie 09/180.237, presentada el 12 de marzo, 1997, se refieren a receptores de ST de transporte dirigido para tratar, formar imágenes, detectar y vacunar contra el cáncer colorrectal metastatizado. Ahora se ha descubierto que las células de cáncer de estómago y esofágico primario y metastatizado expresan receptores de ST (GCC). Por consiguiente, las composiciones y los métodos descritos en las patentes y la solicitud mencionadas anteriormente pueden utilizarse para tratar, formar imágenes, detectar y vacunar contra el cáncer de estómago y esofágico primario y
45 metastatizado. La presente invención adapta la invención anterior, relacionada con el cáncer colorrectal metastatizado, para tratar, formar imágenes, detectar y vacunar contra el cáncer de estómago y esofágico primario y metastatizado.

GCC

50 Los carcinomas derivados de células colorrectales, de estómago o de esófago expresan GCC. La expresión de GCC por parte de estos tumores permite que esta proteína y su ARNm sean biomarcadores específicos para la presencia de células cancerosas en tejidos extraintestinales y en la sangre. En efecto, esta característica permite que la detección de ARN de GCC mediante un análisis de RT-PCR sea un ensayo de diagnóstico para la estadificación clínica de pacientes con cáncer colorrectal, de estómago o esofágico y para hacer un seguimiento a pacientes después de una cirugía para
55 buscar pruebas de enfermedad recurrente en su sangre, así como para detectar cánceres colorrectales, de estómago y esofágicos. Además, la GCC puede dirigirse con un ligando conjugado a un agente activo para transportar el agente activo hasta las células tumorales *in vivo*.

El documento WO 95/11694 indica que tumores colorrectales metastatizados pueden ser fijados como diana para
60 el transporte de compuestos activos mediante el transporte dirigido a receptores de ST (también denominado guanilina ciclase C o GCC). La presencia de receptores de ST sobre células fuera del tracto intestinal como marcador para el cáncer colorrectal permite la selección, la identificación y el tratamiento de individuos con tumores colorrectales metastatizados. Los receptores de ST también pueden utilizarse el transporte dirigido de compuestos terapéuticos génicos y de compuestos antisentido a células colorrectales.

65 El documento WO 97/42506 indica que la detección de pruebas de la expresión de receptores de ST en muestras de tejido y fluidos corporales procedentes de fuera del tracto intestinal indica un cáncer colorrectal metastatizado.

El documento WO 97/42220 indica que pueden utilizarse inmunógenos con epitopos que pueden ser la diana de anticuerpos que reaccionan con receptores de ST, en composiciones de vacunas útiles como composiciones anticáncer colorrectal metastático profilácticas y terapéuticas.

Se ha descubierto que, además de las células de colon normales, las células de carcinoma de colon, de estómago y esofágico primario y metastatizado también expresan GCC. Las células normales de estómago y esofágicas no expresan GCC. Por tanto, la presente invención proporciona el uso de GCC como marcador de diagnóstico molecular específico para el diagnóstico, la estadificación clínica y la vigilancia postoperatoria de pacientes con cáncer de estómago y esofágico primario y metastatizado.

Puede emplearse la detección de la expresión de GCC empleando técnicas moleculares, que incluyen pero no se limitan a RT-PCR, para el diagnóstico y la estadificación clínica de paciente, para hacer un seguimiento del desarrollo de recurrencia después de una cirugía y/o de remisión y, potencialmente, para seleccionar personas normales para el desarrollo de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico.

La GCC es exclusiva porque sólo se expresa en células intestinales normales. Las células mucósicas que tapizan el intestino se unen entre sí mediante uniones estrechas que forman una barrera contra el paso de los contenidos intestinales hacia la corriente sanguínea y de los componentes de la corriente sanguínea hacia el lumen intestinal. Por tanto, la localización apical de células que expresan GCC da como resultado el aislamiento de dichas células del sistema circulatorio, de manera que puede considerarse que existen de forma separada al resto del cuerpo; fundamentalmente, “fuera” del cuerpo. Por tanto, el resto del cuerpo se considera “fuera” del tracto intestinal. Las composiciones administradas “fuera” del tracto intestinal se mantienen aparte y segregadas de las únicas células que normalmente expresan GCC. A la inversa, las muestras de tejidos tomadas de tejidos fuera del tracto intestinal normalmente no contienen células que expresan GCC.

En individuos que padecen cáncer colorrectal, las células cancerosas a menudo se derivan de células que producen y presentan la GCC, y estas células cancerosas continúan produciendo GCC. Se ha observado que la GCC es expresada por células de cáncer colorrectal. De forma similar, la GCC es expresada por células de cáncer de estómago y esofágico.

La expresión de GCC por células de tumor colorrectal proporciona una diana detectable para la selección *in vitro*, el control y la estadificación clínica, así como una diana para el transporte dirigido *in vivo* de composiciones conjugadas que comprenden agentes activos para la formación de imágenes y para el tratamiento. La GCC también puede actuar como diana para vacunas que pueden utilizarse para proteger contra el cáncer colorrectal metastatizado o para tratar individuos con cáncer colorrectal metastatizado.

La expresión de GCC por células de tumor de estómago y esofágico proporciona una diana detectable para la selección *in vitro*, el control y la estadificación clínica, así como una diana para el transporte dirigido *in vivo* de composiciones conjugadas que comprenden agentes activos para la formación de imágenes y para el tratamiento. La GCC también puede actuar como diana para vacunas que pueden utilizarse para proteger contra el cáncer de estómago y esofágico primario y metastatizado o para tratar individuos con cáncer de estómago y esofágico primario y metastatizado.

Diagnóstico *in vitro*

Según algunas realizaciones de la invención, se proporcionan composiciones, kits y métodos *in vitro* para seleccionar, diagnosticar y analizar pacientes y muestras de pacientes para detectar pruebas de la expresión de GCC por células fuera del tracto intestinal, en los que la expresión de GCC puede sugerir la existencia de cáncer colorrectal metastatizado o de cáncer de estómago o esofágico primario o metastatizado. En pacientes sospechosos de padecer cáncer de estómago o esofágico primario o metastatizado, las pruebas de la expresión de GCC por células fuera del tracto intestinal son indicativas de cáncer de estómago o esofágico primario o metastatizado, y pueden utilizarse para el diagnóstico, el control y la estadificación clínica de dichos pacientes. Además, la presente invención se refiere a métodos, composiciones y kits útiles para la selección *in vitro*, y el análisis de pacientes y de muestras de pacientes para detectar pruebas de la expresión de GCC por células fuera del tracto intestinal, en los que la presencia de células que expresan GCC sugiere o confirma que el tumor tiene su origen en un cáncer colorrectal, o de estómago o esofágico. En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones, kits y métodos que son útiles para visualizar células de cáncer de estómago o esofágico primario o metastático.

Las composiciones, métodos y kits de diagnóstico y selección *in vitro* pueden utilizarse para controlar individuos que están en grupos de alto riesgo de padecer cáncer de estómago o esofágico, tales como los que han sido diagnosticados con una enfermedad localizada y/o una enfermedad metastatizada y/o aquellos que están genéticamente conectados a la enfermedad. Las composiciones, los métodos y los kits de diagnóstico y de selección *in vitro* pueden utilizarse para controlar individuos que están sufriendo y/o que han sido tratados de cáncer de estómago o esofágico primario para determinar si el cáncer ha metastatizado. Las composiciones, los métodos y los kits de diagnóstico y de selección *in vitro* pueden utilizarse para controlar individuos que están sufriendo y/o que han sido tratados de cáncer de estómago o esofágico primario para determinar si el cáncer ha sido eliminado. Las composiciones, los métodos y los kits de diagnóstico y de selección *in vitro* pueden utilizarse para controlar individuos que son susceptibles de otra manera, es decir, individuos que han sido identificados como genéticamente predispuestos, tal como mediante selec-

ción genética y/o historias familiares. Los avances en la comprensión de la genética y los desarrollos en la tecnología, así como en la epidemiología, permiten la determinación de la probabilidad y la evaluación del riesgo que tiene un individuo de desarrollar cáncer de estómago o esofágico. Utilizando las historias sanitarias familiares y/o la selección genética es posible estimar la probabilidad que tiene un individuo concreto de desarrollar ciertos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de estómago o esofágico. Los individuos que se han identificado como predispuestos a desarrollar una forma concreta de cáncer pueden controlarse o seleccionarse para detectar pruebas de cáncer de estómago o esofágico. Tras el descubrimiento de dichas pruebas se puede emprender un tratamiento temprano para combatir la enfermedad. Por consiguiente, los individuos que están en riesgo de desarrollar cáncer de estómago o esofágico pueden identificarse y pueden aislarse muestras de dichos individuos. La invención es particularmente útil para controlar individuos que se ha identificado que tienen historias médicas familiares que incluyen parientes que han padecido cáncer de estómago o esofágico. De forma similar, la invención es particularmente útil para controlar individuos que se han diagnosticado con cáncer de estómago o esofágico, y en particular los que han sido tratados y se han eliminado sus tumores y/o de otra forma están experimentando una remisión, incluyendo los que se han tratado por cáncer de estómago o esofágico.

Las composiciones, métodos y kits de diagnóstico y selección *in vitro* pueden utilizarse en el análisis de tumores. La expresión de GCC es un marcador para tipos celulares y sugiere que el origen de un adenocarcinoma de origen no confirmado sospechoso de tener un origen gástrico o esofágico pueda ser un tumor de estómago o esofágico. La detección de la expresión de GCC también puede utilizarse para ayudar al diagnóstico inicial de cáncer de estómago o esofágico, o para confirmar dicho diagnóstico. Puede confirmarse que los tumores que se cree que tienen un origen en el estómago o esofágico sean tales utilizando las composiciones, los métodos y los kits de la invención.

Las composiciones, métodos y kits de diagnóstico y selección *in vitro* pueden utilizarse para analizar muestras de tejido del estómago o del esófago para identificar un cáncer de estómago o esofágico primario.

Según la invención, se proporcionan compuestos que se unen la proteína GCC o la transcripción del gen GCC. El tejido normal del cuerpo no presenta transcripciones o proteínas GCC excepto en las células del tracto intestinal. La expresión de GCC es un marcador para el tipo celular y es útil en la identificación del cáncer de estómago o esofágico en muestras extraintestinales.

En algunas realizaciones de la invención, pueden seleccionarse muestras de tejido y de fluidos no colorrectales o muestras de tumor para identificar la presencia o la ausencia de la proteína GCC. Pueden realizarse técnicas, tales como ensayos ELISA y transferencias Western, para determinar si la GCC está presente en una muestra.

En algunas realizaciones de la invención, las muestras de tejido y de fluidos no colorrectales o las muestras de tumor pueden seleccionarse para identificar si la GCC está siendo expresada en células fuera del tracto colorrectal detectando la presencia o la ausencia de la transcripción del gen GCC. La presencia de la transcripción del gen GCC o de ADNc generado a partir de ésta puede determinarse utilizando técnicas, tales como la amplificación mediante PCR, la tecnología de oligonucleótidos ramificados, las transferencias Northern (ARNm), las transferencias Southern (ADNc) o la hibridación de oligonucleótidos.

En algunas realizaciones de la invención, las células de muestras de tejido no colorrectal o de muestras de tumor pueden estudiarse para identificar la presencia o la ausencia de proteínas GCC. Pueden realizarse técnicas, tales como transferencias de inmunohistoquímica, en secciones de tejidos para determinar si la GCC está presente en una muestra.

En algunas realizaciones de la invención, las células de muestras de tejido no colorrectal o de muestras de tumor pueden estudiarse para determinar si la GCC está siendo expresada en células fuera del tracto colorrectal detectando la presencia o la ausencia de la transcripción del gen GCC. La presencia de la transcripción del gen GCC o de ADNc generado a partir de ésta en células de secciones de tejido puede determinarse utilizando técnicas, tales como la hibridación *in situ*.

La presencia de GCC en muestras de tejido y fluidos no colorrectales o sobre células procedentes de muestras de tejido no colorrectal sugiere un posible cáncer de estómago o esofágico. La presencia de GCC en una muestra de tumor o sobre células tumorales sugiere que el tumor puede tener un origen en el estómago o esofágico. La presencia de una transcripción del gen GCC en muestras de tejido y fluidos no colorrectales o en células procedentes de muestras de tejido no colorrectal sugiere un posible cáncer de estómago o colorrectal. La presencia una transcripción del gen GCC en muestras de tumores y de células tumorales sugiere que el tumor puede tener un origen en el estómago o esofágico.

Las muestras pueden obtenerse a partir de tejido extirpado o de material de biopsia, incluyendo biopsia con aguja. La preparación de las secciones de tejidos para patología quirúrgica pueden congelarse y prepararse utilizando técnicas convencionales. Se realizan ensayos de unión de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica sobre secciones de tejido en células fijadas. Las muestras extraintestinales pueden homogeneizarse mediante técnicas convencionales, tales como sonicación, ruptura mecánica o lisis química, tal como lisis con detergentes. También se contempla que las muestras de tumor en fluidos corporales, tales como muestras de sangre, orina, fluido linfático, fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido vaginal, semen y deposiciones también puedan seleccionarse para determinar si dichos tumores son de origen colorrectal, del estómago o esofágico.

Las muestras de tejido no colorrectal pueden obtenerse a partir de cualquier tejido, excepto los del tracto colorrectal, es decir, el tracto intestinal por debajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluyendo el

ciego, el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el colon sigmoide, y el recto), y además el duodeno y el intestino delgado (yeyuno e íleon). Las células normales de todos los tejidos excepto los del tracto colorrectal no expresan GCC. Por tanto, si la proteína GCC o la transcripción del gen GCC se detectan en muestras no colorrectales, se sugiere la posible presencia de células de cáncer colorrectal, de estómago o esofágico. En algunas realizaciones preferidas, las muestras de tejido son nódulos linfáticos.

Pueden obtenerse muestras de tejido mediante técnicas quirúrgicas convencionales incluyendo el uso de agujas de biopsia. Los expertos en la técnica apreciarán con facilidad la variedad de muestras de ensayo que pueden estudiarse para GCC y reconocerán métodos para obtener muestras de tejido.

Las muestras de tejido pueden homogeneizarse o prepararse de otra forma para seleccionar la presencia de GCC mediante técnicas muy conocidas, tales como sonicación, ruptura mecánica, lisis química, tal como lisis con detergentes o sus combinaciones.

Los ejemplos de muestras de fluidos corporales incluyen sangre, orina, fluido linfático, fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido vaginal y semen. En algunas realizaciones preferidas, la sangre se utiliza como muestra de fluido corporal. Las células pueden aislarse a partir de una muestra de fluido, tal como por centrifugación. Los expertos en la técnica apreciarán con facilidad la diversidad de muestras de ensayo que pueden estudiarse para la GCC. Las muestras de ensayo pueden obtenerse mediante métodos tales como extrayendo fluido con una jeringa o mediante una torunda. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros métodos para obtener muestras de ensayo.

En un ensayo que emplea una muestra de sangre, el plasma sanguíneo puede separarse de las células sanguíneas. El plasma sanguíneo puede seleccionarse para la GCC, incluyendo proteínas truncadas, que son liberadas a la sangre cuando una o más GCC se escinden o se desprenden de células tumorales. En algunas realizaciones, se seleccionan fracciones de células sanguíneas para la presencia de células de tumor de estómago o esofágico. En algunas realizaciones, se seleccionan los linfocitos presentes en la fracción de células sanguíneas lisando las células y detectando la presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC que puede estar presente como resultado de la presencia de cualquier célula de tumor de estómago o esofágico que pueda haber sido atrapada por la célula sanguínea. En algunas realizaciones preferidas, las células CD34+ se retiran antes del aislamiento del ARNm de las muestras utilizando inmunocolumnas disponibles en el mercado.

Los aspectos de la presente invención incluyen diversos métodos para determinar si una muestra contiene células que expresan GCC mediante un análisis molecular basado en la secuencia de nucleótidos para detectar la transcripción del gen GCC. Están disponibles varios métodos diferentes para hacerlo, incluyendo los que emplean la tecnología de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la tecnología de oligonucleótidos ramificada, la tecnología de la transferencia Northern, la tecnología de hibridación de oligonucleótidos, y la tecnología de hibridación *in situ*.

La invención se refiere a sondas y cebadores oligonucleotídicos en los métodos para identificar la transcripción del gen GCC y a kits de diagnóstico que comprenden dichos componentes.

Los métodos basados en la secuencia de ARNm para detectar la transcripción del gen GCC incluyen, pero no se limitan a la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa, la tecnología de oligonucleótidos ramificados, la tecnología de la transferencia Northern y Southern, la tecnología de la hibridación *in situ*, y la tecnología de la hibridación de oligonucleótidos.

Los métodos descritos en la presente pretenden ejemplificar cómo puede practicarse la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contempla que pueda emplearse otra metodología basada en la secuencia para detectar la presencia de la transcripción del gen GCC en muestras no colorrectales según la invención.

Un método preferido para detectar la transcripción del gen GCC en material genético derivado de muestras no colorrectales utiliza la tecnología de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). La tecnología de PCR es empleada de modo habitual por los expertos en la técnica, y sus usos en el diagnóstico son muy conocidos y aceptados. Los métodos para practicar la tecnología de PCR se describen en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, M.A., *et al.*, eds., Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990). Las aplicaciones de la tecnología de PCR se describen en "Polymerase Chain Reaction", Erlich, H.A., *et al.*, eds., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989). La patente de EEUU nº 4.683.202, la patente de EEUU nº 4.683.195, la patente de EEUU nº 4.965.188, y la patente de EEUU nº 5.072.216, describen métodos para realizar la PCR. La PCR puede llevarse a cabo de forma habitual utilizando el kit de PCR de ARN GENE AMP de Perkin Elmer Cetus, parte nº N808-0017.

La tecnología de PCR permite la generación rápida de múltiples copias de secuencias de ADN proporcionando cebadores 5' y 3' que se hibridan con secuencias presentes en una molécula de ARN o ADN, y también proporcionan nucleótidos libres y una enzima que rellena las bases complementarias con la secuencia de nucleótidos entre los cebadores con los nucleótidos libres para producir una hebra complementaria de ADN. La enzima rellena las secuencias complementarias adyacentes a los cebadores. Si ambos cebadores 5' y 3' se hibridan con secuencias de nucleótidos sobre el mismo fragmento de ácido nucleico, se produce la amplificación exponencial de un producto de tamaño bicatenario específico. Si sólo se hibrida un único cebador con el fragmento de ácido nucleico, la amplificación lineal produce productos monocatenarios de longitud variable.

Los expertos en la técnica pueden diseñar cebadores de PCR de manera habitual utilizando la información de la secuencia. La secuencia de nucleótidos de la transcripción del gen GCC se indica en SEQ ID NO:1. Para realizar este método, se extrae ARN de las células en una muestra y se ensaya o se utiliza para fabricar ADNc utilizando métodos muy conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los expertos en la técnica pueden preparar con facilidad cebadores de PCR. Un grupo de cebadores en general contiene dos cebadores. Cuando se realiza una PCR sobre ARNm extraído o sobre ADNc generado a partir de éste, si la transcripción del gen GCC o el ADNc generado a partir de ésta está presente, se fabricarán múltiples copias del ARNm o ADNc. Si no está presente, la PCR no generará un producto detectable discreto. Los cebadores tienen, en general, 8-50 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 15-35 nucleótidos, más preferiblemente 18-28 nucleótidos, que son idénticos o complementarios con la transcripción del gen GCC, o con el ADNc generado a partir de ésta, y por tanto se hibridarán con éstos. En realizaciones preferidas, los cebadores son fragmentos de 15-35 nucleótidos, más preferiblemente 18-28 nucleótidos de SEQ ID NO:1. El cebador debe hibridarse con la secuencia que se va a amplificar. Los cebadores típicos tienen una longitud de 18-28 nucleótidos y en general tienen una composición de G+C del 50% al 60%. El cebador completo es preferiblemente complementario con la secuencia con la que se debe hibridar. Preferiblemente, los cebadores generan productos de PCR de 100 pares de bases a 2000 pares de bases. Sin embargo, es posible generar productos de 50 a hasta 10 kb y mayores. Si se utiliza ARNm como molde, los cebadores deben hibridarse con secuencias de ARNm. Si se utiliza ADNc como molde, los cebadores deben hibridarse con secuencias de ADNc.

El ARNm o ADNc se reúne con los cebadores, los nucleótidos libres y la enzima siguiendo protocolos de PCR convencionales. La mezcla sufre una serie de cambios de temperatura. Si la transcripción del gen GCC o el ADNc generado a partir de ésta está presente, es decir, si ambos cebadores se hibridan con secuencias sobre la misma molécula, la molécula que comprende los cebadores y las secuencias complementarias que intervienen se amplificarán exponencialmente. El ADN amplificado puede detectarse con facilidad mediante una diversidad de medios muy conocidos. Si no está presente una transcripción del gen GCC o ADNc generado a partir de ésta, no habrá producto de PCR que se amplifique exponencialmente. Por tanto, la tecnología de PCR proporciona un método extremadamente fácil, sencillo y fiable para detectar la transcripción del gen GCC en una muestra.

El producto de la PCR puede detectarse mediante varios medios muy conocidos. El método preferido para detectar la presencia de ADN amplificado es separar el material de la reacción de PCR mediante una electroforesis en gel y teñir el gel con bromuro de etidio para visualizar el ADN amplificado si está presente. Un tamaño patrón del tamaño esperado del ADN amplificado se ensaya preferiblemente sobre el gel como control.

En algunos casos, como cuando se recuperan unas cantidades extraordinariamente pequeñas de ARN y sólo se generan cantidades pequeñas de ADNc a partir de él, resulta deseable o necesario realizar una reacción de PCR sobre el primer producto de la PCR. Es decir, si la primera reacción produce cantidades difíciles de detectar del ADN amplificado, puede realizarse una segunda PCR para fabricar múltiples copias de secuencias de ADN del primer ADN amplificado. Se emplea un conjunto anidado de cebadores en la segunda reacción de PCR. El conjunto anidado de cebadores se hibrida con secuencias cadena abajo del cebador 5' y cadena arriba del cebador 3' utilizados en la primera reacción.

La presente invención incluye oligonucleótidos que son útiles como cebadores para realizar métodos de PCR para amplificar la transcripción del gen GCC o el ADNc generado a partir de ésta.

Según la invención, pueden montarse kits de diagnóstico que sean útiles para practicar los métodos para detectar la presencia de la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta en muestras no colorrectales. Estos kits de diagnóstico comprenden oligonucleótidos que son útiles como cebadores para realizar métodos de PCR. Se prefiere que los kits de diagnóstico según la presente invención comprendan un recipiente que comprenda un marcador de tamaño para ensayarse como patrón en un gel utilizado para detectar la presencia de ADN amplificado. El marcador de tamaño tiene el mismo tamaño que el ADN generado por los cebadores en presencia de una transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta. Otros componentes en algunos kits incluyen instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos. También pueden proporcionarse controles positivos y negativos.

Los ensayos de PCR son útiles para detectar una transcripción del gen GCC en muestras de tejido homogeneizadas y en células de fluidos corporales. Se contempla que una PCR realizada con la porción plasmática de una muestra de fluido pueda utilizarse para detectar una transcripción del gen GCC.

Otro método para determinar si una muestra contiene células que expresen GCC es mediante un análisis de la hibridación de oligonucleótidos de cadena ramificada de ARNm extraído de una muestra. La hibridación de oligonucleótidos de cadena ramificada puede realizarse como se describe en la patente de EEUU nº 5.597.909, la patente de EEUU nº 5.437.977, y la patente de EEUU nº 5.430.138. Pueden diseñarse reactivos siguiendo las indicaciones de estas patentes y la secuencia de la transcripción del gen GCC.

Otro método para determinar si una muestra contiene células que expresan GCC es mediante un análisis de la transferencia Northern de ARNm extraído de una muestra no colorrectal. Las técnicas para realizar un análisis de la transferencia Northern son muy conocidas por los expertos en la técnica y se describen en Sambrook, J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. La extracción del ARNm, la separación electroforética del ARNm, la transferencia, la preparación de las sondas

y la hibridación son técnicas muy conocidas que pueden realizarse habitualmente utilizando materiales de partida fácilmente disponibles.

El ARNm se extrae utilizando columnas de poli-dT, y el material se separa mediante electroforesis y, por ejemplo, se traslada a un papel de nitrocelulosa. Las sondas marcadas fabricadas a partir de un fragmento o fragmentos específicos aislados pueden utilizarse para visualizar la presencia de un fragmento complementario fijado al papel. Las sondas útiles para identificar ARNm en una transferencia Northern tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la transcripción del gen GCC. Los expertos en la técnica pueden utilizar la información de secuencia en SEQ ID NO:1 para diseñar dichas sondas o para aislar y clonar la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta para ser utilizado como sonda. Estas sondas son fragmentos de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente 30-200, más preferiblemente 40-100 nucleótidos, y pueden ser la transcripción del gen GCC completa.

Según la invención, pueden montarse kits de diagnóstico que sean útiles para practicar métodos para detectar la presencia de la transcripción del gen GCC en muestras no colorrectales mediante un análisis de la transferencia Northern. Estos kits de diagnóstico comprenden oligonucleótidos que son útiles como sondas para hibridarse con el ARNm. Las sondas pueden estar radiomarcadas. Se prefiere que los kits de diagnóstico según la presente invención comprendan un recipiente que comprenda un marcador de tamaño para ensayarse como patrón en un gel. Se prefiere que los kits de diagnóstico según la presente invención comprendan un recipiente que comprenda un control positivo que se hibridará con la sonda. Otros componentes en algunos kits incluyen instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos.

Un análisis de la transferencia Northern es útil para detectar la transcripción del gen GCC en muestras de tejido homogeneizadas y en células de muestras de fluidos corporales. Se contempla que una PCR realizada con la porción plasmática de una muestra de fluido pueda utilizarse para detectar la transcripción del gen GCC.

Otro método para detectar la presencia de la transcripción del gen GCC es mediante la tecnología de hibridación de oligonucleótidos. La tecnología de hibridación de oligonucleótidos es muy conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, son sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótidos específica que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de la transcripción del gen GCC. Se fija ARN o ADNc preparado a partir del ARN procedente de una muestra, normalmente sobre un papel de filtro o similares. Las sondas se añaden y se mantienen bajo condiciones que permitan la hibridación sólo si las sondas son totalmente complementarias con el material genético fijado. Las condiciones son suficientemente rigurosas para lavar las sondas en las que sólo una porción de la sonda se hibrida con el material fijado. La detección de la sonda sobre el filtro lavado indica secuencias complementarias.

Las sondas útiles en ensayos con oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 18 nucleótidos de ADN complementario y pueden ser tan largas como la secuencia complementaria completa con la transcripción del gen GCC. En algunas realizaciones preferidas, las sondas de la invención tienen 30-200 nucleótidos, preferiblemente 40-100 nucleótidos.

Los expertos en la técnica, utilizando la información de secuencia descrita en SEQ ID NO:1, pueden diseñar sondas útiles en la invención. Las condiciones de hibridación pueden optimizarse de modo habitual para minimizar la señal de fondo mediante hibridación no totalmente complementaria. En algunas realizaciones preferidas, las sondas son clones de longitud completa. Las sondas son fragmentos de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente 30-200, más preferiblemente 40-100 nucleótidos, y pueden ser la transcripción del gen GCC completa.

La presente invención incluye oligonucleótidos marcados que son útiles como sondas para realizar una hibridación de oligonucleótidos. Las sondas marcadas de la presente invención se marcan con nucleótidos radiomarcados o pueden detectarse de otro modo mediante sistemas de detección no radiactivos fácilmente disponibles.

Según la invención, pueden montarse kits de diagnóstico que sean útiles para practicar los métodos de hibridación de oligonucleótidos de la invención. Estos kits de diagnóstico comprenden un oligonucleótido marcado que codifica porciones de la transcripción del gen GCC. Se prefiere que las sondas marcadas de los kits de diagnóstico de oligonucleótidos según la presente invención estén marcadas con un radionucleótido. Los kits de diagnóstico basados en la hibridación de oligonucleótidos según la invención preferiblemente comprenden muestras de ADN que representan controles positivos y negativos. Una muestra de ADN de control positivo es la que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que es totalmente complementaria con las sondas del kit, de modo que las sondas se hibridarán con la molécula bajo las condiciones del ensayo. Una muestra de ADN de control negativo es la que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, cuya secuencia de nucleótidos es parcialmente complementaria con la secuencia de la sonda del kit. Bajo las condiciones de ensayo, la sonda no se hibridará con la muestra de ADN de control negativo. Otros componentes en algunos kits incluyen instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos.

Las técnicas de hibridación de oligonucleótidos son útiles para detectar la transcripción del gen GCC en muestras de tejido homogeneizadas y en células en muestras de fluidos corporales. Se contempla que puede utilizarse una PCR realizada con la porción plasmática de una muestra de fluido pueda utilizarse para detectar una transcripción del gen GCC.

La presente invención se refiere a kits *in vitro* para evaluar muestras de tumores para determinar si tienen o no un origen en el estómago o esofágico, y a reactivos y composiciones útiles para practicarla. En algunas realizaciones de la invención, pueden aislarse muestras de tumores a partir de individuos que están siendo sometidos o se están recuperando de una cirugía para retirar tumores en el estómago o en el esófago, tumores en otros órganos o material de biopsia. La muestra de tumor se analiza para identificar la presencia o la ausencia de la transcripción del gen GCC. Pueden realizarse técnicas, tales como ensayos de inmunohistoquímica, para determinar si GCC está presente en las células de la muestra de tumor. La presencia de ARNm que codifica la proteína GCC o de ADNc generado a partir de éste puede determinarse utilizando técnicas tales como la hibridación *in situ*, la inmunohistoquímica y el ensayo de unión a ST *in situ*.

La tecnología de hibridación *in situ* es muy conocida por los expertos en la técnica. Brevemente, se fijan células y se añaden a las células fijadas sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótidos específica. Si las células contienen secuencias de nucleótidos complementarias, las sondas, que pueden detectarse, se hibridarán con ellas.

Las sondas útiles en ensayos de oligonucleótidos tienen una longitud de al menos 18 nucleótidos de ADN complementario y pueden ser tan largas como la secuencia complementaria completa con la transcripción del gen GCC. En algunas realizaciones preferidas, las sondas de la invención tienen 30-200 nucleótidos, preferiblemente 40-100 nucleótidos.

Los expertos en la técnica, utilizando la información de secuencia indicada en SEQ ID NO:1, pueden diseñar sondas útiles en la tecnología de la hibridación *in situ* para identificar células que expresen GCC. Las sondas preferiblemente se hibridan con una secuencia de nucleótidos que se corresponde con la transcripción del gen GCC. Las condiciones de hibridación pueden optimizarse de modo habitual para minimizar la señal de fondo mediante hibridación no totalmente complementaria. Las sondas preferiblemente se hibridan con la transcripción del gen GCC completa. Las sondas son fragmentos de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente 30-200, más preferiblemente 40-100 nucleótidos, y pueden ser la transcripción del gen GCC, más preferiblemente fragmentos de 18-28 de la transcripción del gen GCC.

Las sondas son totalmente complementarias y no se hibridan bien con secuencias parcialmente complementarias. Para una hibridación *in situ* según la invención, se prefiere que las sondas sean detectables mediante fluorescencia. Un procedimiento habitual es marcar una sonda con un nucleótido modificado con biotina y después detectarla con avidina marcada de modo fluorescente. Por tanto, no es necesario que la sonda en sí misma esté marcada de modo fluorescente pero puede detectarse posteriormente con un marcador fluorescente.

La presente invención incluye oligonucleótidos marcados que son útiles como sondas para realizar la hibridación de oligonucleótidos. Es decir, son completamente complementarios con secuencias de ARNm pero no con secuencias genómicas. Las sondas marcadas de la presente invención están marcadas con nucleótidos radiomarcados o pueden detectarse de otro modo mediante sistemas de detección no radiactivos fácilmente disponibles.

La presente invención se refiere a sondas útiles para la hibridación *in situ* para identificar células que expresan GCC.

Las células se fijan y se añaden las sondas al material genético. Las sondas se hibridarán con las secuencias de ácidos nucleicos complementarias presentes en la muestra. Utilizando un microscopio de fluorescencia, las sondas pueden visualizarse mediante sus marcadores de fluorescencia.

Según la invención, pueden montarse kits de diagnóstico que sean útiles para practicar los métodos de hibridación *in situ* de la invención con secuencias que son totalmente complementarias con secuencias de ARNm pero no con secuencias genómicas. Por ejemplo, la secuencia de ARNm incluye diferentes secuencias exónicas. Se prefiere que las sondas marcadas de los kits de diagnóstico *in situ* según la presente invención estén marcadas con un marcador fluorescente.

Pueden utilizarse técnicas de inmunohistoquímica para identificar y fundamentalmente teñir células con GCC. Esta "tinción" permite el análisis de la migración metastásica. Anticuerpos anti-GCC, tales como los descritos anteriormente, se ponen en contacto con células fijadas, y la GCC presente en las células reacciona con los anticuerpos. Los anticuerpos se marcan de modo detectable o se detectan utilizando un segundo anticuerpo marcado o proteína A para teñir las células.

Las técnicas descritas en la presente para evaluar secciones de tumores también pueden utilizarse para analizar secciones de tejidos de muestras de nódulos linfáticos, así como de otros tejidos, para identificar la presencia de células que expresan GCC. Las muestras pueden prepararse y "teñirse" para detectar la expresión de GCC.

Pueden utilizarse métodos de inmunoensayo para el diagnóstico de individuos que padecen un cáncer de estómago o esofágico detectando la presencia de GCC en la muestra de tejido no colorrectal o en un fluido corporal procedente de individuos sospechosos de tener o de ser susceptibles a un cáncer de estómago o esofágico utilizando anticuerpos que han sido producidos en respuesta a la exposición a dicha proteína GCC. Además, pueden utilizarse métodos de inmunoensayo para identificar individuos que padecen un cáncer de estómago o esofágico detectando la presencia de

GCC en una muestra de un tumor utilizando anticuerpos que han sido producidos en respuesta a la exposición a dicha proteína GCC.

Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se generan preferiblemente contra GCC fabricada en células humanas. Los inmunoensayos son muy conocidos y los expertos en la técnica pueden diseñarlos de modo habitual. Los expertos en la técnica pueden producir anticuerpos monoclonales que se unan de modo específico a GCC y que sean útiles en los métodos y los kits de la invención, utilizando técnicas convencionales y materiales de partida fácilmente disponibles. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales se indican en Harlow, E. y D. Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, que proporciona una guía detallada para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales que se unen de modo específico a proteínas diana. Dentro del alcance de la presente invención se incluyen Fab, Fab recombinantes, F (Ab)₂, Fa(Ab)₂ recombinantes, que se unen de modo específico a los productos de la traducción de GCC en lugar de los anticuerpos.

Brevemente, se inyecta la proteína GCC en ratones. Se retira el bazo de los ratones, se aíslan las células esplénicas y se fusionan con células de ratón inmortalizadas. Las células híbridas, o hibridomas, se cultivan y se seleccionan las células que segregan anticuerpos. Los anticuerpos se analizan, y si se descubre que se unen de modo específico a GCC, el hibridoma que los produce se cultiva para producir un suministro continuo de anticuerpos específicos anti-GCC.

Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se generan preferiblemente contra GCC fabricada en células humanas.

Los medios para detectar la presencia de una proteína en una muestra de ensayo son habituales y los expertos en la técnica pueden detectar la presencia o la ausencia de una proteína o de un anticuerpo utilizando métodos muy conocidos. Un método muy conocido para detectar la presencia de una proteína es un inmunoensayo. Los expertos en la técnica pueden apreciar con facilidad multitud de formas para practicar un inmunoensayo para detectar la presencia de una proteína GCC en una muestra.

Según algunas realizaciones, los inmunoensayos comprenden permitir que las proteínas en la muestra se unan a un soporte en fase sólida, tal como una superficie de plástico. Entonces se añaden anticuerpos detectables que se unen de modo selectivo a la GCC. La detección del anticuerpo detectable indica la presencia de GCC. El anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo marcado o no marcado. Un anticuerpo no marcado puede detectarse utilizando un segundo anticuerpo marcado que se una de modo específico al primer anticuerpo, o un segundo anticuerpo no marcado que pueda detectarse utilizando proteína A marcada, una proteína que forma un complejo con anticuerpos. Se describen diversos procedimientos de inmunoensayo en *Immunoassays for the 80's*, A. Voller *et al.*, eds., University Park, 1981.

Pueden realizarse inmunoensayos sencillos en los que un soporte en fase sólida se pone en contacto con la muestra de ensayo. Cualquier proteína presente en la muestra de ensayo se unirá al soporte en fase sólida y puede detectarse mediante una preparación de anticuerpos específicos y detectables. Esta técnica es el fundamento de la transferencia de puntos, la transferencia Western y otros ensayos similares de este tipo.

Otros inmunoensayos pueden ser más complicados pero en realidad proporcionan resultados excelentes. Los ensayos inmunométricos típicos y preferidos incluyen ensayos “directos” para la detección de una proteína, en que un primer anticuerpo antiproteína unido a un soporte en fase sólida se pone en contacto con la muestra de ensayo. Después de un periodo de incubación adecuado, el soporte en fase sólida se lava para eliminar la proteína no unida. Entonces se añade un segundo anticuerpo antiproteína distinto que es específico para una porción de la proteína específica no reconocida por el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo es preferiblemente detectable. Después de un segundo periodo de incubación para permitir que el anticuerpo detectable forme un complejo con la proteína específica unida al soporte en fase sólida a través del primer anticuerpo, el soporte en fase sólida se lava una segunda vez para eliminar el anticuerpo detectable no unido. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede no ser detectable. En este caso, se añade al sistema un tercer anticuerpo detectable, que se une al segundo anticuerpo. Este tipo de ensayo de “sandwich directo” puede ser un sencillo ensayo de sí/no para determinar si se ha producido unión, o puede hacerse cuantitativo comparando la cantidad del anticuerpo detectable con el obtenido en un control. Estos ensayos de “dos sitios” o de “sandwich” se describen en Wide, *Radioimmune Assay Method*, Kirkham, ed., E. & S. Livingstone, Edimburgo, 1970, pp. 199-206.

Otros tipos de ensayos inmunométricos son los denominados ensayos “simultáneos” e “inversos”. Un ensayo simultáneo implica una única etapa de incubación en la que el primer anticuerpo unido al soporte en fase sólida, el segundo anticuerpo detectable y la muestra de ensayo se añaden al mismo tiempo. Después de finalizar la incubación, el soporte en fase sólida se lava para eliminar las proteínas no unidas. Entonces se determina la presencia del anticuerpo detectable asociado al soporte sólido como se haría en un ensayo de “sandwich directo” convencional. El ensayo simultáneo también puede adaptarse de una manera similar para la detección de anticuerpos en una muestra de ensayo.

El ensayo “inverso” comprende la adición discontinua de una disolución de anticuerpo detectable a la muestra de ensayo, seguido de un periodo de incubación y de la adición del anticuerpo unido al soporte en fase sólida después de otro periodo de incubación. El soporte en fase sólida se lava de una manera convencional para eliminar los complejos de proteína/anticuerpo no unidos y el anticuerpo detectable sin reaccionar. La determinación del anticuerpo detectable asociado con el soporte en fase sólida entonces se determina como en los ensayos “simultáneos” y “directos”. El

ensayo inverso también puede adaptarse de una manera similar para la detección de anticuerpos en una muestra de ensayo.

El primer componente del ensayo inmunométrico puede añadirse a nitrocelulosa o a otro soporte en fase sólida que sea capaz de inmovilizar proteínas. El primer componente para determinar la presencia de GCC en una muestra de ensayo es un anticuerpo anti-GCC. Un “soporte en fase sólida” o “soporte” significa cualquier material capaz de unirse a proteínas. Los soportes en fase sólida bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del soporte puede ser soluble en cierto grado o insoluble para los fines de la presente invención. La configuración del soporte puede ser esférica, tal como una esfera, o cilíndrica, tal como la superficie interna de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. Como alternativa, la superficie puede ser lisa, tal como una lámina, una tira de ensayo, etc. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros “soportes en fase sólida” adecuados para unir proteínas o serán capaces de determinarlos mediante el uso de experimentación habitual. Un soporte en fase sólida preferido es una placa de microvaloración de 96 pocillos.

Para detectar la presencia de GCC se emplean anticuerpos anti-GCC detectables. Se conocen bien varios métodos para la detección de anticuerpos.

Un método en que los anticuerpos pueden marcarse de modo detectable es mediante la unión de los anticuerpos a una enzima y después utilizar los anticuerpos en un inmunoensayo de enzimas (EIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), tal como un ELISA de captura. La enzima, cuando posteriormente se expone a su sustrato, reacciona con el sustrato y genera un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden utilizarse para marcar anticuerpos de modo detectable incluyen, pero no se limitan a malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Los expertos en la técnica pueden reconocer con facilidad otras enzimas que también pueden utilizarse.

Otro método en que los anticuerpos pueden marcarse de modo detectable es mediante isótopos radiactivos y su posterior uso en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Work, T.S. *et al.*, Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, NY, 1978). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o mediante una autorradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para los fines de la presente invención son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C . Preferiblemente, el isótopo es ^{125}I . Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros radioisótopos que también pueden utilizarse.

También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado de modo fluorescente se expone a la luz con la longitud de onda apropiada, su presencia puede detectarse debido a su fluorescencia. Entre los compuestos de marcaje fluorescente que se emplean más habitualmente están el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la alofocianina, el *o*-ftaldehído y la fluorescamina. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros compuestos fluorescentes que también pueden utilizarse.

Los anticuerpos también pueden marcarse de modo detectable utilizando metales que emiten fluorescencia, tales como ^{152}Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo específico de proteína utilizando grupos quelantes de metales, tales como ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) o ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA). Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros metales que emiten fluorescencia, así como otros grupos quelantes de metales que también pueden utilizarse.

Los anticuerpos también pueden marcarse de modo detectable mediante el acoplamiento de un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado de modo quimioluminiscente se determina detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el desarrollo de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros compuestos quimioluminiscentes que también pueden utilizarse.

De forma similar, puede utilizarse un compuesto bioluminiscente para marcar anticuerpos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para los fines de marcaje son luciferina, luciferasa y aequorina. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros compuestos bioluminiscentes que también pueden utilizarse.

La detección del anticuerpo específico de proteína, el fragmento o el derivado puede realizarse mediante un contador de centelleo si, por ejemplo, el marcador detectable es un emisor gamma radiactivo. Como alternativa, la detección puede realizarse mediante un fluorómetro si, por ejemplo, el marcador es un material fluorescente. En el caso de un marcador enzimático, la detección puede realizarse mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también puede realizarse mediante la comparación visual del grado de la reacción enzimática

de un sustrato en comparación con patrones preparados de modo similar. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad otros métodos apropiados de detección que también pueden utilizarse.

La actividad de unión de un conjunto dado de anticuerpos puede determinarse según métodos muy conocidos. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando la experimentación habitual.

Pueden realizarse controles positivos y negativos en los que cantidades conocidas de proteínas GCC y proteínas no GCC, respectivamente, se añaden a ensayos que se están realizando en paralelo al ensayo principal. Los expertos en la técnica tienen los conocimientos necesarios para realizar los controles apropiados. Además, el kit puede comprender instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos.

La GCC puede producirse como un reactivo para controles positivos de una manera habitual. Los expertos en la técnica apreciarán las diferentes maneras en que puede producirse y aislarse la proteína GCC.

La composición de anticuerpos se refiere al anticuerpo o anticuerpos necesarios para la detección de la proteína. Por ejemplo, la composición de anticuerpos utilizada para la detección de una GCC en una muestra de ensayo comprende un primer anticuerpo que se une a la GCC, así como un segundo o un tercer anticuerpo detectable que se une al primer o al segundo anticuerpo, respectivamente.

Para estudiar una muestra de ensayo para detectar la presencia de una GCC puede realizarse un ensayo inmuno-métrico convencional como el descrito a continuación. Un primer anticuerpo anti-GCC, que reconoce una porción específica de la GCC, se añade a una placa de microvaloración de 96 pocillos en un volumen de tampón. La placa se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión y posteriormente se lava con PBS para eliminar el anticuerpo no unido. La placa entonces se bloquea con una disolución de PBS/BSA para evitar que las proteínas de la muestra se unan de modo no específico con la placa de microvaloración. Posteriormente se añade la muestra de ensayo a los pocillos y la placa se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión. Los pocillos se lavan con PBS para eliminar la proteína no unida. Se añaden a los pocillos anticuerpos anti-GCC marcados, que reconocen porciones de GCC no reconocidas por el primer anticuerpo. La placa se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión y posteriormente se lava con PBS para eliminar el anticuerpo anti-GCC marcado no unido. La cantidad del anticuerpo anti-GCC marcado y unido se determina posteriormente mediante técnicas convencionales.

Los kits que son útiles para la detección de la GCC en una muestra de ensayo comprenden un recipiente que comprende anticuerpos anti-GCC y un recipiente o recipientes que comprenden controles. Los controles incluyen una muestra control que no contiene GCC y/o otra muestra control que contiene la GCC. Los anticuerpos anti-GCC utilizados en el kit son detectables, como por ejemplo están marcados de modo detectable. Si el anticuerpo anti-GCC detectable no está marcado, éste puede ser detectado por un segundo anticuerpo o por proteína A, por ejemplo, que también puede proporcionarse en algunos kits en recipientes separados. Otros componentes en algunos kits incluyen un soporte sólido, un tampón, e instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos.

Los inmunoensayos son útiles para detectar GCC en muestras de tejido homogeneizadas y en muestras de fluidos corporales, incluyendo la porción plasmática o células en la muestra de fluido.

Las transferencias Western pueden ser útiles para ayudar al diagnóstico de individuos que padecen cáncer de estómago o esofágico detectando la presencia de GCC de un tejido no colorrectal o fluido corporal. Las transferencias Western también pueden utilizarse para detectar la presencia de GCC en una muestra de un tumor procedente de un individuo que padece cáncer. Las transferencias Western emplean anticuerpos anti-GCC detectables que se unen a cualquier GCC presente en una muestra y, por tanto, indican la presencia del receptor en la muestra.

Las técnicas de transferencia Western, que se describen en Sambrook, J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, son similares a los inmunoensayos, con la diferencia fundamental de que antes de exponer la muestra a los anticuerpos, las proteínas de la muestra se separan mediante electroforesis en gel, y las proteínas separadas entonces se sondan con anticuerpos. En algunas realizaciones preferidas, la matriz es una matriz de gel de SDS-PAGE, y las proteínas separadas en la matriz se trasladan a un portador, tal como un papel de filtro, antes de sondear con los anticuerpos. Los anticuerpos anti-GCC descritos anteriormente son útiles en los métodos de transferencia Western.

En general, las muestras se homogeneizan y las células se lisan utilizando un detergente, tal como Triton-X. El material entonces se separa mediante las técnicas convencionales de Sambrook, J. *et al.* (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Los kits que son útiles para la detección de GCC en una muestra de ensayo mediante transferencia Western comprenden un recipiente que comprende anticuerpos anti-GCC, y un recipiente o recipientes que comprenden controles. Los controles incluyen una muestra control que no contiene GCC y/o otra muestra control que contiene GCC. Los anticuerpos anti-GCC utilizados en el kit son detectables, como por ejemplo están marcados de modo detectable. Si el

anticuerpo anti-GCC detectable no está marcado, éste puede ser detectado por un segundo anticuerpo o por proteína A, por ejemplo, que también puede proporcionarse en algunos kits en recipientes separados. Otros componentes en algunos kits incluyen instrucciones para realizar el ensayo. Además, el kit puede comprender opcionalmente dibujos o fotografías que representen el aspecto de los resultados positivos y negativos.

Las transferencias Western son útiles para detectar la GCC en muestras de tejido homogeneizadas y en muestras de fluidos corporales, incluyendo la porción plasmática o células en la muestra de fluido.

Formación de imágenes *in vivo* y compuestos terapéuticos

Según algunas realizaciones de la invención, los conjugados de ligando de GCC pueden utilizarse para la fabricación de un medicamento para detectar, formar imágenes o tratar tumores de estómago o esofágicos primarios y/o metastásicos en un individuo.

Cuando las composiciones conjugadas de la presente invención se administran fuera del tracto intestinal, tal como cuando se administran en el sistema circulatorio, permanecen segregadas de las células que tapizan el tracto intestinal y se unirán sólo a células fuera del tracto intestinal que expresen GCC. Las composiciones conjugadas no se unirán a las células normales sino a células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Por tanto, los restos activos de las composiciones conjugadas administradas fuera del tracto intestinal son transportados a células que expresan GCC, tales como células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico.

Las composiciones farmacéuticas terapéuticas y de diagnóstico útiles en la presente invención incluyen compuestos conjugados que se dirigen de modo específico a células que expresan GCC. Estos compuestos conjugados incluyen restos que se unen a GCC que no se unen a células de tejido normal en el cuerpo excepto a células del tracto intestinal, puesto que las células de otros tejidos no expresan GCC.

A diferencia de las células colorrectales normales, las células cancerosas que expresan GCC son accesibles a sustancias administradas fuera del tracto intestinal, por ejemplo administradas al sistema circulatorio. La única GCC en tejido normal existe en las membranas apicales de las células de la mucosa intestinal y, por tanto, están aisladas de modo eficaz de los compuestos quimioterapéuticos para el cáncer y de los agentes de formación de imágenes dirigidos administrados fuera del tracto intestinal, por la barrera de mucosa intestinal. Por tanto, las células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico pueden ser alcanzadas por los compuestos conjugados de la presente invención introduciendo estos compuestos fuera del tracto intestinal, como por ejemplo administrando composiciones farmacéuticas que comprendan compuestos conjugados al sistema circulatorio.

Los expertos en la técnica pueden identificar a los individuos sospechosos de padecer un cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. En los individuos diagnosticados con cáncer de estómago o esofágico, es habitual y, en algunos casos forma parte de la terapia convencional, sospechar una metástasis e intentar de modo agresivo erradicar las células metastatizadas. La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para formar imágenes y, con ello, diagnosticar de modo más definitivo una enfermedad primaria y metastásica. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprende agentes terapéuticos y métodos para dirigirse y eliminar de modo específico células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Además, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden agentes terapéuticos y métodos para eliminar de modo específico células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden composiciones conjugadas de la presente invención pueden emplearse para diagnosticar o tratar individuos que padecen tumores de estómago o esofágicos primarios y/o metastásicos.

La presente invención se basa en el uso de un resto de unión a GCC en una composición conjugada. El resto de unión a GCC es fundamentalmente una porción de la composición conjugada que actúa como ligando de una GCC y, por tanto, se une de modo específico con ella. La composición conjugada también incluye un resto activo que está asociado con el resto de unión a GCC; el resto activo es un agente activo que es útil para formar imágenes, para dirigirse, para neutralizar o para matar a la célula.

Según la presente invención, el resto de unión a GCC es un anticuerpo.

En algunas realizaciones preferidas, los compuestos conjugados comprenden restos de unión a GCC que comprenden un anticuerpo anti-GCC.

Los anticuerpos contra GCC pueden producirse de modo habitual y utilizarse en ensayos de competición para identificar ligandos de GCC, o como materiales de partida para compuestos conjugados según la invención.

Según la presente invención, el resto activo puede ser un agente terapéutico o un agente de formación de imágenes. Los expertos en la técnica pueden reconocer con facilidad las ventajas de ser capaz de dirigir de modo específico a células cancerosas un ligando de GCC y conjugar dicho ligando con muchos agentes activos diferentes.

Los compuestos quimioterapéuticos útiles como restos activos que, cuando se conjugan con un resto de unión a GCC, son dirigidos de modo específico a células que expresan GCC, tales como células de cáncer de estómago o esofágico, son de forma típica entidades químicas pequeñas producidas mediante síntesis química. Los compuestos quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos. Los compuestos quimioterapéuticos pueden incluir los que tienen otros efectos sobre células, tales como la inversión del estado transformado en un estado diferenciado, o los que inhiben la replicación celular. Los ejemplos de compuestos quimioterapéuticos incluyen fármacos citotóxicos o citostáticos habituales, como por ejemplo metotrexato (ametopterina), doxorubicina (adrimicina), daunorrubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4-fluorouracilo, melfalano, clorambucilo y otros gases mostaza (por ejemplo, ciclofosfamida), *cis*-platino, vindesina (y otros vinca-alcaloides), mitomicina y bleomicina. Otros compuestos quimioterapéuticos incluyen purotionina (oligopéptido de la harina de cebada), macromicina, derivados de 1,4-benzoquinona y trenimón.

Las toxinas son útiles como restos activos. Cuando una toxina se conjugua con un resto de unión a GCC, la composición conjugada se dirige de modo específico a una célula que exprese GCC, tal como las células de cáncer de estómago o esofágico, a través del resto de unión a GCC, y el resto de toxina mata a la célula. Las toxinas son en general productos tóxicos complejos de diversos organismos incluyendo bacterias, plantas, etc. Los ejemplos de toxinas incluyen, pero no se limitan a ricina, cadena A de ricina (toxina de ricina), exotoxina de *Pseudomonas* (PE), toxina de la difteria (DT), fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (PLC), ribonucleasa pancreática bovina (BPR), proteína antivírica de la hierba carmín (PAP), abrina, cadena A de la abrina (toxina de abrina), factor del veneno de cobra (CVF), gelonina (GEL), saporina (SAP), modicina, viscumina y volkensina. Tal como se analizó anteriormente, cuando se emplean toxinas de proteína con péptidos de unión a GCC pueden producirse composiciones conjugadas utilizando técnicas de ADN recombinante. Brevemente, puede construirse una molécula de ADN recombinante que codifique el ligando de GCC y la toxina en un gen quimérico. Cuando el gen quimérico se expresa se produce una proteína de fusión que incluye un resto de unión a GCC y un resto activo. Las toxinas de proteína también son útiles para formar compuestos conjugados con péptidos de unión a GCC a través de enlaces no peptídicos.

Además, existen otras estrategias para utilizar agentes activos para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, pueden producirse composiciones conjugadas que incluyan un resto de unión a GCC y un resto activo que es una enzima activa. El resto de unión a GCC dirige de modo específico la composición conjugada a las células tumorales. Un profármaco inactivo que puede ser convertido por la enzima en un profármaco activo se administra al paciente. El profármaco sólo es convertido en el fármaco activo por la enzima cuando está localizado en el tumor. Un ejemplo de un par enzima/profármaco incluye fosfatasa alcalina/etopósido fosfato. En este caso, la fosfatasa alcalina se conjugua con un ligando de unión a GCC. El compuesto conjugado se administra y se localiza en la célula cancerosa. Tras el contacto con etopósido fosfato (el profármaco), el etopósido fosfato se convierte a etopósido, un fármaco quimioterapéutico que es captado por la célula cancerosa.

Los agentes radiosensibilizantes son sustancias que aumentan la sensibilidad de las células a la radiación. Los ejemplos de agentes radiosensibilizantes incluyen nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol (véase, DeVita, V.T. Jr., en Harrison's Principles of Internal Medicine, p. 68, McGraw-Hill Book Co., N.Y., 1983). El compuesto conjugado que comprende un agente radiosensibilizante como resto activo se administra y se localiza en la célula de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Tras la exposición del individuo a radiación, el agente radiosensibilizante se "excita" y provoca la muerte de la célula.

Pueden utilizarse radionúclidos en composiciones farmacéuticas que son útiles para procedimientos de radioterapia o de formación de imágenes.

Los ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en la terapia de radiación incluyen ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi . Otros radionúclidos que han sido utilizados por los expertos en la técnica incluyen ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , $^{193\text{M}}\text{Pt}$, ^{197}Hg , todos los emisores Auger y/o beta negativo. Algunos radionúclidos preferidos incluyen ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At y $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$.

Según la presente invención, los restos activos pueden ser un agente de formación de imágenes. Los agentes de formación de imágenes son procedimientos de diagnóstico útiles, así como los procedimientos utilizados para identificar el emplazamiento de células cancerosas. La formación de las imágenes puede producirse mediante muchos procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica, y el agente de formación de imágenes apropiado útil en estos procedimientos puede conjugarse con un ligando de GCC mediante medios muy conocidos. La formación de imágenes puede producirse, por ejemplo, mediante radiocentelleografía, formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (MRI) o tomografía computerizada (barrido CT). Los agentes de formación de imágenes de radionúclidos que se emplean con más frecuencia incluyen indio y yodo radiactivo. La formación de imágenes mediante barrido CT puede emplear un metal pesado, tal como quelatos de hierro. El barrido MRI puede emplear quelatos de gadolinio o manganeso. Además, puede realizarse la tomografía de emisión de positrones (PET) utilizando emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio. Los ejemplos de radionúclidos útiles en los procedimientos de formación de imágenes incluyen ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{27\text{M}}\text{Sr}$, $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{152}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi .

Se prefiere que las composiciones conjugadas no sean inmunogénicas o sean inmunogénicas pero a un nivel muy bajo. El resto de unión a GCC puede ser un anticuerpo humanizado o primatizado, o un anticuerpo humano.

Los ligandos de GCC se conjugan con agentes activos mediante una diversidad de técnicas muy conocidas que son realizadas con facilidad sin experimentación indebida por los expertos en la técnica. La técnica utilizada para conjugar el ligando de GCC al agente activo depende de la naturaleza molecular del ligando de GCC y del agente activo. Después de que se conjuguen el ligando de GCC y el agente activo para formar una única molécula pueden realizarse ensayos para asegurarse de que la molécula conjugada conserva las actividades de los restos. El ensayo de unión competitiva descrito anteriormente puede utilizarse para confirmar que el resto de unión a GCC conserva su actividad de unión como compuesto conjugado. De forma similar, la actividad del resto activo puede ensayarse utilizando diversos ensayos para cada tipo respectivo de agente activo. Los radionúclidos conservan su actividad, es decir, su radiactividad, independientemente de su conjugación. Con respecto a los agentes activos que son toxinas, fármacos y agentes de transporte dirigido, pueden utilizarse ensayos convencionales para demostrar la actividad de las formas no conjugadas de estos compuestos para confirmar que su actividad se ha mantenido.

La conjugación puede realizarse directamente entre el ligando de GCC y el agente activo, o pueden proporcionarse grupos moleculares intermedios conectores entre el ligando de GCC y el agente activo. Los reticulantes son particularmente útiles para facilitar la conjugación proporcionando sitios de unión para cada resto. Los reticulantes pueden incluir otros grupos moleculares que actúen como espaciadores para separar restos entre sí para evitar que interfieran con la actividad de los demás.

Los expertos en la técnica pueden conjugar un ligando de GCC a un fármaco quimioterapéutico utilizando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, Magerstradt, M., *Antibody Conjugates and Malignant Disease* (1991), CRC Press, Boca Ratón, EEUU, pp. 110-152, indica la conjugación de diversos fármacos citostáticos a aminoácidos de anticuerpos. Estas reacciones pueden aplicarse para conjugar fármacos quimioterapéuticos con ligandos de GCC, con un conector apropiado. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos que se utilizan en la actualidad para tratar el cáncer poseen grupos funcionales que pueden someterse a una reticulación química directamente con proteínas. Por ejemplo, están disponibles grupos amino libres sobre el metotrexato, la doxorubicina, la daunorrubicina, el citosinarabinósido, el *cis*-platino, la vindesina, la mitomicina y la bleomicina, mientras que están disponibles grupos ácido carboxílico libres sobre el metotrexato, el melfalano y el clorambucilo. Estos grupos funcionales, es decir amino y ácido carboxílico libres, son dianas para una diversidad de agentes reticulantes químicos homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden reticular estos fármacos directamente al único grupo amino libre de un anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento para reticular ligandos de GCC que tienen un grupo amino libre con agentes activos que tienen un grupo amino libre, tales como metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, *cis*-platino, vindesina, mitomicina y bleomicina, o fosfatasa alcalina, o una toxina basada en una proteína o un péptido, emplea ésteres succinimidilo homobifuncionales, preferiblemente con espaciadores de cadena carbonada, tal como suberato de disuccinimidilo (Pierce Co., Rockford, IL). En el caso de que se necesite un compuesto conjugado escindible se empleará el mismo protocolo pero utilizando 3,3'-ditiobis-sulfosuccinimidilpropionato (Pierce Co.).

Para conjugar un ligando de GCC que es un péptido o una proteína a un agente activo basado en un péptido, tal como una toxina, el ligando de GCC y la toxina pueden producirse como una única proteína de fusión mediante una síntesis peptídica convencional o mediante la tecnología de ADN recombinante, pudiendo ambas ser realizadas de manera habitual por los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica pueden conjugar un ligando de GCC con un radionúclido utilizando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, Magerstradt, M. (1991), *Antibody Conjugates and Malignant Disease*, CRC Press, Boca Ratón, FLA, y Barchel, S.W. y Rhodes, B.H. (1983), *Radioimaging and Radiotherapy*, Elsevier, NY, indican la conjugación de diversos radionúclidos terapéuticos y de diagnóstico a aminoácidos de anticuerpos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos conjugados de la invención y vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden ser formuladas por los expertos en la técnica. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, A. Osol, un texto de referencia convencional en este campo. Los compuestos conjugados de la presente invención pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otros agentes de diagnóstico, terapéuticos u otros agentes. Estos otros agentes incluyen excipientes, tales como colorantes, agentes estabilizantes, agentes osmóticos y agentes antibacterianos. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles y apirógenas.

Las composiciones conjugadas pueden formularse, por ejemplo, como una disolución, una suspensión o una emulsión en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de estos vehículos son agua, disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, y albúmina de suero humana al 5%. También pueden utilizarse liposomas. El vehículo puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas que se emplean de modo habitual. Por ejemplo, una composición parenteral adecuada para la administración mediante inyección se prepara disolviendo 1,5% en peso del ingrediente activo en una disolución de cloruro de sodio al 0,9%.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como una única dosis o en múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los tratamientos pueden combinarse con técnicas convencionales, que pueden administrarse de modo secuencial o simultánea.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante cualquier medio que permita que la composición conjugada alcance las células diana. En algunas realizaciones, las vías de administración incluyen las seleccionadas del grupo que consiste en la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y local hacia el riego sanguíneo del órgano en que el tumor reside o directamente al tumor en sí mismo. La administración intravenosa es la vía de administración preferida. Puede realizarse con la ayuda de una bomba de infusión. Además de un pulverizado intraoperativo, los compuestos conjugados pueden administrarse por vía intratecal, intraventricular, estereotáctica, intrahepática, tal como a través de la vena porta, mediante inhalación y por vía intrapleural.

La dosificación administrada varía dependiendo de factores tales como la naturaleza del resto activo, la naturaleza de la composición conjugada, las características farmacodinámicas, su modo y vía de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y el grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, y la frecuencia del tratamiento.

Debido a que los compuestos conjugados se dirigen de modo específico a células con una o más moléculas de GCC, los compuestos conjugados que comprenden compuestos quimioterapéuticos o toxinas se administran en dosis menores que las que se utilizan cuando los compuestos quimioterapéuticos o las toxinas se administran como agentes activos sin conjugar, preferiblemente en dosis que contienen hasta 100 veces menos agente activo. En algunas realizaciones, los compuestos conjugados que comprenden compuestos quimioterapéuticos o toxinas se administran en dosis que contienen 10-100 veces menos agente activo como resto activo, que la dosificación de los compuestos quimioterapéuticos o toxinas administrados como agentes activos sin conjugar. Para determinar la dosis apropiada, la cantidad de compuesto se mide preferiblemente en moles en lugar de en peso. De esta manera, el peso variable de los diferentes restos de unión a GCC no afecta al cálculo. Suponiendo una proporción de uno a uno entre el resto de unión a GCC y el resto activo en las composiciones conjugadas de la invención, pueden administrarse menos moles de compuestos conjugados comparados con los moles de los compuestos no conjugados administrados, preferiblemente hasta 100 veces menos moles.

De forma típica, los conjugados quimioterapéuticos se administran por vía intravenosa en múltiples dosis divididas.

De forma típica, se administran hasta 20 mg IV/dosis de metotrexato en forma no conjugada. Cuando se administra el metotrexato como resto activo en un compuesto conjugado de la invención, se produce una reducción en la dosis de 10 a 100 veces. Por tanto, suponiendo que cada compuesto conjugado incluya una molécula de metotrexato conjugada con un resto de unión a GCC, de la cantidad total de compuesto conjugado administrado, hasta aproximadamente 0,2-2,0 g de metotrexato está presente y, por tanto, se administra. En algunas realizaciones, de la cantidad total de compuesto conjugado administrado, hasta aproximadamente 200 mg-2 g de metotrexato está presente y, por tanto, se administra.

Para dosificar las composiciones conjugadas que comprenden restos de unión a GCC unidos a restos activos que son radioisótopos en composiciones farmacéuticas útiles como agentes de formación de imágenes, se supone que cada resto de unión a GCC está unido a un resto activo radiactivo. La cantidad de radioisótopo que se va a administrar depende del radioisótopo. Los expertos en la técnica pueden formular con facilidad la cantidad de compuesto conjugado que se va a administrar basándose en la actividad específica y la energía de un radionúclido concreto utilizado como resto activo. De forma típica, se administran 0,1-100 milicurios por dosis de agente de formación de imágenes, preferiblemente 1-10 milicurios, lo más frecuente 2-5 milicurios. Por tanto, las composiciones farmacéuticas útiles como agentes de formación de imágenes que comprenden composiciones conjugadas que comprenden un resto de unión a GCC y un resto radiactivo comprenden 0,1-100 milicurios, en algunas realizaciones preferiblemente 1-10 milicurios, en algunas realizaciones preferiblemente 2-5 milicurios, en algunas realizaciones más preferiblemente 1-5 milicurios. Los ejemplos de dosificación incluyen: ^{131}I = entre aproximadamente 0,1-100 milicurios por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 1-10 milicurios, en algunas realizaciones 2-5 milicurios, y en algunas realizaciones aproximadamente 4 milicurios; ^{111}In = entre aproximadamente 0,1-100 milicurios por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 1-10 milicurios, en algunas realizaciones 1-5 milicurios, y en algunas realizaciones aproximadamente 2 milicurios; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ = entre aproximadamente 0,1-100 milicurios por dosis, en algunas realizaciones preferiblemente 5-75 milicurios, en algunas realizaciones 10-50 milicurios, y en algunas realizaciones aproximadamente 27 milicurios. Wessels B.W. y R.D. Rogus (1984), *Med. Phys.*, 11:638, y Kwok, C.S. *et al.* (1985), *Med. Phys.*, 12:405, describen cálculos de dosis detallados para conjugados de diagnóstico y terapéuticos que pueden utilizarse para la preparación de composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos conjugados radiactivos.

Los individuos sospechosos de padecer un cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico pueden tratarse administrando al individuo una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es un agente terapéutico radioestable. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es un agente activo radioestable y el resto de unión a GCC es un anticuerpo. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es un agente terapéutico radioestable. La composición farmacéutica puede comprender un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende resto de unión a GCC de anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es un agente activo radioestable seleccionado del grupo que consiste en metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4-fluorouracilo, melfalano, clorambucilo, *cis*-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotiónina, macromicina, derivados de 1,4-

benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antivírica de la hierba carmín, abrina, cadena A de la abrina, factor del veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. El individuo que se está tratando puede diagnosticarse con un cáncer de estómago o esofágico metastatizado o puede diagnosticarse con un cáncer de estómago o esofágico primario, y puede someterse al tratamiento de forma proactiva en el caso de que exista algo de metástasis que aún no se ha detectado. La composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición conjugada. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para provocar un efecto citotóxico o citostático sobre células cancerosas sin provocar efectos secundarios letales en el individuo.

Se describe un método para tratar individuos sospechosos de padecer un cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. Estos individuos pueden tratarse administrando al individuo una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un resto de unión a GCC de anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es radiactivo. La composición farmacéutica comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un resto de unión a GCC de anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es radiactivo. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un resto de unión a GCC de anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es un agente radiactivo seleccionado del grupo que consiste en ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , $^{193\text{M}}\text{Pt}$, ^{197}Hg , todos los emisores Auger y/o beta negativo. El individuo que se está tratando puede diagnosticarse con un cáncer metastatizado o puede diagnosticarse con un cáncer localizado, y puede someterse al tratamiento de forma proactiva en el caso de que exista algo de metástasis que aún no se ha detectado. La composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición conjugada. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para provocar un efecto citotóxico o citostático sobre células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático sin provocar efectos secundarios letales en el individuo. La composición puede inyectarse de modo intratumoral en tumores primarios.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso de un conjugado de ligando de GCC para detectar células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático en un individuo sospechoso de padecer cáncer de estómago o esofágico primario o metastatizado mediante la formación de radioimágenes. Puede sospecharse que ciertos individuos tengan tumores de estómago o esofágicos primarios y este diagnóstico puede confirmarse administrando al individuo un agente de formación de imágenes que se une a GCC. Se pueden formar imágenes de los tumores detectando la localización en el estómago o el esófago. Los individuos pueden diagnosticarse como que padecen cáncer de estómago o esofágico metastatizado, y las células del cáncer de estómago o esofágico metastatizado pueden detectarse administrando al individuo, preferiblemente mediante administración intravenosa, una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende un resto de unión a GCC de anticuerpo y un resto activo, en el que el resto activo es radiactivo, y detectar la presencia de una acumulación o agregación localizada de radiactividad, lo cual indica la presencia de células con GCC. El resto activo puede ser un agente radiactivo seleccionado del grupo que consiste en metales pesados radiactivos, tales como quelatos de hierro, quelatos radiactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi . El individuo que se está tratando puede diagnosticarse con un cáncer de estómago o esofágico metastatizado, o puede diagnosticarse con un cáncer de estómago o esofágico localizado, y puede someterse al tratamiento de forma proactiva en el caso de que exista algo de metástasis que aún no se ha detectado. La composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición conjugada. Una cantidad eficaz desde el punto de vista del diagnóstico es una cantidad que puede detectarse en un sitio del cuerpo en que están localizadas células con GCC sin provocar efectos secundarios letales en el individuo.

Formación de imágenes fotodinámicas y terapia

Según algunas realizaciones de la invención, los restos de unión a GCC de anticuerpos son conjugados con compuestos terapéuticos o agentes de formación de imágenes fotoactivados. Maier, A. *et al.*, *Lasers in Surgery and Medicine*, 26:461-466 (2000), que se incorpora en la presente como referencia, describen un ejemplo de terapia fotodinámica. La empresa QLT, Inc. (Vancouver, BC) distribuye en el mercado agentes activos fotosensibles que pueden unirse a ligandos de GCC. Estos compuestos conjugados pueden utilizarse en protocolos terapéuticos y de formación de imágenes fotodinámicos para activar los agentes conjugados unidos a GCC que de esta manera son dirigidos a células tumorales. En algunas realizaciones, los compuestos conjugados se aplican como un pulverizado intraoperativo que posteriormente se somete a la luz para activar los compuestos unidos a las células que expresan GCC.

En algunas realizaciones, el agente fotodinámico es un fluoróforo o porfirina. Los ejemplos de porfirina incluyen derivado de hematoporfirina (HPD) y porfímero sodio (Photofrin®). Una segunda generación de fotosensibilizantes es BPD verteporfina. En algunas realizaciones, el fluoróforo es tetrametilrotamina. Los láseres son, en general, la fuente de luz principal utilizada para activar porfirinas. En algunas aplicaciones también pueden utilizarse diodos emisores de luz (LED) y fuentes de luz fluorescente.

En algunas realizaciones, el agente fotodinámico está unido a GCC en el N-terminal de GCC.

Además de un pulverizado intraoperativo, los compuestos conjugados pueden administrarse por vía intratecal, intraventricular, estereotáctica, intrahepática, tal como a través de la vena porta, mediante inhalación y por vía intrapleural.

5 Administración dirigida de fármacos a células de cáncer de estómago o esofágico de modo general

Las composiciones conjugadas que comprenden un ligando de GCC de anticuerpo pueden utilizarse para transportar agentes terapéuticos a células que comprenden una GCC, tales como células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. En algunas realizaciones, el agente es un fármaco o una toxina tal como en metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4-fluorouracilo, melfalano, clorambucilo, *cis*-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotioina, macromicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antivírica de la hierba carmín, abrina, cadena A de la abrina, factor del veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. El material genético se transporta a las células cancerosas para producir un antígeno que puede ser una diana para el sistema inmunológico o para producir una proteína que mata a las células o inhibe su proliferación. En algunas realizaciones, el ligando de GCC de anticuerpo se emplea para transportar ácidos nucleicos que codifican moléculas de ácidos nucleicos que reemplazan a genes endógenos defectuosos o que codifican proteínas terapéuticas. En algunas realizaciones, las composiciones se utilizan en protocolos de terapia génica para administrar a individuos el material genético necesario y/o deseado para compensar una deficiencia genética.

En algunas realizaciones, el ligando de GCC de anticuerpo se combina o se incorpora en un vehículo de transporte, convirtiendo con ello el vehículo de transporte en un vehículo de transporte específicamente dirigido. En algunas realizaciones, un ligando de GCC puede integrarse o incorporarse de otro modo en liposomas en los que el ligando de GCC está expuesto o sea accesible de otra manera sobre la superficie del liposoma, haciendo que dichos liposomas se dirijan de modo específico a células que portan GCC.

El agente activo puede ser un fármaco, una toxina o una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser ARN o preferiblemente ADN. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula antisentido o codifica una secuencia antisentido cuya presencia en la célula inhibe la producción de una proteína indeseable. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una ribozima cuya presencia en la célula inhibe la producción de una proteína indeseable. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o un péptido que se produce de modo deseable en la célula. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una copia funcional de un gen que es defectuoso en la célula diana. La molécula de ácido nucleico preferiblemente está unida operablemente a elementos reguladores necesarios para expresar la secuencia codificadora en la célula.

Los liposomas son pequeñas vesículas compuestas de lípidos. En el centro de estas vesículas se introducen construcciones genéticas que codifican proteínas que se desea que sean expresadas en células que portan GCC. La envuelta externa de estas vesículas comprende un ligando de GCC. Liposomes, volúmenes 1, 2 y 3, CRC Press Inc., Boca Ratón, FLA, que se incorpora en la presencia como referencia, describe la preparación de agentes activos encapsulados en liposomas que incluyen anticuerpos en la envuelta externa. En la presente invención, un ligando de GCC, como por ejemplo un anticuerpo anti-GCC, se asocia dentro de la envuelta externa. Las composiciones no conjugadas que comprenden un ligando de GCC en la matriz de un liposoma con un agente activo en su interior incluyen las composiciones en que el ligando de GCC es preferiblemente un anticuerpo.

En una realización, el transporte de copias normales del gen supresor de tumor p53 a células cancerosas se logra utilizando un ligando de GCC para dirigir el gen terapéutico. Parece que las mutaciones en el gen supresor de tumor p53 desempeñan un papel importante en el desarrollo de muchos cánceres. Una estrategia para combatir esta enfermedad es el transporte de copias normales de este gen a las células cancerosas que expresan formas mutantes de este gen. Las construcciones genéticas que comprenden genes supresores de tumor p53 normales se incorporan en liposomas que comprenden un ligando de GCC. La composición se transporta al tumor. Los ligandos de GCC se unen de modo específico y dirigen a los liposomas que contienen el gen normal para corregir la lesión creada por la mutación del gen supresor p53. Los expertos en la técnica pueden preparar construcciones genéticas. La presente invención permite que esta construcción sea dirigida de modo específico utilizando los ligandos de GCC de la presente invención. Las composiciones de la invención incluyen un ligando de GCC, tal como un anticuerpo anti-GCC, asociado con un vehículo de transporte y una construcción génica que comprende una secuencia codificadora de una proteína cuya producción se desea en las células del tracto intestinal, conectada a secuencias reguladoras necesarias para la expresión en las células. Para la captación por parte de las células del tracto intestinal, las composiciones se administran por vía oral o mediante un enema con lo que entran en el tracto intestinal y se ponen en contacto con células que comprenden GCC. Los vehículos de transporte asociados con la GCC en virtud del ligando de GCC y el vehículo se internalizan en la célula o la construcción genética/agente activo es captada de otra forma por la célula. Cuando se internaliza, la construcción puede proporcionar un efecto terapéutico al individuo.

65 Antisentido

Las composiciones, los kits y los métodos son útiles para prevenir y tratar células de cáncer de estómago o esofágico proporcionando los medios para transportar de modo específico compuestos antisentido a células de cáncer de

estómago o esofágico y, con ello, detener la expresión de genes en las células en que se está produciendo una expresión indeseable de genes sin afectar de modo negativo a las células en que no se produce dicha expresión.

Las composiciones conjugadas de la presente invención son útiles para dirigirse a células que expresan GCC, incluyendo células de cáncer de estómago o esofágico. Las composiciones conjugadas no se unirán a células derivadas de tejido no colorrectal. Las células no colorrectales, que carecen de GCC, no captan las composiciones conjugadas. Las células colorrectales normales no tienen GCC y captarán las composiciones. La presente invención proporciona composiciones y métodos para transportar composiciones antisentido a células de cáncer de estómago o esofágico.

La presente invención proporciona una estrategia específica de célula en que sólo las células colorrectales normales y cancerosas y las células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático se exponen a la porción activa del compuesto, y sólo estas células se ven afectadas por el compuesto conjugado. El resto de unión a GCC se une a células colorrectales normales y cancerosas y a células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastático. Tras unirse a estas células, el compuesto conjugado se internaliza y se realiza el transporte del compuesto conjugado que incluye la porción antisentido de la molécula. La presencia del compuesto conjugado en células colorrectales normales no produce efecto en estas células, porque el gen asociado al cáncer con el que es complementaria la molécula antisentido que forma el resto activo compuesto conjugado no se está expresando. Sin embargo, en células de cáncer colorrectal, el gen asociado al cáncer con el que es complementaria la molécula antisentido que forma el resto activo compuesto conjugado sí se está expresando. La presencia del compuesto conjugado en células de cáncer colorrectal actúa para inhibir o prevenir la transcripción o la traducción del gen de cáncer y, por tanto, reduce o elimina el fenotipo transformado.

La invención puede utilizarse para combatir el cáncer colorrectal, de estómago o esofágico primario y/o metastatizado, así como para prevenir la aparición del fenotipo transformado en células de colon normales. Por tanto, la invención puede utilizarse de modo terapéutica y también profiláctico.

Los expertos en la técnica pueden identificar con facilidad a los individuos sospechosos de padecer cáncer de estómago o esofágico. En los individuos diagnosticados con cáncer de estómago o esofágico, la terapia convencional es sospechar una metástasis e intentar de modo agresivo erradicar las células metastatizadas.

La presente invención se basa en el uso de un resto de unión a GCC de anticuerpo en una composición conjugada. El resto de unión al producto GCC es fundamentalmente una porción de la composición conjugada que actúa como ligando para la GCC y, por tanto, se une de modo específico a esos receptores. La composición conjugada también incluye un resto activo que está asociado con el resto de unión a GCC, siendo el resto activo una composición antisentido útil para inhibir o prevenir la transcripción o la traducción de la expresión de genes cuya expresión está asociada con el cáncer.

Según la presente invención, el resto activo puede ser una composición antisentido. En particular, la molécula antisentido que forma el resto activo de un compuesto conjugado se hibrida con ADN o ARN en una célula de cáncer de estómago o esofágico e inhibe y/o previene la transcripción o la traducción del ADN o ARN. Las composiciones antisentido pueden ser una molécula de ácido nucleico, su derivado o su análogo. La naturaleza química de la composición antisentido puede ser la de una molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico modificada o una molécula que no es un ácido nucleico que posea grupos funcionales que imiten a una molécula de ADN o ARN que es complementaria con la molécula de ADN o ARN cuya expresión se va a inhibir o prevenir de otra forma. Las composiciones antisentido inhiben o previenen la transcripción o la traducción de genes cuya expresión está ligada al cáncer de estómago o esofágico, es decir, genes asociados con el cáncer.

En muchos tumores se han identificado mutaciones puntuales de inserciones y deleciones en K-ras y H-ras, y características complejas de las alteraciones de los oncogenes HER-2/ERBB-2, HER-1/ERBB-1, HRAS-1, C-MYC y los antioncogenes p53, RB1.

Una carcinogénesis química en un modelo de rata demostró mutaciones puntuales en fos, un oncogén que media en la regulación transcripcional y de la proliferación. Véase, Alexander, R.J. *et al.*, Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea, American Journal of the Medical Sciences, 303(1):16-24, enero de 1992.

Una carcinogénesis química en un modelo de rata demostró mutaciones puntuales en el oncogén abl. Véase, Alexander, R.J. *et al.*, Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea, American Journal of the Medical Sciences, 303(1):16-24, enero de 1992.

MYC es un oncogén que desempeña un papel en la regulación de la transcripción y de la proliferación. Se incubó un oligonucleótido antisentido a myc de 15 bases complementario con la región de inicio de la traducción del exón II, con células de cáncer colorrectal. Esta molécula antisentido inhibe la proliferación de células de cáncer colorrectal de una manera dependiente de la dosis. De manera interesante, la captación de este oligonucleótido fue baja (0,7%). Además, la transferencia de un cromosoma 5 normal a células de cáncer colorrectal produjo la regulación de la expresión de myc y no se produjo proliferación. Estos datos sugieren que en este cromosoma existe un gen supresor de tumor importante para la regulación de myc.

Se ha identificado una nueva proteína tirosina fosfatasa, G1. El estudio del ARNm que codifica esta proteína en células de tumor colorrectal reveló que sufre mutaciones puntuales y deleciones en estas células, y que puede desempeñar un papel en las características de proliferación de estas células. Véase, Takekawa, M. *et al.*, Chromosomal localization of the protein tyrosine phosphatase G1 gene and characterization of the aberrant transcripts in human colon cancer cells, FEBS Letters, 339(3):222-228, 21 de febrero, 1994.

La gastrina regula el crecimiento de células de cáncer de colon a través de un mecanismo dependiente de AMP cíclico mediado por PKA. Oligodesoxinucleótidos antisentido a la subunidad reguladora de una clase específica de PKA inhiben los efectos estimulantes del crecimiento del AMP cíclico en células de carcinoma de colon. Véase, Bold, R.J. *et al.*, Experimental gene therapy of human colon cancer, Surgery, 116(2):189-195, análisis 195-6, agosto de 1994; y Yokozaki, H. *et al.*, An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells, Cancer Research, 53(4):868-872, 15 de febrero, 1993.

CRIPTO es un gen relacionado con el factor del crecimiento epidérmico expresado en la mayoría de los tumores de cáncer colorrectal. Fosforotioato oligodesoxinucleótidos antisentido al extremo 5' del ARN de CRIPTO reducen significativamente la expresión de CRIPTO e inhiben el crecimiento de células de tumor colorrectal *in vitro* e *in vivo*. Véase, Ciardiello, F. *et al.*, Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides, Oncogene, 9(1):291-298, enero de 1994.

Muchas células de carcinoma segregan el factor alfa del crecimiento transformante. Un oligonucleótido de 23 nucleótidos antisentido a ARNm de TGF-alfa inhibe la síntesis de ADN y la proliferación de células de cáncer colorrectal. Véase, Sizeland, A.M., Burgess, A.W., Antisense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line, Molecular Biology of the Cell, 8(11):1235-1243, noviembre de 1992.

Se describen composiciones antisentido que incluyen oligonucleótidos, sus derivados y sus análogos, protocolos de conjugación y estrategias antisentido para la inhibición de la transcripción y de la traducción, en general, en Antisense Research and Applications, Crooke, S. y B. Lebleu, eds., CRC Press, Inc., Boca Ratón, FLA, 1993; Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Blackburn, G. y M.J. Gait, eds., IRL Press en Oxford University Press, Inc., Nueva York, 1990; y Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Eckstein, F., ed., IRL Press en Oxford University Press, Inc., Nueva York, 1991.

Las moléculas antisentido de la presente invención comprenden una secuencia complementaria con un fragmento de un gen de cáncer colorrectal. Véase, Ullrich *et al.*, EMBO J., 1986, 5:2503.

Las composiciones antisentido que pueden formar un resto activo en los compuestos conjugados de la invención incluyen oligonucleótidos formados por homopirimidinas que reconocen tramos locales de homopurinas en la doble hélice del ADN y se unen a ellas en el surco mayor para formar una triple hélice. Véase, Helen, C. y Toulme, J.J., Specific regulation of gene expression by antisense, sense, and antigenic nucleic acids, Biochem. Biophys. Acta, 1049:99-125, 1990. La formación de la triple hélice interrumpe la capacidad del gen específico para experimentar la transcripción por la ARN polimerasa. Se ha observado la formación de la triple hélice utilizando oligonucleótidos específicos de myc. Véase, Cooney, M. *et al.*, Science, 241:456-459.

Pueden emplearse oligonucleótidos de ADN o ARN complementarios a secuencias en el límite entre intrones y exones para evitar la maduración de transcripciones de ARN nuclear recién generadas de genes específicos para formar ARNm para la transcripción.

Un ARN antisentido complementario con genes específicos puede hibridarse con el ARNm del gen tat y evitar su traducción. El ARN antisentido puede proporcionarse a las células como un ARN "listo para usar" sintetizado *in vitro* o como un gen antisentido transfectado de forma estable en células que producen ARN antisentido tras la transcripción. Una hibridación con ARNm produce la degradación de la molécula hibridada por ARNasa H y/o la inhibición de la formación de complejos de traducción. Ambos producen una incapacidad para producir el producto del gen original.

Pueden transportarse secuencias antisentido de ADN o ARN a las células. Se han desarrollado varias modificaciones químicas para prolongar la estabilidad y para mejorar la función de estas moléculas sin interferir en su capacidad para reconocer secuencias específicas. Éstas incluyen aumentar su resistencia a la degradación por ADNasas, incluyendo fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforotioatos, alfa-anómeros, aumentar su afinidad por su diana mediante enlace covalente a diversos agentes intercalantes, tales como psoralenos, y aumentar la captación por células mediante la conjugación con diversos grupos, incluyendo polilisina. Estas moléculas reconocen secuencias específicas codificadas por ARNm, y su hibridación evita la traducción y los aumentos en la degradación de estos mensajes.

Las composiciones conjugadas de la invención proporcionan un medio específico y eficaz para terminar la expresión de genes que provocan transformación neoplásica. La GCC experimenta una endocitosis inducida por el ligando y puede transportar compuestos conjugados al citoplasma de células.

Los restos de unión a GCC se conjugan directamente a composiciones antisentido, tales como ácidos nucleicos que son activos para inducir una respuesta. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido a MYC se conjugan directamente con

un anticuerpo anti-GCC. Esto se ha realizado empleando péptidos que se unen al receptor CD4. Véase, Cohen, I.S., ed., *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Topics in Molecular and Structural Biology, CRC Press, Inc., Boca Ratón, 1989. El esqueleto concreto y su síntesis no se especifican y pueden seleccionarse de técnicas bien establecidas. La síntesis implicaría la conjugación química o la síntesis directa de la molécula quimérica mediante una síntesis en fase sólida empleando la química de FMOC. Véase, Haralambidis, J. *et al.* (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28:5199-5202. Como alternativa, el conjugado de péptido-ácido nucleico puede sintetizarse directamente mediante una síntesis en fase sólida como una quimera de péptido-péptido-ácido nucleico mediante una síntesis en fase sólida. Véase, Nielsen, P.E. *et al.* (1994), *Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand.*, *Gene*, 149:139-145.

En algunas realizaciones, la polilisina puede complejarse con composiciones conjugadas de la invención de una manera no covalente con ácidos nucleicos y emplearse para potenciar el transporte de estas moléculas hacia el citoplasma de células. Además, pueden conjugarse péptidos y proteínas con la polilisina de una manera covalente, y este conjugado puede complejarse con ácidos nucleicos de una manera no covalente para potenciar aún más la especificidad y la eficacia de la captación de los ácidos nucleicos hacia el interior de las células. Por tanto, el ligando de GCC se conjuga de modo químico con la polilisina mediante técnicas catabilizadas. El conjugado de polilisina-ligando del producto de la traducción de GCC-1 puede formar un complejo con ácidos nucleicos elegidos. Por tanto, los conjugados de polilisina-orosomucoide se emplean para expresar de modo específico plásmidos que contienen genes en células de hepatoma que expresan el receptor orosomucoide. Esta estrategia puede utilizarse para transportar genes completos u oligonucleótidos. Por tanto, tiene el potencial de terminar la expresión de un gen indeseado (por ejemplo, MYC, ras) o reemplazar la función de un gen perdido o deleciónado (por ejemplo, hMSH2, hMLH1, HPMS1, y hPMS2).

Según una realización preferida, Myc actúa como un gen cuya expresión es inhibida por una molécula antisentido dentro de una composición conjugada. Los restos de unión a GCC se emplean para transportar un oligonucleótido de 15 bases antisentido a myc complementario con la región de inicio de la traducción del exón IT. El oligonucleótido de 15 bases antisentido a MYC se sintetiza como se indica en Collins, J.F., Herman, P., Schuch, C., Bagby, G.C., Jr., *Journal of Clinical Investigation*, 89(5).1523-1527, mayo de 1992. En algunas realizaciones, la composición conjugada se conjuga con polilisina como se ha indicado previamente. Véase, Wu, G.Y. y Wu, C.H. (1988), *Evidence for ed gene delivery to Hep G2 hepatoma cells, in vitro*, *Biochem.*, 27:887-892.

Las composiciones conjugadas pueden sintetizarse como una molécula quimérica directamente mediante una síntesis en fase sólida, y concentraciones de pmolar a nanomolar de este conjugado suprimen la síntesis de MYC en células de cáncer colorrectal *in vitro*.

Las moléculas antisentido preferiblemente se hibridan, es decir, son complementarias con una secuencia de nucleótidos que tiene una longitud de 5-50 nucleótidos, más preferiblemente 5-25 nucleótidos, y en algunas realizaciones 10-15 nucleótidos.

Además, también se consideran dentro del alcance de la descripción los desapareamientos dentro de las secuencias identificadas anteriormente, con las que se logran los métodos de la invención, de forma que las secuencias desapareadas son sustancialmente complementarias con las secuencias del gen del cáncer. Los desapareamientos que permiten una complementariedad sustancial con las secuencias de genes de cáncer serán conocidos por los expertos en la técnica una vez que hayan tomado en consideración la presente descripción. Los oligonucleótidos también pueden estar o no modificados.

Las composiciones terapéuticas y los métodos pueden utilizarse para combatir el cáncer de estómago o esofágico en los casos en que el cáncer está localizado y/o está metastatizado. A los individuos se les administra una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto conjugado. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para provocar un efecto citotóxico o citostático sobre células de cáncer sin provocar efectos secundarios letales en el individuo. Un individuo al que se le ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición conjugada tiene una mayor probabilidad de eliminar el cáncer de estómago o esofágico, comparado con el riesgo que tendría el individuo si no hubiera recibido la cantidad terapéuticamente eficaz.

Para tratar un cáncer de estómago o esofágico localizado se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conjugado, de forma que se pone en contacto con el tumor localizado. Por tanto, el compuesto conjugado puede administrarse por vía oral o intratumoral. La formulación oral y rectal se indica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una dosis única o en dosis múltiples. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los tratamientos de la presente invención pueden combinarse con terapias convencionales, que pueden administrarse de modo secuencial o simultáneo, y comprenden un resto de unión a GCC conjugado con un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia que es complementaria con una región de ADN o ARN de un gen del cáncer.

Los compuestos conjugados pueden administrarse a mamíferos en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, seleccionado con respecto a la vía prevista de administración y a la práctica farmacéutica habitual. Las

dosificaciones se ajustarán con respecto al peso y al trastorno clínico del paciente. Las composiciones conjugadas se administrarán durante el tiempo suficiente para que los mamíferos estén exentos de células indiferenciadas y/o de células que tengan un fenotipo anómalo. En los métodos terapéuticos, el tratamiento se extiende durante un tiempo suficiente para inhibir la proliferación de las células transformadas, y las composiciones conjugadas pueden administrarse junto con otros agentes quimioterapéuticos para gestionar y combatir el cáncer del paciente.

Los compuestos conjugados pueden emplearse en el método de la invención por sí solos o en combinación con otros compuestos. La cantidad que se va a administrar también dependerá de factores como la edad, el peso y el trastorno clínico del paciente. Véase, Gennaro, Alfonso, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA. Al menos un epitopo de una proteína GCC, de forma que cuando el vector infeccioso se administra a un individuo, el epitopo se expresa y actúa como diana para una respuesta inmunológica.

3) vacunas muertas o inactivadas que a) comprenden células muertas o partículas víricas inactivadas que muestran al menos un epitopo de una proteína GCC, y b) cuando se administran a un individuo actúan como diana para una respuesta inmunológica;

4) vacunas muertas o inactivadas haptinizadas que a) comprenden células muertas o partículas víricas inactivadas que muestran al menos un epitopo de una proteína GCC, b) están haptinizadas para que sean más inmunogénicas, y c) cuando se administran a un individuo actúan como diana para una respuesta inmunológica;

5) vacunas de subunidades que son vacunas que incluyen moléculas de proteínas que incluyen al menos un epitopo de una proteína GCC; y

6) vacunas de subunidades haptinizadas que son vacunas que a) incluyen moléculas de proteínas que incluyen al menos un epitopo de una proteína GCC, y b) están haptinizadas para que sean más inmunogénicas.

La presente invención se refiere a la administración a un individuo de una proteína o una molécula de ácido nucleico que comprende o codifica, respectivamente, un epitopo inmunogénico contra el cual puede inducirse una respuesta inmunológica terapéutica y profiláctica. Estos epitopos en general tienen una longitud de al menos 6-8 aminoácidos. Las vacunas de la invención, por tanto, comprenden proteínas que tienen al menos, o ácidos nucleicos que codifican al menos una longitud de 6-8 aminoácidos de una proteína GCC. Las vacunas de la invención pueden comprender proteínas que tienen al menos, o ácidos nucleicos que codifican al menos una longitud de 10 a aproximadamente 1000 aminoácidos. Las vacunas de la invención pueden comprender proteínas que tienen al menos, o ácidos nucleicos que codifican al menos una longitud de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 aminoácidos. Las vacunas de la invención pueden comprender proteínas que tienen al menos, o ácidos nucleicos que codifican al menos una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 400 aminoácidos. Las vacunas de la invención pueden comprender proteínas que tienen al menos, o ácidos nucleicos que codifican al menos una longitud de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 aminoácidos.

La presente invención se refiere a composiciones y a métodos para tratar individuos de los cuales se sabe que tienen células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. El cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico puede ser diagnosticado por los expertos en la técnica utilizando métodos descritos en la presente o mediante protocolos de patología clínica y de laboratorio aceptados en la técnica. La presente invención proporciona una vacuna inmunoterapéutica útil para tratar individuos que se han diagnosticado como que padecen cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico. Las vacunas inmunoterapéuticas de la presente invención pueden administrarse en combinación con otras terapias.

La presente invención se refiere a composiciones y a métodos para prevenir el cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico en individuos sospechosos de ser susceptibles al cáncer de estómago o esofágico. Estos individuos incluyen aquellos cuya historia médica familiar indica una incidencia por encima de la media de cáncer de estómago o esofágico entre los miembros de la familia y/o aquellos que ya han desarrollado cáncer de estómago o esofágico y se han tratado de modo eficaz y que, por tanto, se enfrentan a un riesgo de recaída y recurrencia. Estos individuos incluyen aquellos que han sido diagnosticados con cáncer de estómago o esofágico, incluyendo cáncer de estómago o esofágico localizado sólo o localizado y metastatizado que haya sido extirpado o tratado de otra forma. Las vacunas de la presente invención pueden utilizarse en individuos susceptibles de modo profiláctico para prevenir y combatir el cáncer de estómago o esofágico primario y metastásico.

La invención se refiere a composiciones que son los componentes activos de dichas vacunas o que son necesarias para preparar los componentes activos, a métodos para fabricar dichas composiciones que incluyen los componentes activos, y a métodos para preparar y utilizar las vacunas.

Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la GCC se indican en SEQ ID NO:1.

La presente invención se refiere a vectores recombinantes, incluyendo vectores de expresión, que comprenden la transcripción del gen GCC o su fragmento. La presente invención se refiere a vectores recombinantes, incluyendo vectores de expresión que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una proteína GCC o su fragmento funcional.

La presente invención se refiere a células hospedantes que comprenden dichos vectores y a métodos para preparar la proteína GCC utilizando dichas células recombinantes.

La presente invención se refiere a la transcripción del gen GCC aislada y a las proteínas GCC aisladas, y a anticuerpos aislados específicos de dicha proteína, y a hibridomas que producen dichos anticuerpos.

La presente invención se refiere a la GCC aislada y a sus fragmentos funcionales. Por consiguiente, algunos aspectos de la invención se refieren a proteínas aisladas que comprenden al menos un epítipo de una GCC.

Algunos aspectos de la invención se refieren a las proteínas aisladas descritas anteriormente que están haptenizadas para hacer que sean más inmunogénicas. Es decir, algunos aspectos de la invención se refieren a proteínas haptenizadas que comprenden al menos un epítipo de GCC.

Por consiguiente, algunos aspectos de la invención se refieren a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican proteínas que comprenden al menos un epítipo de GCC.

Se describen vacunas de ADN desnudo en el documento PCT/US90/01515. Otros indican el uso de la transferencia de ADN mediada por liposomas, el transporte de ADN utilizando microproyectiles (patente de EEUU n° 4.945.050, otorgada el 31 de julio, 1990, de Sanford *et al.*) y el transporte de ADN utilizando la electroporación. En cada caso, el ADN puede ser ADN plasmídico que se produce en bacterias, se aísla y se administra al animal que se va a tratar. Las moléculas de ADN plasmídico son captadas por las células del animal, en las que se expresan las secuencias que codifican la proteína de interés. La proteína producida de esta manera proporciona un efecto terapéutico o profiláctico en el animal.

El uso de vectores, incluyendo vectores víricos y otros medios para transportar moléculas de ácidos nucleicos a células de un individuo para producir un efecto inmunológico terapéutico y/o profiláctico en el individuo también es muy conocido. Se describen vacunas recombinantes que emplean vectores de vaccinia, por ejemplo, en la patente de EEUU n° 5.017.487, otorgada el 21 de mayo, 1991, de Stunnenberg *et al.*

En algunos casos, las células tumorales del paciente se matan o se inactivan y se administran como un producto de vacuna. Berd *et al.*, mayo de 1986, Cancer Research, 46:2572-2577, y Berd *et al.*, mayo de 1991, Cancer Research, 51:2731-2734, describen la preparación y el uso de productos de vacuna basados en células tumorales. Según algunos aspectos de la presente invención, los métodos y las técnicas descritos en Berd *et al.* se adaptan utilizando células de cáncer de estómago o esofágico en lugar de células de melanoma.

La fabricación y el uso de productos de la traducción aislados y sus fragmentos útiles, por ejemplo, como reactivos de laboratorio o componentes de vacunas de subunidades es muy conocido. Los expertos en la técnica pueden aislar la transcripción del gen de GCC o su porción específica que codifica la GCC o su fragmento. Una vez aislada, la molécula de ácido nucleico puede insertarse en un vector de expresión utilizando técnicas convencionales y materiales de partida disponibles con facilidad.

El vector de expresión recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ácido nucleico que codifica la GCC o su fragmento, o una proteína que comprende la GCC o su fragmento. Los vectores de expresión recombinantes de la invención son útiles para transformar hospedantes para preparar sistemas de expresión recombinantes para preparar las proteínas aisladas de la invención.

La presente invención se refiere a una célula hospedante que comprende el vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína GCC o su fragmento, o una GCC o su fragmento. Las células hospedantes para su uso en sistemas de expresión recombinantes conocidos para la producción de proteínas son muy conocidas y pueden obtenerse con facilidad. Los ejemplos de células hospedantes incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, células de levadura, tal como *S. cerevisiae*, células de insecto, tales como *S. frugiperda*, células de cultivo de tejidos de mamífero no humano, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de cultivo de tejido humano, tales como células HeLa.

La presente invención se refiere a un mamífero no humano transgénico que comprende el vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas de la invención. Los mamíferos no humanos transgénicos útiles para producir proteínas recombinantes son muy conocidos, al igual los vectores de expresión necesarios y las técnicas para generar animales transgénicos. En general, el animal transgénico comprende un vector de expresión recombinante en que la secuencia de nucleótidos que codifica la GCC o su fragmento, o una proteína que comprende GCC o su fragmento, está unida de forma operable a un promotor específico de células de mamífero mediante el cual la secuencia codificadora sólo se expresa en células de mamífero, y la proteína recombinante expresada de esta manera se recupera de la leche del animal.

En algunas realizaciones, por ejemplo, los expertos en la técnica, utilizando técnicas muy conocidas, insertan estas moléculas de ADN en un vector de expresión disponible en el mercado para su uso en sistemas de expresión muy conocidos, tales como los descritos en la presente.

El vector de expresión que incluye el ADN que codifica una GCC o su fragmento funcional, o una proteína que comprende GCC o su fragmento, se emplea para transformar el hospedante compatible, que entonces se cultiva y se mantiene bajo condiciones en las que la expresión del ADN extraño tiene lugar. La proteína de la presente invención producida de esta manera se recupera del cultivo, lisando las células o a partir del medio de cultivo, según sea apropiado y es conocido por los expertos en la técnica. Los métodos para purificar la GCC o su fragmento, o una proteína que la comprende, utilizando anticuerpos que se unen de modo específico a la proteína son muy conocidos. Los anticuerpos que se unen de modo específico a una proteína concreta pueden utilizarse para purificar la proteína a partir de fuentes naturales utilizando técnicas muy conocidas y materiales de partida que pueden obtenerse con facilidad. Estos anticuerpos también pueden utilizarse para purificar la proteína a partir del material presente cuando se produce la proteína mediante la metodología del ADN recombinante. La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a un epitopo que está presente sobre uno o más productos de la traducción de GCC-1 o su fragmento, o una proteína que los comprende. Los anticuerpos que se unen a un epitopo que está presente sobre la GCC son útiles para aislar y purificar la proteína de fuentes naturales o de sistemas de expresión recombinantes utilizando técnicas muy conocidas, tales como la cromatografía de afinidad. Las técnicas de inmovilización se describen en general en Waldman *et al.*, 1991, *Methods of Enzymol.*, 195:391-396. Los anticuerpos son útiles para detectar la presencia de dicha proteína en una muestra y para determinar si las células están expresando la proteína. La producción de anticuerpos y las estructuras proteicas de anticuerpos completos e intactos, de fragmentos Fab y de fragmentos F(ab)₂, y la organización de las secuencias genéticas que codifican dichas moléculas son muy conocidas y se describen, por ejemplo, en Harlow, E. y D. Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

En algunas realizaciones de la invención, se generan animales no humanos transgénicos. Los animales transgénicos según la invención contienen nucleótidos que codifican GCC o su fragmento, o una proteína que los comprende, bajo el control regulador de un promotor específico de mamíferos. Los expertos en la técnica, utilizando técnicas convencionales, tales como las indicadas en la patente de EEUU n° 4.873.191, otorgada el 10 de octubre, 1989, de Wagner, y la patente de EEUU n° 4.736.866, otorgada el 12 de abril, 1988, de Leder, pueden producir animales transgénicos que producen GCC o su fragmento, o una proteína que los comprende. Los animales preferidos son cabras y roedores, en particular ratas y ratones.

Además de producir estas proteínas mediante técnicas recombinantes también pueden emplearse sintetizadores de péptidos automáticos para producir la GCC o su fragmento, o una proteína que los comprende. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica y son útiles si se requieren derivados que tengan sustituciones que no son proporcionadas por la producción de la proteína codificada por ADN.

En algunas realizaciones, la proteína que forma la vacuna de subunidades o las células o partículas de una vacuna muerta o inactivada pueden haptinizarse para aumentar la inmunogenicidad. En algunos casos, la haptización es la conjugación de una estructura molecular más grande a GCC o a su fragmento, o a una proteína que los comprende. En algunos casos, las células tumorales del paciente se matan y haptizan como un medio para fabricar un producto de vacuna eficaz. En los casos en que otras células, tales como bacterias o células eucariotas que se proporcionan con la información genética para fabricar y presentar una GCC o su fragmento, o una proteína que los comprende, se matan y se emplean como el componente de vacuna activo, estas células se haptizan para aumentar la inmunogenicidad. La haptización es muy conocida y puede realizarse con facilidad.

Los métodos para haptizar células en general, y células tumorales en particular, se describen en Berd *et al.*, mayo de 1986, *Cancer Research*, 46:2572-2577, y Berd *et al.*, mayo de 1991, *Cancer Research*, 51:2731-2734. Otros protocolos de haptización se describen en Miller *et al.*, 1976, *J. Immunol.*, 117(5:1):1591-1526.

Las composiciones y los métodos de haptización que se pueden adaptar para ser utilizados para preparar inmunógenos de GCC haptizados según la presente invención incluyen los descritos en las siguientes patentes de EEUU: patente de EEUU n° 5.037.645, otorgada el 6 de agosto de 1991, de Strahilevitz; patente de EEUU n° 5.112.606, otorgada el 12 de mayo de 1992, de Shiosaka *et al.*; patente de EEUU n° 4.526.716, otorgada el 2 de julio de 1985, de Stevens; patente de EEUU n° 4.329.281, otorgada el 11 de mayo de 1982, de Christenson *et al.*; y patente de EEUU n° 4.022.878, otorgada el 10 de mayo de 1977, de Gross. También se describen vacunas peptídicas y métodos para potenciar la inmunogenicidad de péptidos que pueden adaptarse para modificar los inmunógenos de GCC de la invención en Francis *et al.*, 1989, *Methods of Enzymol.*, 178:659-676. Sad *et al.*, 1992, *Immunology*, 76:599-603, indican métodos para preparar vacunas inmunoterapéuticas conjugando la hormona liberadora de gonadotropina al toxoide de la difteria. Los inmunógenos de GCC pueden conjugarse de modo similar para producir una vacuna inmunoterapéutica de la presente invención. MacLean *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.*, 36:215-222, describen metodologías de conjugación para producir vacunas inmunoterapéuticas que pueden adaptarse para producir una vacuna inmunoterapéutica de la presente invención. El hapteno es la hemocianina de lapa que pueden conjugarse con un inmunógeno de GCC.

Las vacunas según algunos aspectos de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con un inmunógeno de GCC. Las formulaciones farmacéuticas son muy conocidas, y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas pueden ser formuladas por los expertos en la técnica de modo habitual. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, A. Osol, un texto de referencia convencional en este campo. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica inyectable que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inmunógeno de GCC. El inmunógeno de GCC es preferiblemente estéril y se combina con un vehículo farmacéutico estéril.

En algunas realizaciones, por ejemplo, la GCC o su fragmento, o una proteína que los comprende, puede formularse como una disolución, una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de dichos vehículos son agua, disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, y albúmina de suero humana al 5%. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles. El vehículo o el polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas empleadas de modo habitual.

Una composición inyectable puede comprender el inmunógeno de GCC en un agente diluyente, como por ejemplo agua estéril, electrolitos/dextrosa, aceites grasos de origen vegetal, ésteres grasos, o polioles, tales como propilenglicol y polietilenglicol. Los compuestos inyectables deben ser estériles y apirógenos.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio que permita presentar el agente inmunogénico al sistema inmunológico del cuerpo para su reconocimiento y para la inducción de una respuesta inmunológica. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, intramuscular.

Las dosificaciones varían dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; la edad, la salud y el peso del receptor; la naturaleza y el grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Se administra una cantidad de inmunógeno para inducir una respuesta inmunológica protectora o terapéuticamente eficaz. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad el intervalo y la dosificación óptima mediante métodos habituales.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplos

Tal como se indicó anteriormente, un resto de unión a GCC es un ligando de GCC que puede ser un anticuerpo, una proteína, un polipéptido, un péptido o un no péptido. Los ligandos de GCC peptídicos y no peptídicos pueden identificarse utilizando tecnologías muy conocidas.

En los últimos 10 años, se ha reconocido que la interacción específica de alta afinidad de un receptor y un ligando, por ejemplo una GCC y un anticuerpo anti-GCC, se basa en el espacio conformacional tridimensional del ligando y la configuración tridimensional complementaria de la región de la molécula implicada en la unión del ligando. Además, se ha reconocido que diversos conjuntos de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y moléculas orgánicas pueden organizarse en configuraciones que no están relacionadas con los ligandos naturales en su estructura lineal, pero que se parecen a la estructura tridimensional de los ligandos naturales en el espacio conformacional y, por tanto, son reconocidos por receptores con alta afinidad y especificidad. Además, se han descrito técnicas en la bibliografía que permiten a los expertos en la técnica generar grandes bancos de estos conjuntos de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, y compuestos orgánicos para identificar posibles compuestos individuales que interaccionan con receptores con alta afinidad y especificidad que no están relacionados con el ligando nativo del receptor. Es decir, para los expertos en la técnica resulta relativamente sencillo identificar conjuntos de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, o compuestos orgánicos que pueden unirse de modo específico y fuerte con la GCC, que no tengan relación estructural con un anticuerpo anti-GCC.

Para identificar ligandos de GCC que son péptidos, los expertos en la técnica pueden utilizar cualquiera de las metodologías muy conocidas para seleccionar bancos de péptidos aleatorios para identificar péptidos que se unen a la GCC. En la metodología más básica, los péptidos que se unen a la diana se aíslan y se secuencian. En algunas metodologías, cada péptido aleatorio se une a una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia codificadora para ese péptido aleatorio concreto. Los péptidos aleatorios, cada uno con una secuencia codificadora unida, se ponen en contacto con una GCC y se retiran los péptidos que no se unen a la GCC. La molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia codificadora del péptido que se une a la GCC entonces puede utilizarse para determinar la secuencia de aminoácidos del péptido, así como para producir grandes cantidades del péptido. También es posible producir bancos peptídicos sobre soportes sólidos en los que la localización espacial sobre el soporte se corresponde con una síntesis específica y, por tanto, con un péptido específico. Estos métodos a menudo utilizan etapas de tipo fotolitográfico para crear diversos bancos de péptidos sobre soportes sólidos en los que las señas espaciales sobre el soporte permiten la determinación de la secuencia.

La producción de bancos de compuestos orgánicos sobre soportes sólidos también puede utilizarse para producir bancos combinatorios de compuestos no peptídicos, tales como oligonucleótidos y azúcares, por ejemplo. Al igual que en el caso de bancos de péptidos sobre soportes sólidos, la localización espacial sobre el soporte se corresponde con una síntesis específica y, por tanto, con un compuesto específico. Estos métodos a menudo utilizan etapas de tipo fotolitográfico para crear diversos bancos de compuestos sobre soportes sólidos en los que las señas espaciales sobre el soporte permiten la determinación del esquema de síntesis que produce el compuesto. Cuando se ha identificado el esquema de síntesis, la estructura del compuesto puede conocerse.

Gallop *et al.*, 1994, J. Medicinal Chemistry, 37:1233, proporcionan un informe de varias de las diversas metodologías de seleccionar bancos de péptidos aleatorios e identificar péptidos a partir de dichos bancos que se unen a

proteínas diana. Siguiendo estas indicaciones, los ligandos específicos de GCC que son péptidos y que son útiles como restos de unión específica a GCC pueden ser identificados por los expertos en la técnica.

Se describen péptidos y proteínas presentadas sobre partículas de fago en Gallop *et al.*, *supra*. Pueden insertarse conjuntos aleatorios de ácidos nucleicos en genes que codifican proteínas de la superficie de bacteriófagos que se emplean para infectar bacterias, produciendo fagos que expresan sobre su superficie los péptidos codificados por el conjunto aleatorio de nucleótidos. Este fago que presenta el péptido puede emplearse para determinar si estos péptidos pueden unirse a proteínas específicas, receptores, anticuerpos, etc. La identidad del péptido puede determinarse secuenciando el ADN recombinante del fago que expresa el péptido. Esta estrategia tiene el potencial de producir vastos conjuntos de péptidos en un banco (de hasta 10^9 péptidos exclusivos). Esta técnica se ha empleado para identificar nuevos péptidos de unión al receptor de fibrinógeno sobre plaquetas, que no presentan homología de secuencia con los ligandos naturales de este receptor (Smith *et al.*, 1993, *Gene*, 128:37). De manera similar, esta técnica se ha aplicado para identificar péptidos que se unen al receptor de MHC de clase II (Hammer *et al.*, 1993, *Cell*, 74:197) y al receptor de chaperonina (Blond-Elguindi *et al.*, 1993, *Cell*, 75:717).

Los péptidos presentados sobre plásmidos se describen en Gallop *et al.*, *supra*. En esta estrategia, los oligonucleótidos aleatorios que codifican el banco de péptidos pueden expresarse sobre un plásmido específico cuya expresión está bajo el control de un promotor específico, tal como el operón lac. Los péptidos se expresan como proteínas de fusión acopladas con la proteína Lac I, bajo el control del operón lac. La proteína de fusión se une de modo específico con el operador lac en el plásmido y, de esta forma, el péptido aleatorio se asocia con el elemento de ADN específico que lo codifica. De esta manera, la secuencia del péptido puede deducirse, mediante PCR del ADN asociado con la proteína de fusión. Estas proteínas pueden seleccionarse en fase de disolución para determinar si se unen a receptores específicos. Empleando esta estrategia se han identificado nuevos sustratos para enzimas específicas (Schatz, 1993).

Puede emplearse una variación de la anterior técnica, también descrita en Gallop *et al.*, *supra*, en la que oligonucleótidos aleatorios que codifican bancos de péptidos en plásmidos pueden expresarse en sistemas sin células. En esta estrategia, puede construirse un banco de ADN molecular que contenga un conjunto aleatorio de oligonucleótidos, que entonces se expresan en un sistema de transcripción/traducción bacteriano *in vitro*. La identidad del ligando se determina purificando el complejo de polisoma/cadena peptídica nascente que contiene el ARNm de interés sobre resinas de afinidad compuestas del receptor y después secuenciando después de una amplificación con RT-PCR. El empleo de esta técnica permite la generación de grandes bancos (de hasta 10^{11} recombinantes). Se han identificado péptidos que reconocen los anticuerpos dirigidos de modo específico a dinorfina empleando esta técnica (Cull *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1865).

Pueden generarse bancos de péptidos para seleccionar contra un receptor mediante síntesis química. Por ejemplo, se ha realizado la preparación simultánea de un gran número de péptidos diversos empleando la estrategia de la síntesis de múltiples péptidos, según se describe en Gallop *et al.*, *supra*. En una aplicación, se generan péptidos aleatorios mediante una síntesis de Merrifield en fase sólida convencional sobre placas de microvaloración de poliácridamida (síntesis Multipin) que posteriormente se seleccionan para su capacidad para competir con la unión al receptor en un ensayo de unión competitiva convencional (Wang *et al.*, 1993, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3:447). En efecto, esta estrategia se ha empleado para identificar nuevos péptidos de unión al receptor de la sustancia P (Wang *et al.*, *supra*). De forma similar, pueden construirse bancos de péptidos mediante la síntesis de múltiples péptidos que emplean el método de la "bolsa de té", en el que se incuban de modo secuencial bolsas de resina de soporte sólido con diversos aminoácidos para generar conjuntos de diferentes péptidos (Gallop *et al.*, *supra*). Empleando esta estrategia se han identificado péptidos que se unen al receptor de integrina (Ruggeri *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5708) y al receptor del neuropéptido Y (Beck-Sickinger *et al.*, 1990, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:522).

En general, la generación y la utilidad de los bancos combinatorios depende (1) del métodos para generar diversos conjuntos de bloques constitutivos, (2) del método para identificar los miembros del conjunto que producen la función deseada, y (3) del método para dilucidar la estructura de ese miembro. Se han definido varias estrategias para estas restricciones.

A continuación se expone una descripción de los métodos de generación de bancos que pueden utilizarse en los procedimientos para identificar los ligandos de GCC según la invención.

Pueden emplearse modificaciones de las anteriores estrategias para generar bancos de vasta diversidad molecular conectando entre sí a los miembros de un grupo de bloques constituyentes químicos, tales como aminoácidos, en todas las combinaciones posibles (Gallop *et al.*, *supra*). En una estrategia, mezclas de monómeros activados se acoplan a una cadena en crecimiento de aminoácidos sobre un soporte sólido en cada ciclo. Este es un sistema sintético multivalente.

Además, la síntesis dividida implica incubar la cadena en crecimiento en reacciones individuales que contienen sólo un único bloque constituyente (Gallop *et al.*, *supra*). Tras la unión se mezcla la resina de todas las reacciones y se distribuye en reacciones individuales para la siguiente etapa de acoplamiento. Estas estrategias producen una colección estocástica de n^x péptidos diferentes para la selección, en la que n es el número de bloques constituyentes y x es el número de ciclos de reacción.

Como alternativa, pueden generarse conjuntos de moléculas en las que una o más posiciones contienen aminoácidos conocidos, mientras que el resto son aleatorias (Gallop *et al.*, *supra*). Esto produce un banco limitado que se

selecciona para miembros con la actividad deseada. Estos miembros se identifican, se determina su estructura, y la estructura se regenera con otra posición que contiene los aminoácidos definidos y se seleccionan. Esta estrategia iterativa produce, en último término, péptidos que son óptimos para reconocer el bolsillo de unión conformacional de un receptor.

Además, los conjuntos no se limitan a aminoácidos que forman péptidos, sino que pueden extenderse a conjuntos lineales y no lineales de moléculas orgánicas (Gordon *et al.*, 1994, J. Medicinal Chemistry, 37:1385). En efecto, empleando esta estrategia de generar bancos de bloques constituyentes inorgánicos con conjuntos aleatorios se identificaron ligandos que se unen a receptores 7-transmembrana (Zuckermann *et al.*, 1994, J. Med. Chem., 37: 2678).

En la actualidad se están construyendo bancos que pueden modificarse después de la síntesis para alterar los grupos laterales químicos y los enlaces para producir conjuntos “diseñados” para ensayar la interacción con receptores (Osteresh *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:11138). Esta técnica de generar “bancos a partir de bancos” se aplicó a la permetilación de un banco de péptidos que produjo compuestos con actividad antimicrobiana selectiva contra bacterias gram positivas.

También se están construyendo bancos para expresar conjuntos de motivos farmacológicos en lugar de conjuntos estructurales específicos de aminoácidos (Sepetov *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:5426). Esta técnica busca identificar motivos estructurales que tiene afinidades específicas por receptores, que puede modificarse con más perfeccionamientos empleando bancos para definir relaciones de estructura-actividad. Empleando esta estrategia de buscar en bancos de motivos, generando “bancos a partir de bancos”, se reduce el número de miembros componentes necesarios para seleccionar en la fase temprana del estudio de los bancos.

A continuación se ofrece una descripción de métodos para identificar ligandos de GCC según la invención a partir de bancos de moléculas generadas de modo aleatorio.

Los componentes en el banco que interaccionan con receptores pueden identificarse mediante su unión a receptores inmovilizados sobre un soporte sólido (Gordon *et al.*, *supra*).

También pueden identificarse por su capacidad para competir con el ligando nativo en la unión a receptores cognados en fase de disolución (Gordon *et al.*, *supra*).

Los componentes pueden identificarse por su unión a receptores solubles cuando estos componentes están inmovilizados sobre soportes sólidos (Gordon *et al.*, *supra*).

Cuando se ha identificado un miembro de un banco que se une a receptores, la estructura de este miembro debe dilucidarse (deducirse) para identificar la estructura y generar grandes cantidades para trabajar con ellas, o desarrollar otros análogos para estudiar las relaciones de estructura-actividad. A continuación se ofrece una descripción de métodos de dilucidación para deducir la estructura de moléculas identificadas como ligandos de GCC potenciales según la invención.

Pueden expresarse bancos de péptidos sobre la superficie de partículas de bacteriófagos (Gallop *et al.*, *supra*). Cuando se ha identificado el péptido que interacciona con el receptor, su estructura puede deducirse aislando el ADN del fago y determinando su secuencia mediante PCR.

Pueden dilucidarse bancos expresados sobre plásmidos, bajo el control del operón Lac, puesto que estos péptidos están condensados con la proteína lac I que interacciona de modo específico con el operón lac sobre el plásmido que codifica el péptido (Gallop *et al.*, *supra*). La estructura puede deducirse aislando el plásmido unido a la proteína lac I y deduciendo la secuencia de nucleótidos y del péptido mediante PCR.

Los bancos expresados sobre plásmidos también pueden expresarse en sistemas sin células empleando sistemas de transcripción/traducción (Gallop *et al.*, *supra*). En este paradigma, la proteína que interacciona con los receptores se aísla con su ARNm y ribosoma unido. La secuencia del péptido se deduce mediante RT-PCR del ARNm asociado.

La construcción de bancos puede acoplarse con fotolitografía, de forma que la estructura de cualquier miembro del banco pueda deducirse determinando su posición dentro del conjunto del sustrato (Gallop *et al.*, *supra*). Esta técnica se denomina señalización posicional, puesto que la información estructural puede deducirse de la posición concreta del miembro.

Los miembros de un banco también pueden identificarse marcando el banco con conjuntos identificables de otras moléculas (Ohlmeyer *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10922, y Gallop *et al.*, *supra*). Esta técnica es una modificación de la asociación del péptido con el plásmido del fago que codifica la secuencia, descrita anteriormente. Algunos métodos emplean conjuntos de nucleótidos para codificar la historia sintética secuencial del péptido. Por tanto, se unen nucleótidos al péptido en crecimiento de modo secuencial, y pueden descodificarse mediante PCR para producir la estructura del péptido asociado. Como alternativa, pueden emplearse conjuntos de moléculas orgánicas pequeñas como marcadores secuenciables que codifican la historia sintética secuencial del péptido. Por tanto, se unen nucleótidos al péptido en crecimiento de modo secuencial, y pueden descodificarse mediante PCR para producir la

estructura del péptido asociado. Como alternativa, pueden emplearse conjuntos de moléculas orgánicas pequeñas como marcadores secuenciabiles que codifican la historia sintética secuencial del miembro del banco.

5 Por último, la estructura de un miembro del banco puede determinarse directamente mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos.

10 Las siguientes patentes, que se incorporan en la presente como referencia, describen métodos para fabricar bancos peptídicos o no peptídicos aleatorios y para seleccionar estos bancos para identificar compuestos que se unen a proteínas diana. Tal como se emplean en la presente invención, las GCC pueden ser las dianas utilizadas para identificar ligandos peptídicos y no peptídicos generados y seleccionados como se describe en las patentes.

15 La patente de EEUU nº 5.270.170, otorgada a Schatz *et al.* el 14 de diciembre de 1993, y la patente de EEUU nº 5.338.665, otorgada a Schatz *et al.* el 16 de agosto de 1994, se refieren a bancos peptídicos y a métodos de selección que pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

La patente de EEUU nº 5.395.750, otorgada a Dillon *et al.* el 7 de marzo de 1995, se refiere a métodos para producir proteínas que se unen a antígenos predeterminados. Estos métodos pueden utilizarse para producir ligandos de GCC.

20 La patente de EEUU nº 5.223.409, otorgada a Ladner *et al.* el 29 de junio de 1993, se refiere a la evolución dirigida a nuevas proteínas de unión. Estas proteínas pueden producirse y seleccionarse como se describe en la patente para identificar ligandos de GCC.

25 La patente de EEUU nº 5.366.862, otorgada a Venton *et al.* el 22 de noviembre de 1994, se refiere a métodos para generar y seleccionar péptidos útiles. Los métodos descritos en la patente pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

30 La patente de EEUU nº 5.340.474, otorgada a Kauvar *et al.* el 23 de agosto de 1994, así como la patente de EEUU nº 5.133.866, la patente de EEUU nº 4.963.263, y la patente de EEUU nº 5.217.869, pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

La patente de EEUU nº 5.405.783, otorgada a Pirrung *et al.* el 11 de abril de 1995, se refiere a una síntesis de fase sólida fotolitográfica a gran escala de un conjunto de polímeros. Las indicaciones en la patente pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

35 La patente de EEUU nº 5.143.854, otorgada a Pirrung *et al.* el 1 de septiembre de 1992, se refiere a una síntesis de fase sólida fotolitográfica a gran escala de polipéptidos y a su selección por la unión a receptores.

40 La patente de EEUU nº 5.384.261, otorgada a Winkler *et al.* el 24 de enero de 1995, se refiere a una síntesis de polímeros inmovilizados utilizando patrones de flujo dirigidos de forma mecánica. Estos métodos son útiles para identificar ligandos de GCC.

45 La patente de EEUU nº 5.221.736, otorgada a Coolidge *et al.* el 22 de junio de 1993, se refiere a la síntesis de péptidos y oligonucleótidos secuencial utilizando técnicas de inmunoafinidad. Estas técnicas pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

La patente de EEUU nº 5.412.087, otorgada a McGall *et al.* el 2 de mayo de 1995, se refiere a la inmovilización espacialmente señalizada de oligonucleótidos y otros polímeros biológicos sobre superficies. Estos métodos pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

50 La patente de EEUU nº 5.324.483, otorgada a Cody *et al.* el 28 de junio de 1994, se refiere a un aparato para la síntesis simultánea múltiple. El aparato y el método descrito en la patente pueden utilizarse para producir múltiples compuestos que pueden seleccionarse para identificar ligandos de GCC.

55 La patente de EEUU nº 5.252.743, otorgada a Barrett *et al.* el 12 de octubre de 1993, se refiere a la inmovilización espacialmente señalizada de antiligandos sobre superficies. Los métodos y las composiciones descritas en la patente pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

60 La patente de EEUU nº 5.424.186, otorgada a Foder *et al.* el 13 de junio de 1995, se refiere a una síntesis de polímeros inmovilizados a muy gran escala. El método para sintetizar oligonucleótidos descrito en la patente puede utilizarse para identificar ligandos de GCC.

65 La patente de EEUU nº 5.420.328, otorgada a Campbell el 30 de mayo de 1995, se refiere a métodos para sintetizar ésteres fosfonato. Los ésteres fosfonato producidos de esta manera pueden seleccionarse para identificar compuestos que son ligandos de GCC.

La patente de EEUU nº 5.288.514, otorgada a Ellman el 24 de febrero de 1994, se refiere a una síntesis en fase sólida y combinatoria de compuestos de benzodiazepina sobre un soporte sólido. Estos métodos y compuestos pueden utilizarse para identificar ligandos de GCC.

ES 2 346 637 T3

Como se indicó anteriormente, los ligandos de GCC también pueden ser anticuerpos y sus fragmentos. En efecto, los anticuerpos generados contra determinantes exclusivos de estos receptores reconocerán esa proteína, y sólo esa proteína, y por consiguiente pueden actuar como molécula de transporte específico que puede emplearse para dirigir nuevos compuestos de diagnóstico y terapéuticos a este marcador exclusivo. Además, estos anticuerpos pueden utilizarse para identificar la presencia de GCC o sus fragmentos en muestras biológicas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para seleccionar un individuo sospechoso de tener cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico para detectar células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico, que comprende las etapas de estudiar una muestra de tejido extraintestinal y/o de fluidos corporales procedente de un individuo para determinar si la GCC está siendo expresada por la células en dicha muestra, en el que la expresión de dicha GCC indica la posibilidad de células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico en dicha muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de dicha GCC por dichas células se determina detectando la presencia de un producto de la transcripción del gen GCC.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de dicha GCC por dichas células se determina mediante una reacción en cadena de polimerasa, en el que dicha muestra se pone en contacto con cebadores que amplifican de modo selectivo la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la expresión de dicha GCC por dichas células se determina mediante un inmunoensayo, en el que dicha muestra se pone en contacto con anticuerpos que se unen de modo específico al producto de la traducción de GCC.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra es un fluido corporal.
6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra es sangre.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra es tejido y/o fluido linfático.
8. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de nódulo linfático.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el individuo se ha diagnosticado previamente con cáncer de estómago o esofágico.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el individuo se ha diagnosticado previamente y se ha tratado del cáncer de estómago o esofágico.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra es una célula tumoral.
12. Un método *in vitro* para seleccionar un individuo sospechoso de tener cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico para detectar células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico, que comprende las etapas de estudiar una muestra de tejido extraintestinal y/o de fluidos corporales procedente de un individuo para determinar si el producto de la transcripción o de la traducción del gen GCC está presente en dicha muestra, en el que la presencia de dicho producto de la transcripción o de la traducción del gen GCC en dicha muestra indica que el individuo puede tener células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico en dicha muestra.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende las etapas de estudiar una muestra de tejido extraintestinal y/o de fluidos corporales procedente de un individuo para determinar si el producto de la transcripción del gen GCC está presente en dicha muestra.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la presencia del producto de la transcripción del gen GCC se determina mediante una reacción en cadena de polimerasa, en el que dicha muestra se pone en contacto con cebadores que amplifican de modo selectivo la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta.
15. El método de la reivindicación 12, en el que la presencia del producto de la traducción del gen GCC se determina mediante un inmunoensayo, en el que dicha muestra se pone en contacto con anticuerpos que se unen de modo específico al producto de la traducción del gen GCC.
16. El método de la reivindicación 12, en el que dicha muestra es un fluido corporal.
17. El método de la reivindicación 12, en el que dicha muestra es sangre.
18. El método de la reivindicación 12, en el que dicha muestra es tejido y/o fluido linfático.
19. El método de la reivindicación 12, en el que dicha muestra es una muestra de nódulo linfático.
20. El método de la reivindicación 12, en el que el individuo se ha diagnosticado previamente con cáncer de estómago o esofágico.
21. El método de la reivindicación 12, en el que el individuo se ha diagnosticado previamente y se ha tratado del cáncer de estómago o esofágico.

22. Un método para diagnosticar un individuo que tiene cáncer de estómago, que comprende las etapas de estudiar una muestra de tejido de estómago para detectar la presencia de un producto de la transcripción o de la traducción de GCC, en el que la presencia del producto de la transcripción o de la traducción de GCC en una muestra de estómago indica cáncer de estómago.

5

23. El método de la reivindicación 22, que comprende las etapas de estudiar dicha muestra de tejido de estómago para determinar si el producto de la transcripción del gen GCC está presente en dicha muestra.

24. El método de la reivindicación 23, en el que la presencia del producto de la transcripción del gen GCC se determina mediante una reacción en cadena de polimerasa, en el que dicha muestra se pone en contacto con cebadores que amplifican de modo selectivo la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta.

10

25. El método de la reivindicación 23, en el que la presencia del producto de la traducción del gen GCC se determina mediante un inmunoensayo, en el que dicha muestra se pone en contacto con anticuerpos que se unen de modo específico al producto de la traducción del gen GCC.

15

26. Un método para diagnosticar un individuo que tiene cáncer esofágico, que comprende las etapas de estudiar una muestra de tejido de esófago para detectar la presencia de un producto de la transcripción o de la traducción de GCC, en el que la presencia del producto de la transcripción o de la traducción de GCC en una muestra de esófago indica cáncer de esófago.

20

27. El método de la reivindicación 26, que comprende las etapas de estudiar dicha muestra de tejido de esófago para determinar si el producto de la transcripción del gen GCC está presente en dicha muestra.

28. El método de la reivindicación 27, en el que la presencia del producto de la transcripción del gen GCC se determina mediante una reacción en cadena de polimerasa, en el que dicha muestra se pone en contacto con cebadores que amplifican de modo selectivo la transcripción del gen GCC o del ADNc generado a partir de ésta.

25

29. El método de la reivindicación 26, en el que la presencia del producto de la traducción del gen GCC se determina mediante un inmunoensayo, en el que dicha muestra se pone en contacto con anticuerpos que se unen de modo específico al producto de la traducción del gen GCC.

30

30. El uso de un ligando de GCC conjugado con un agente activo, en el que el agente activo se selecciona de una enzima activa, un compuesto quimioterapéutico, una toxina, un compuesto radioterapéutico, un agente de transporte dirigido o un agente radiosensibilizante para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico, en el que dicho ligando de GCC es un anticuerpo.

35

31. El uso según la reivindicación 30, en el que dicho agente activo se selecciona del grupo que consiste en metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4-fluorouracilo, melfalano, clorambucilo, *cis*-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, putorinina, macromicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria, fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antiviral de la hierba carmín, abrina, cadena A de la abrina, factor del veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol, misonidazol, ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , $^{193\text{M}}\text{Pt}$, ^{197}Hg , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi .

45

32. El uso de la reivindicación 31, en el que dicho anticuerpo está humanizado, primatizado o es humano.

33. El uso de la reivindicación 31, en el que dicho ligando de GCC es un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo quimérico.

50

34. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 30-33, en el que dicho ligando de GCC es un anticuerpo completo e intacto, un fragmento Fab o un fragmento F(ab)₂.

55

35. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, en el que el agente activo es un agente quimioterapéutico que provoca la muerte celular, inhibe la división celular o induce la diferenciación.

36. El uso de un ligando de GCC unido a un agente detectable para la fabricación de un medicamento para la formación de radioimágenes de células de cáncer de estómago o esofágico primario y/o metastásico, en el que dicho ligando de GCC es un anticuerpo.

60

37. El uso de la reivindicación 36, en el que dicho agente detectable se selecciona del grupo que consiste en ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , $^{193\text{M}}\text{Pt}$, ^{197}Hg , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{M}}\text{Kr}$, $^{87\text{M}}\text{Sr}$, $^{99\text{M}}\text{Tc}$, ^{111}In , $^{113\text{M}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi .

65

ES 2 346 637 T3

38. Un método para detectar pruebas de la expresión del gen GCC en una muestra de tejido esofágico procedente de un individuo susceptible al cáncer de estómago o esofágico, comprendiendo dicho método la etapa de estudiar una muestra de tejido esofágico procedente de un individuo para detectar la presencia de la proteína GCC en la muestra.

5 39. El método de la reivindicación 38, que comprende además la etapa de retirar la muestra de tejido esofágico del individuo antes de detectar la presencia de la proteína GCC.

10 40. El método de la reivindicación 38 o de la reivindicación 39, en el que la proteína GCC se detecta mediante un inmunoensayo en el que dicha muestra se pone en contacto con anticuerpos que se unen de modo específico a la proteína GCC.

15 41. Un método para detectar pruebas de la expresión del gen GCC en una muestra de tejido esofágico procedente de un individuo susceptible al cáncer de estómago o esofágico, comprendiendo dicho método la etapa de estudiar una muestra de tejido esofágico procedente de un individuo para detectar la presencia de ARNm que codifica la GCC.

42. El método de la reivindicación 41, que comprende además la etapa de retirar la muestra de tejido esofágico del individuo antes de detectar la presencia del ARNm que codifica la GCC.

20 43. El método de la reivindicación 41 o de la reivindicación 42, en el que el ARNm que codifica la GCC se detecta mediante una reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores que amplifican de modo selectivo el ARNm que codifica la GCC o del ADNc generado a partir de éste.

25 44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 38, 39, 41 ó 42, en el que el individuo ha sido previamente diagnosticado con cáncer de esófago.

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTA DE SECUENCIAS

ES 2 346 637 T3

	ttc cag atg tac ctt gac aca gaa ttg agc tac ccc atg atc tca gct	549
	Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala	
	130 135 140	
5	gga agt ttt gga ttg tca tgt gac tat aaa gaa acc tta acc agg ctg	597
	Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu	
	145 150 155 160	
10	atg tct cca gct aga aag ttg atg tac ttc ttg gtt aac ttt tgg aaa	645
	Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys	
	165 170 175	
15	acc aac gat ctg ccc ttc aaa act tat tcc tgg agc act tcg tat gtt	693
	Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val	
	180 185 190	
	tac aag aat ggt aca gaa act gag gac tgt ttc tgg tac ctt aat gct	741
	Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala	
	195 200 205	
20	ctg gag gct agc gtt tcc tat ttc tcc cac gaa ctc ggc ttt aag gtg	789
	Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val	
	210 215 220	
25	gtg tta aga caa gat aag gag ttt cag gat atc tta atg gac cac aac	837
	Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn	
	225 230 235 240	
	agg aaa agc aat gtg att att atg tgt ggt ggt cca gag ttc ctc tac	885
	Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr	
	245 250 255	
30	aag ctg aag ggt gac cga gca gtg gct gaa gac att gtc att att cta	933
	Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu	
	260 265 270	
35	gtg gat ctt ttc aat gac cag tac ttg gag gac aat gtc aca gcc cct	981
	Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro	
	275 280 285	
40	gac tat atg aaa aat gtc ctt gtt ctg acg ctg tct cct ggg aat tcc	1029
	Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser	
	290 295 300	
	ctt cta aat agc tct ttc tcc agg aat cta tca cca aca aaa cga gac	1077
	Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp	
	305 310 315 320	
45	ttt cgt ctt gcc tat ttg aat gga atc ctc gtc ttt gga cat atg ctg	1125
	Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Val Phe Gly His Met Leu	
	325 330 335	
50	aag ata ttt ctt gaa aat gga gaa aat att acc acc ccc aaa ttt gct	1173
	Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala	
	340 345 350	
	cat gcc ttc agg aat ctc act ttt gaa ggg tat gac ggt cca gtg acc	1221
	His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr	
	355 360 365	
55	ttg gat gac tgg ggg gat gtt gac agt acc atg gtg ctt ctg tat acc	1269
	Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr	
	370 375 380	
60	tct gtg gac acc aag aaa tac aag gtt ctt ttg acc tat gat acc cac	1317

ES 2 346 637 T3

	Ser	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	Tyr	Lys	Val	Leu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Thr	His	
	385					390					395					400	
5	gta	aat	aag	acc	tat	cct	gtg	gat	atg	agc	ccc	aca	ttc	act	tgg	aag	1365
	Val	Asn	Lys	Thr	Tyr	Pro	Val	Asp	Met	Ser	Pro	Thr	Phe	Thr	Trp	Lys	
					405					410					415		
10	aac	tct	aaa	ctt	cct	aat	gat	att	aca	ggc	cgg	ggc	cct	cag	atc	ctg	1413
	Asn	Ser	Lys	Leu	Pro	Asn	Asp	Ile	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu	
				420					425					430			
15	atg	att	gca	gtc	ttc	acc	ctc	act	gga	gct	gtg	gtg	ctg	ctc	ctg	ctc	1461
	Met	Ile	Ala	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	
			435					440					445				
20	gtc	gct	ctc	ctg	atg	ctc	aga	aaa	tat	aga	aaa	gat	tat	gaa	ctt	cgt	1509
	Val	Ala	Leu	Leu	Met	Leu	Arg	Lys	Tyr	Arg	Lys	Asp	Tyr	Glu	Leu	Arg	
		450					455					460					
25	cag	aaa	aaa	tgg	tcc	cac	att	cct	cct	gaa	aat	atc	ttt	cct	ctg	gag	1557
	Gln	Lys	Lys	Trp	Ser	His	Ile	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Phe	Pro	Leu	Glu	
	465					470					475					480	
30	acc	aat	gag	acc	aat	cat	gtt	agc	ctc	aag	atc	gat	gat	gac	aaa	aga	1605
	Thr	Asn	Glu	Thr	Asn	His	Val	Ser	Leu	Lys	Ile	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	
					485					490					495		
35	cga	gat	aca	atc	cag	aga	cta	cga	cag	tgc	aaa	tac	gtc	aaa	aag	cga	1653
	Arg	Asp	Thr	Ile	Gln	Arg	Leu	Arg	Gln	Cys	Lys	Tyr	Val	Lys	Lys	Arg	
				500					505					510			
40	gtg	att	ctc	aaa	gat	ctc	aag	cac	aat	gat	ggc	aat	ttc	act	gaa	aaa	1701
	Val	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	His	Asn	Asp	Gly	Asn	Phe	Thr	Glu	Lys	
			515					520					525				
45	cag	aag	ata	gaa	ttg	aac	aag	ttg	ctt	cag	att	gac	tat	tac	acc	cta	1749
	Gln	Lys	Ile	Glu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Gln	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Leu	
		530					535					540					
50	acc	aag	ttc	tac	ggg	aca	gtg	aaa	ctg	gat	acc	atg	atc	ttc	ggg	gtg	1797
	Thr	Lys	Phe	Tyr	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Asp	Thr	Met	Ile	Phe	Gly	Val	
	545					550					555					560	
55	ata	gaa	tac	tgt	gag	aga	gga	tcc	ctc	cgg	gaa	gtt	tta	aat	gac	aca	1845
	Ile	Glu	Tyr	Cys	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Asn	Asp	Thr	
					565					570					575		
60	att	tcc	tac	cct	gat	ggc	aca	ttc	atg	gat	tgg	gag	ttt	aag	atc	tct	1893
	Ile	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Phe	Met	Asp	Trp	Glu	Phe	Lys	Ile	Ser	
				580					585					590			
65	gtc	ttg	tat	gac	att	gct	aag	gga	atg	tca	tat	ctg	cac	tcc	agt	aag	1941
	Val	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	His	Ser	Ser	Lys	
			595					600					605				
70	aca	gaa	gtc	cat	ggc	cgt	ctg	aaa	tct	acc	aac	tgc	gta	gtg	gac	agt	1989
	Thr	Glu	Val	His	Gly	Arg	Leu	Lys	Ser	Thr	Asn	Cys	Val	Val	Asp	Ser	
		610					615					620					
75	aga	atg	gtg	gtg	aag	atc	act	gat	ttt	ggc	tgc	aat	tcc	att	ttg	cct	2037
	Arg	Met	Val	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Cys	Asn	Ser	Ile	Leu	Pro	
		625				630					635					640	
80	cca	aaa	aag	gac	ctg	tgg	aca	gct	cca	gag	cac	ctc	cgc	caa	gcc	aac	2085
	Pro	Lys	Lys	Asp	Leu	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Asn	

ES 2 346 637 T3

	645	650	655	
5	atc tct cag aaa gga gat gtg tac agc tat ggg atc atc gca cag gag Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu 660 665 670			2133
10	atc att ctg cgg aaa gaa acc ttc tac act ttg agc tgt cgg gac cgg Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg 675 680 685			2181
15	aat gag aag att ttc aga gtg gaa aat tcc aat gga atg aaa ccc ttc Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe 690 695 700			2229
20	cgc cca gat tta ttc ttg gaa aca gca gag gaa aaa gag cta gaa gtg Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val 705 710 715 720			2277
25	tac cta ctt gta aaa aac tgt tgg gag gaa gat cca gaa aag aga cca Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro 725 730 735			2325
30	gat ttc aaa aaa att gag act aca ctt gcc aag ata ttt gga ctt ttt Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe 740 745 750			2373
35	cat gac caa aaa aat gaa agc tat atg gat acc ttg atc cga cgt cta His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu 755 760 765			2421
40	cag cta tat tct cga aac ctg gaa cat ctg gta gag gaa agg aca cag Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln 770 775 780			2469
45	ctg tac aag gca gag agg gac agg gct gac aga ctt aac ttt atg ttg Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu 785 790 795 800			2517
50	ctt cca agg cta gtg gta aag tct ctg aag gag aaa ggc ttt gtg gag Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu 805 810 815			2565
55	ccg gaa cta tat gag gaa gtt aca atc tac ttc agt gac att gta ggt Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly 820 825 830			2613
60	ttc act act atc tgc aaa tac agc acc ccc atg gaa gtg gtg gac atg Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met 835 840 845			2661
65	ctt aat gac atc tat aag agt ttt gac cac att gtt gat cat cat gat Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp 850 855 860			2709
70	gtc tac aag gtg gaa acc atc ggt gat gcg tac atg gtg gct agt ggt Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly 865 870 875 880			2757
75	ttg cct aag aga aat ggc aat cgg cat gca ata gac att gcc aag atg Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met 885 890 895			2805
80	gcc ttg gaa atc ctc agc ttc atg ggg acc ttt gag ctg gag cat ctt Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu 900 905 910			2853

ES 2 346 637 T3

	cct ggc ctc cca ata tgg att cgc att gga gtt cac tct ggt ccc tgt	2901
	Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys	
	915 920 925	
5	gct gct gga gtt gtg gga atc aag atg cct cgt tat tgt cta ttt gga	2949
	Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly	
	930 935 940	
10	gat acg gtc aac aca gcc tct agg atg gaa tcc act ggc ctc cct ttg	2997
	Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu	
	945 950 955 960	
15	aga att cac gtg agt ggc tcc acc ata gcc atc ctg aag aga act gag	3045
	Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu	
	965 970 975	
	tgc cag ttc ctt tat gaa gtg aga gga gaa aca tac tta aag gga aga	3093
	Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg	
	980 985 990	
20	gga aat gag act acc tac tgg ctg act ggg atg aag gac cag aaa ttc	3141
	Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe	
	995 1000 1005	
25	aac ctg cca acc cct cct act gtg gag aat caa cag cgt ttg caa	3186
	Asn Leu Pro Thr Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln	
	1010 1015 1020	
	gca gaa ttt tca gac atg att gcc aac tct tta cag aaa aga cag	3231
	Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln	
	1025 1030 1035	
30	gca gca ggg ata aga agc caa aaa ccc aga cgg gta gcc agc tat	3276
	Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr	
	1040 1045 1050	
35	aaa aaa ggc act ctg gaa tac ttg cag ctg aat acc aca gac aag	3321
	Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys	
	1055 1060 1065	
40	gag agc acc tat ttt taaacctaataa tgagggtataa ggactcacac aaattaaaaat	3376
	Glu Ser Thr Tyr Phe	
	1070	
	acagctgcac tgaggccagg caccctcagg tgtcctgaaa gcttactttc ctgagacctc	3436
	atgaggcaga aatgtcttag gcttggctgc cctgtttgga ccatggactt tctttgcatg	3496
45	aatcagatgt gttctcagtg aaataactac cttccactct ggaaccttat tccagcagtt	3556
	gttccaggga gcttctacct ggaaaagaaa agaatttcat ttattttttg tttgtttatt	3616
	tttatcgttt ttgtttactg gctttccttc tgtattcata agatttttta aattgtcata	3676
50	attatatttt aaatacccat cttcattaaa gtatatttaa ctcataattt ttgcagaaaa	3736
	tatgctatat attaggcaag aataaaagct aaaggtttcc caaaaaaaaa a	3787
55	<210> 2	
	<211> 1073	
	<212> PRT	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		

ES 2 346 637 T3

<400> 2

5	Met	Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ala	Leu	Trp	Ser	Leu	Leu	Phe	Gln	1	5	10	15
10	Pro	Gly	Trp	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Val	Ser	Gln	Asn	Cys	His	Asn	20	25	30	
15	Gly	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ser	Val	Leu	Met	Met	Gly	Asn	Ser	Ala	Phe	Ala	35	40	45	
20	Glu	Pro	Leu	Lys	Asn	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Asn	Glu	Gly	Leu	Glu	Ile	50	55	60	
25	Val	Arg	Gly	Arg	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Asn	Ala	65	70	75	80
30	Thr	Phe	Met	Tyr	Ser	Asp	Gly	Leu	Ile	His	Asn	Ser	Gly	Asp	Cys	Arg	85	90	95	
35	Ser	Ser	Thr	Cys	Glu	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Asn	Ala	100	105	110	
40	Gln	Arg	Met	Gly	Cys	Val	Leu	Ile	Gly	Pro	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Thr	115	120	125	
45	Phe	Gln	Met	Tyr	Leu	Asp	Thr	Glu	Leu	Ser	Tyr	Pro	Met	Ile	Ser	Ala	130	135	140	
50	Gly	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Cys	Asp	Tyr	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	145	150	155	160
55	Met	Ser	Pro	Ala	Arg	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Leu	Val	Asn	Phe	Trp	Lys	165	170	175	
60	Thr	Asn	Asp	Leu	Pro	Phe	Lys	Thr	Tyr	Ser	Trp	Ser	Thr	Ser	Tyr	Val	180	185	190	
65	Tyr	Lys	Asn	Gly	Thr	Glu	Thr	Glu	Asp	Cys	Phe	Trp	Tyr	Leu	Asn	Ala	195	200	205	
	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Ser	Tyr	Phe	Ser	His	Glu	Leu	Gly	Phe	Lys	Val	210	215	220	
	Val	Leu	Arg	Gln	Asp	Lys	Glu	Phe	Gln	Asp	Ile	Leu	Met	Asp	His	Asn	225	230	235	240
	Arg	Lys	Ser	Asn	Val	Ile	Ile	Met	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Phe	Leu	Tyr	245	250	255	

ES 2 346 637 T3

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Val Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
 435 440 445
 Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
 450 455 460
 Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
 485 490 495
 Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Val Lys Lys Arg
 500 505 510

ES 2 346 637 T3

Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
 515 520 525
 5
 Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Thr Leu
 530 535 540
 10
 Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
 545 550 555 560
 15
 Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
 565 570 575
 20
 Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
 580 585 590
 25
 Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
 595 600 605
 30
 Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
 610 615 620
 35
 Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
 625 630 635 640
 40
 Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
 645 650 655
 45
 Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
 660 665 670
 50
 Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
 675 680 685
 55
 Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
 690 695 700
 60
 Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
 705 710 715 720
 65
 Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
 725 730 735
 70
 Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
 740 745 750
 75
 His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
 755 760 765
 80
 Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln

ES 2 346 637 T3

	770	775	780
5	Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu 785 790 795 800		
10	Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu 805 810 815		
15	Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly 820 825 830		
20	Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met 835 840 845		
25	Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp 850 855 860		
30	Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly 865 870 875 880		
35	Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met 885 890 895		
40	Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu 900 905 910		
45	Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys 915 920 925		
50	Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly 930 935 940		
55	Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu 945 950 955 960		
60	Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu 965 970 975		
65	Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg 980 985 990		
	Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe 995 1000 1005		
	Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln 1010 1015 1020		
	Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln 1025 1030 1035		

ES 2 346 637 T3

Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050

5 Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065

10 Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65