

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 338**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2004 E 04741141 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1646649**

54 Título: **El polipéptido de MACC1 y su utilización para el diagnóstico de tumores y la terapia tumoral**

30 Prioridad:

**18.07.2003 DE 10332854**

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

**26.06.2013**

73 Titular/es:

**CHARITE - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
(100.0%)  
SCHUMANNSTRASSE 20/21  
10117 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**STEIN, ULRIKE;  
SCHWABE, HOLGER;  
WALTHER, WOLFGANG y  
SCHLAG, PETER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 409 338 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

El polipéptido de MACC1 y su utilización para el diagnóstico de tumores y la terapia tumoral

El presente invento se refiere a la secuencia de ácido nucleico, que codifica el polipéptido de MACC1 y a sus utilidades, en particular para el diagnóstico de tumores y la terapia tumoral en el caso de tumores metastatizantes.

La generación de metástasis es un complejo proceso de varias etapas, que comprende un gran número de modificaciones moleculares y celulares, y que se puede subdividir en principio en cuatro fases definidas: a) el crecimiento y la vascularización del tumor primario, b) el desprendimiento y la penetración de células invasoras individuales en el sistema vascular, c) la diseminación en el sistema vascular y la extravasación al órgano diana, y finalmente d) la formación de macrometástasis a partir de las células tumorales que han inmigrado.

Así, determinadas células de un tumor primario pierden el contacto de una célula con otra célula, invaden a través de la matriz extracelular y se propagan a través de la sangre y del sistema linfático. Estas células tumorales pueden finalmente extravasarse, adherirse a determinados órganos diana y proliferar allí, lo que conduce a la formación de metástasis.

Una serie de moléculas asociadas de un modo general con una metastatización ya fueron identificadas al efectuar una comparación de tumores primarios y metástasis. Así, la regulación errónea de las moléculas de adhesión celular (p.ej. las cadherinas) en tumores primarios conduce a la pérdida del contacto de una célula con otra célula y hace posible a las células tumorales movilizadas realizar la invasión y la penetración en los sistemas vasculares sanguíneo y linfático. Las células tumorales, que fueron distribuidas en el cuerpo a través de los sistemas vasculares sanguíneo y linfático, se adhieren a las células endoteliales de los vasos, de una manera mediada por unas moléculas de adhesión situadas en las células endoteliales (p.ej. E-selectina, LPAM, VCAM-1, LuECAM-1 e ICAM-1), a las que se pueden fijar selectivamente determinadas moléculas superficiales de las células tumorales (p.ej. VLA-4, LFA-1). En el transcurso ulterior de la metastatización debe de efectuarse una fijación de las células tumorales metastatizantes a los componentes de la matriz extracelular, p.ej. fibronectina y vitronectina. Esto es mediado por diferentes integrinas, las células tumorales con diverso potencial de metastatización se diferencian en la adhesión con respecto de los diferentes elementos de la matriz extracelular. Además, las enzimas degradantes de la matriz, p.ej. las metaloproteinasas de matriz (MMPs [acrónimo de Matrix Metallo-Proteinases], en particular las MMP-9 y MMP-2), presentan una gran importancia para la extravasación y la migración de las células tumorales en el sistema con sus agentes inhibidores tisulares (en inglés Tissue Inhibitors of MMP's, TIMP's). La actividad de estas moléculas se puede regular de un modo específico para un tejido a través del sistema de activador del plasminógeno del tipo de la urocinasa/receptor del activador del plasminógeno del tipo de la urocinasa (uPa/receptor de uPa), que ha sido mostrado p.ej. para la expresión de MMP-9 en el caso de unas metástasis en el hígado de carcinomas colorrectales.

Para la adhesión de células tumorales metastatizantes a los órganos diana son decisivas, por su parte, unas moléculas específicas para la adhesión (VCAM-1, LPAM, E-selectina, VLA's, ICAM-1 y diversas integrinas) [véanse, entre otras, las citas de Streit M y colaboradores, Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors (Receptores de adhesión en una transformación maligna y una diseminación de tumores gastrointestinales). Recent Results Cancer Res 1996; 142:19-50, de Imai K, y colaboradores, Regulation of integrin function in the metastasis of colorectal cancer (Regulación de la función de integrinas en la metástasis de un cáncer colorrectal) Nippon Geka Gakkai Zasshi. Julio de 1998; 99(7):415-8. Krause T, Turner GA, Are selectins involved in metastasis? (¿Están implicadas las selectinas en una metástasis?) Clin Exp Metastasis. Mayo de 1999; 17(3):183-92, y de Porter CA jr. y colaboradores, Molecular determinants of colon cancer metastasis (Determinantes moleculares de una metástasis de cáncer de colon). Surg Oncol. Nov-Dic. de 1998; 7(3-4):183-95]. Junto a los órganos diana de una metastatización, las células tumorales deben de encontrar un determinado micro-entorno, a fin de poder adherirse y proliferar ("hipótesis de semilla y suelo" en inglés "seed and soil"-hypothesis). Las células tumorales se pueden distribuir en primer lugar por todo el cuerpo, pero entonces solamente pueden generar metástasis en determinados órganos. El factor decisivo de la metastatización no es por consiguiente la migración de las células tumorales a los órganos diana, sino el potencial de las células tumorales, para proliferar en un determinado entorno en el órgano diana. Unas células tumorales "durmientes" pueden estar presentes frecuentemente durante muchos años en el cuerpo, sin que sean detectables unas metástasis.

La "hipótesis de suelo y semilla" más arriba descrita es una de las teorías más aceptadas para la metastatización específica para un órgano. Junto a ella existe una segunda teoría, según la cual unas células endoteliales en los vasos sanguíneos de los órganos diana de una metastatización expresan determinadas moléculas de adhesión, con lo que unas células tumorales circulantes son retenidas fijamente allí, y por lo tanto la metastatización tiene lugar en estos órganos específicos. La tercera teoría, la denominada teoría de quimioatracción, expresa que unas moléculas específicas para un órgano acceden a la circulación sanguínea, estimulan a las células tumorales circulantes a migrar a los correspondientes órganos de metastatización y formar allí unas metástasis.

Las investigaciones actuales acerca de la metastatización específica para un órgano ponen de manifiesto que, al parecer en un proceso prolongado, deben de ser conectados (o desconectados) selectivamente unos genes, que en

el momento de la propagación de las células tumorales en el cuerpo no eran todavía activos (o respectivamente eran todavía activos). Por lo tanto, son indispensables unos análisis de la expresión génica, que investiguen qué genes son expresados diferentemente en unas metástasis en determinados órganos diana en comparación con los correspondientes tumores primarios.

5 Cada año se registran en la República Federal Alemana aproximadamente 20.000 nuevos casos de enfermedad para el carcinoma de colon. Para el carcinoma de colon se conocen diferentes lugares de metastatización, p.ej. el hígado, los ganglios linfáticos, los pulmones, los huesos y el cerebro.

10 La clínica Robert Rössle es una clínica orientada oncológicamente, con la especialización en la cirugía. Cada año son tratados aproximadamente 300 pacientes con carcinomas de colon, entre éstos, aproximadamente 150-170 pacientes tienen metástasis del tumor primario. La frecuencia observada de metastatización de los órganos diana corresponde a la descrita en la bibliografía, con un 80 % de metástasis en el hígado y 15 % de metástasis en los pulmones. La tasa de supervivencia durante 5 años es de aproximadamente 20-25 %, pero, en el caso de unas metástasis solitarias (en el hígado, los pulmones) es tan sólo de aproximadamente 5 %.

15 El hígado constituye el órgano diana más importante para la metastatización del carcinoma de colon, puesto que las células tumorales - de un modo mediado a través de la vena porta - son retenidas en el hígado y después de esto se propagan a otros órganos.

20 Sin embargo, también se conoce el hecho de que frecuentemente están presentes unas metástasis p.ej. en los pulmones o en los huesos, sin que se hubieran comprobado unas metástasis en el hígado. Por consiguiente, el carcinoma de colon metastatizante constituye un modelo interesante para la identificación y el análisis de genes, con el fin de investigar aún más una expresión diferencial de un gen en el caso de la metastatización específica para un órgano.

25 Las proteínas codificadas por tales genes podrían tener una función directa para la adhesión de células tumorales a determinados tejidos y órganos (moléculas de adhesión específicas para un órgano). Asimismo, ellas podrían hacer posible, por medio de unas interacciones con las células normales de los órganos que forman metástasis, la proliferación de las células y el crecimiento de las metástasis en un determinado entorno (p.ej. unos receptores y efectores específicos). Además, es concebible que tales proteínas sean requeridas para la preparación previa intracelular de las células tumorales para la metastatización en un determinado órgano diana, así, por ejemplo, en diferentes cascadas de transducción de señales y mecanismos de regulación. En este contexto son importantes unas proteínas con unos correspondientes dominios de interacción entre una proteína y otra proteína, p.ej. con unos dominios de homología Src (los dominios SH3, SH2) o unos dominios de homología Eps15 (los dominios EH). Estos dominios son unos definidos motivos de secuencias, que hacen posible una fijación específica a unos ligandos. Los dominios SH3 están presentes, entre otras, en aquellas proteínas que guían a unos ligandos determinados hacia unas cinasas o hacia sus substratos, y por lo tanto desempeñan un cometido importante en el caso de la regulación de las vías de transducción de señales de la tirosina cinasa.

30 En particular, es valiosa la identificación de aquéllos genes marcadores, con ayuda de cuya expresión en el carcinoma primario se puede pronosticar una probable metastatización en determinados órganos diana antes del suceso de metastatización propiamente dicho y, basándose en ello, eventualmente éste puede ser impedido.

35 Por consiguiente, es una misión del presente invento, poner a disposición aquellos otros genes marcadores, con los que se puedan conseguir un diagnóstico y una terapia mejorado/a en lo que respecta a la metastatización en determinados órganos diana.

40 El problema planteado por esta misión se resuelve mediante el invento, tal como se reivindica en las reivindicaciones de esta patente.

45 De acuerdo con un primer aspecto del presente invento, el problema planteado por esta misión se resuelve mediante la puesta a disposición de una secuencia de ácido nucleico, que codifica el polipéptido de MACC1, escogida entre el conjunto formado por: a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 1, b) unas secuencias de ácidos nucleicos, que se derivan de la secuencia de ácido nucleico indicada en la SEQ ID NO: 1 como resultado del código genético degenerado. Otro aspecto se refiere asimismo al polipéptido de MACC1, que es puesto asimismo a disposición con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2, codificada por una secuencia de ácido nucleico conforme al invento.

50 Para la purificación de los polipéptidos conformes al invento puede estar adosado otro polipéptido ("tag" = marcación). Las marcaciones de proteínas permiten por ejemplo la absorción altamente afín a la matriz, un lavado en condiciones rigurosas con unos tampones adecuados, sin eluir al complejo en una medida digna de mención, y a continuación una elución deliberada del complejo absorbido. Ejemplos de las marcaciones de proteínas conocidas para un experto en la especialidad, son una marcación (His)<sub>6</sub>, una marcación V5, una marcación Myc, una marcación FLAG, una marcación Strep, una marcación Strep II, una marcación de hemaglutinina, una marcación de glutatión transferasa (GST), una inteína con una marcación de fijación por afinidad de quitina o una marcación de

proteína fijadora de maltosa (MBP). Estas marcaciones de proteínas pueden encontrarse en el extremo terminal de N, de C y/o internamente.

5 Junto a los polipéptidos naturales aislados a partir de células, todos los polipéptidos conformes al invento o sus fragmentos pueden haber sido producidos en condiciones exentas de células, p.ej. mediante una síntesis o mediante una traducción *in vitro*. Así, el polipéptido total o unos fragmentos de éste puede(n) ser sintetizado(s) por ejemplo con ayuda de la síntesis clásica (la técnica de Merrifield). Ciertos fragmentos de los polipéptidos conformes al invento se adecuan en particular para la obtención de antisuecos, con cuya ayuda se pueden escrutar unos adecuados bancos de expresión de genes, con el fin de acceder así a otras variantes funcionales del polipéptido conforme al invento.

15 Junto a los ácidos nucleicos naturales aislados a partir de células, todos los ácidos nucleicos conformes al invento o sus fragmentos pueden haber sido producidos también de manera sintética. Además, para la realización del invento se puede utilizar un ácido nucleico, que ha sido producido de manera sintética. Así, el ácido nucleico conforme al invento se puede sintetizar, por ejemplo, por medios químicos con ayuda de las secuencias de proteínas descritas en la SEQ ID NO: 2 mediando aprovechamiento del código genético p.ej. según el método del fosfotriéster (véase p.ej. la cita de Uhlmann & Peyman 1990, Chemical Reviews 90:543-584).

20 El número de acceso XP-294213.1 (registrado el 28 de Abril de 2003 en el banco de datos) describe a un polipéptido humano con una longitud de 816 aminoácidos. Esta secuencia descrita como similar a la EST A1594717 [de *Homo sapiens*] corresponde en los últimos 813 aminoácidos a la SEQ ID NO: 2 y fue producida a partir de NCBI contig NT-007819 mediante un análisis automático con ordenador por medio del programa "GenomeScan". El gen está localizado en el cromosoma 7. Para este gen no se conocen ni la función ni el valor de pronóstico. El presente invento pone a disposición por consiguiente la identificación de la secuencia de ADN genómico, el ADNc de plena longitud y la secuencia proteínica putativa para el **MACC1 (véase también la entrada en el banco de datos HGNC:30215 en la página de internet del HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC))**.

30 Otro aspecto del invento se refiere a un oligonucleótido, que se hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el presente invento, a saber **con la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7**. Los oligonucleótidos constituyen unas herramientas importantes, que por una parte se pueden utilizar en unas reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), pero también como sondas en unas reacciones de hibridación. Existen otras posibilidades de utilización como agentes terapéuticos p.ej. en la terapia génica o en técnicas de mutagénesis. Los oligonucleótidos conformes al invento se pueden presentar en forma de unos ácidos nucleicos que abarcan los ADN, ADNc, ARN, ARNm, ARNsi, PNA y/o ANC. Los oligonucleótidos se pueden presentar además en forma de unos nucleótidos "en el mismo sentido" o "antisentido". Además de esto, para unas técnicas de detección que están basadas en una hibridación, los oligonucleótidos pueden estar marcados de un modo adecuado, por ejemplo por medio de colorantes, radionúclidos, enzimas o marcadores de masa o de carga eléctrica. La marcación se orienta al respectivo procedimiento de detección, que debe de ser usado. Los oligonucleótidos conformes al invento son de manera preferida un ADN, en particular un ADN bicatenario (ADNc) con una longitud de por lo menos 8 nucleótidos, de manera preferida con por lo menos 12 nucleótidos, en particular con por lo menos 24 nucleótidos. El límite superior para los oligonucleótidos es determinado por la respectiva utilización práctica, siendo preferida usualmente una longitud máxima de 50-200 nucleótidos.

45 Los oligonucleótidos son degradados por regla general rápidamente por unas endo- o exonucleasas, en particular por unas ADNasas y ARNasas que se presentan en una célula. Por lo tanto, es ventajoso modificar el ácido nucleico, con el fin de estabilizarlo contra la degradación, de tal manera que durante un prolongado período de tiempo se conserva una alta concentración del ácido nucleico en una célula (véanse la cita de Beigelman y colaboradores, 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; el documento de solicitud de patente internacional WO 95/11910 de Dudycz 1995; el documento WO 98/37240 de Macadam y colaboradores 1998; y el documento WO 97/29116 de Reese y colaboradores 1997). Típicamente, se puede obtener una tal estabilización mediante la introducción de uno o varios grupos de fosfato internucleotídicos o mediante la introducción de uno o varios internucleótidos no fosforados.

55 Unos adecuados internucleótidos modificados se han recopilado en la cita de Uhlmann y Peymann (1990, Chem. Rev. 90:544) (véanse también la cita de Beigelman y colaboradores 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; el documento WO 95/11910 de Dudycz 1995; el documento WO 98/37240 de Macadam y colaboradores 1998; y el documento WO 97/29116 de Reese y colaboradores 1997). Los grupos de fosfato de internucleótidos modificados y/o unos enlaces que no son de fosfoéster en un ácido nucleico, que se pueden emplear en el caso de una de las utilizaciones conformes al invento, contienen por ejemplo un metil-fosfonato, un fosforotioato, un fosforoamidato, un fosforoditioato, unos ésteres fosfatos, mientras que unos compuestos análogos a internucleótidos que no contienen fósforo, contienen por ejemplo puentes de siloxano, puentes de carbonato, ésteres carboximetílicos, puentes de acetamidato y/o puentes tiólicos. También se pretende que esta modificación mejore la estabilidad y la durabilidad de una composición farmacéutica, que se puede emplear en el caso de una de las utilizaciones conformes al invento.

Para la expresión del correspondiente gen se prefiere por lo general un ADN bicatenario, siendo especialmente preferida la región de ADN que codifica el polipéptido. Esta región comienza con el primer codón iniciador (ATG) situado en una secuencia de consenso de Kozak (Kozak 1987, Nucleic Acids Res. 15:8125-48) hasta llegar al siguiente codón de parada (TAG, TGA o respectivamente TAA), situado en el mismo marco de lectura que el ATG.

5 Otra utilización de las secuencias de ácidos nucleicos conformes al invento es la construcción de oligonucleótidos antisentido (véanse las citas de Zheng y Kemeny 1995, Clin. Exp. Immunol. 100,380-382; de Nellen y Lichtenstein 1993, Trends Biochem. Sci. 18;419-23) y/o de ribozimas (véanse las citas de Amarzguioui y colaboradores 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; de Vaish y colaboradores 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; de Persidis 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2; de Couture y Stinchcomb 1996, Trends Genet.12:510-5). Con unos oligonucleótidos  
10 "antisentido" se puede disminuir la estabilidad del ácido nucleico conforme al invento y/o inhibir la traducción del ácido nucleico conforme al invento. Así, por ejemplo, la expresión de los correspondientes genes en células se puede disminuir tanto *in vivo* como también *in vitro*. Los oligonucleótidos se pueden adecuar por lo tanto como un agente terapéutico. Para la utilización como una sonda o como un oligonucleótido "antisentido" se prefiere un ADN monocatenario o un ARN. Los oligonucleótidos conformes al invento se pueden presentar en forma de ácidos nucleicos que abarcan los ADN, ADNdc, ARN, ARNm, ARNsi, PNA y/o ANC. Otro aspecto especialmente preferido del presente invento se refiere a unos oligonucleótidos como un agente terapéutico en forma de un ARNsi. Este tipo de la terapia génica es conocido para un experto en la especialidad también para la terapia de tumores y se puede deducir, por ejemplo, a partir de la siguiente bibliografía y de las otras referencias. Así, las citas de Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Harel-Bellan A, RNA interference and its possible use in cancer therapy, Bull Cancer (Interferencia de un ARN y su posible uso en la terapia de un cáncer). Enero de 2004; 91(1):15-8; de Caplen NJ, Mousses S, Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells (Interferencia de un ARN (ARNi) mediada por un ARN interferente pequeño (ARNsi), Ann N Y Acad Sci. Dic. de 2003;1002:56-62; de Caplen NJ. RNAi as a gene therapy approach (Un ARNi como un enfoque para una terapia génica), Expert Opin Biol Ther. Julio de 2003; 3(4):575-86; de Lu PY, Xie FY, Woodle MC, siRNA-mediated antitumorogenesis for drug target validation and therapeutics (Anti - génesis tumoral mediada por un ARNsi para la validación de dianas de medicamentos y usos terapéuticos), Curr Opin Mol Ther. Junio de 2003; 5(3):225-34; y de Oshiumi H, Begum NA, Matsumoto M, Seya T, RNA interference for mammalian cells (Interferencia de un ARN para células de mamíferos), Nippon Yakurigaku Zasshi. Agosto de 2002; 120(2):91-5 se refieren a los antecedentes tecnológicos generales. las citas de Devroe E, Silver PA, Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors (Potencial terapéutico de vectores retrovíricos de ARNi), Expert Opin Biol Ther. Marzo de 2004; 4(3):319-27; de Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA (ARNsi suministrado por retrovirus), BMC Biotechnol. 28 de Agosto de 2002; 2(1):15; de Tran N, Cairns MJ, Dawes IW, Arndt GM. Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription (Expresión de ARNsi's funcionales en células de mamíferos mediando usando una transcripción convergente. BMC Biotechnol. 6 de Noviembre de 2003; 3(1):21; de Futami T, Miyagishi M, Seki M, Taira K, Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2 (Inducción de una apoptosis en células HeLa con un vector de expresión de ARNsi dirigido hacia el bcl2), Nucleic Acids Res Suppl. 2002; (2):251-2; de Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA (Modulación de la expresión de un gen por el suministro mediado por lentivirus de un ARN interferente pequeño), Cell Cycle. Mayo-Junio de 2003; 2(3):251-7; de Shen C, Reske SN. Adenovirus-delivered siRNA (ARNsi suministrado por adenovirus). Methods Mol Biol. 2004; 252:523-32; de Salmons B, Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy (Dirección hacia un objetivo de vectores retrovíricos para una terapia génica), Hum Gene Ther. Abril de 1993; 4(2):129-41; y de Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y, Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression (Interferencia de un ARN in vivo basada en un vector: supresión dependiente de la dosis y del tiempo de una expresión transgénica), J Pharmacol Exp Ther. Feb. de 2004; 308(2):688-93, Publicación electrónica de 10 Noviembre de 2003, se refieren a determinados vectores para la terapia con un ARNsi. Finalmente, Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K, siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference (siDirect: software de diseño de un ARNsi altamente eficaz, específico para una diana, para la interferencia de un ARN de mamífero), Nucleic Acids Res. 1 de Julio de 2004; 32 (Web Server issue = editado por un servidor de web): W124-9 describen a modo de ejemplo un programa para el diseño y la constitución de moléculas de ARNsi.  
50

Otro aspecto del presente invento se refiere a la molécula de ácido nucleico conforme al invento, al polipéptido conforme al invento o al oligonucleótido conforme al invento para el tratamiento de enfermedades. La posibilidad de la utilización de estas sustancias en conexión con enfermedades humanas no era conocida hasta ahora.  
55

Otro aspecto del presente invento se refiere a un vector, de manera preferida en forma de un plásmido, de un vector "shuttle" (de lanzadera), de un fagémido, de un cósmido, de un vector de expresión, de un vector adenovírico, de un vector retrovírico (Miller, y colaboradores "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression" (Vectores retrovíricos mejorados para la transferencia y la expresión de genes), BioTechniques Volumen 7, Nº 9, página 980, 1989) y/o de un vector eficaz para la terapia génica, que contiene un ácido nucleico conforme al invento. Así, el ácido nucleico conforme al invento puede estar contenido en un vector, de manera preferida en un vector de expresión o en un vector eficaz para la terapia génica. De manera preferida, el vector eficaz para la terapia génica contiene unas secuencias reguladoras específicas para células, que están unidas funcionalmente con el ácido nucleico conforme al invento. Los vectores de expresión pueden ser unos vectores de expresión procarióticos o eucarióticos. Ejemplos de unos vectores de expresión procarióticos para la expresión en *E. coli* son p.ej. los vectores  
60  
65

pGEM o derivados de pUC, y de unos vectores de expresión eucarióticos para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* son p.ej. los vectores p426Met25 o p426GAL1 (Mumberg y colaboradores 1994, Nucleic. Acids Res. 22:5767-5768), para la expresión en células de insectos, son p.ej. los vectores de *Baculovirus* tales como los que se divulgan en los documentos de patentes europeas EP-B1-0 127 839 o EP-B1-0 549 721, y para la expresión en células de mamíferos son p.ej. los vectores Rc/CMV y Rc/RSV o SV40, todos los cuales son obtenibles de un modo general.

Por lo general, los vectores de expresión contienen también unos promotores adecuados para la respectiva célula anfitriona, tales como p.ej. el promotor de *trp* para la expresión en *E. coli* (véase p.ej. el documento EP-B1-0 154 133), los promotores de Met 25, GAL 1 o ADH2 para la expresión en levaduras (Russel y colaboradores, 1983, J. Biol. Chem. 258: 2674-2682), el promotor de polihedrina de baculovirus para la expresión en células de insectos (vease p.ej. el documento 13. EP-B1-0 127 839). Para la expresión en células de mamíferos se adecuan por ejemplo unos promotores, que permiten una expresión constitutiva, regulable, específica para un tejido, específica para un ciclo celular o específica para el metabolismo en células eucarióticas. Unos elementos regulables de acuerdo con el presente invento son unos promotores, unas secuencias de activadores, unos intensificadores, unos silenciadores y/o unas secuencias de represores. Ejemplos de unos elementos regulables adecuados, que hacen posible la expresión constitutiva en eucariotas, son unos promotores, que son reconocidos por la polimerasa II de ARN, o unos promotores víricos, el intensificador de CMV, el promotor de CMV, el promotor de SV40 o unos promotores de LTR, p.ej. de MMTV (acrónimo de "mouse mammary tumour virus" (virus de tumor mamario de ratón); Lee y colaboradores 1981, Nature 214:228-232) y otras secuencias de promotores y activadores de virus, que se derivan por ejemplo de HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV o HIV. Ejemplos de unos elementos regulables, que hacen posible la expresión regulable en eucariotas, son el operador de tetraciclina en combinación con un correspondiente represor (Gossen y colaboradores 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:516-20).

Con el fin de hacer posible la introducción de ácidos nucleicos conformes al invento y por consiguiente la expresión del polipéptido en una célula eu- o procariótica mediante transfección, transformación o infección, el ácido nucleico se puede presentar en forma de un plásmido, como parte constituyente de un vector vírico o no vírico. Como vectores víricos se adecuan en este caso especialmente: retrovirus, baculovirus, vacciniavirus, adenovirus, virus adenoasociados y herpesvirus. Como vectores no víricos se adecuan en este contexto especialmente: virosomas, liposomas, lípidos catiónicos o un ADN conjugado con una poli-lisina.

Ejemplos de vectores eficaces para la terapia génica son ciertos vectores de virus, por ejemplo, unos vectores de adenovirus, o unos vectores de retrovirus (Lindemann y colaboradores, 1997, Mol. Med. 3:466-76; Springer y colaboradores 1998, Mol. Cell. 2:549-58).

Un mecanismo preferido, para llevar a expresión *in vivo* a unos polipéptidos conformes al invento, es la transferencia vírica de genes, en particular con ayuda de partículas retrovíricas. Éstas se aprovechan de manera preferida para proveer a unas correspondientes células diana, de manera preferida a unos linfocitos T, del paciente mediante transducción *ex vivo* con los genes o las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos conformes al invento. Las células diana pueden después esto ser infundidas renovadamente otra vez en el paciente en el sentido de una transferencia adoptiva de células, para tomar a su cargo unas funciones efectoras tumoricidas y/o inmunomoduladoras con la especificidad introducida *de novo*. Por esta ruta se consiguieron unos éxitos muy buenos en la terapia génica en el tratamiento de la enfermedad por SCID-X1 caracterizada por una incompetencia inmunitaria en el caso de recién nacidos, proveyendo a unas células precursoras hematológicas fueron provistas por medio de retrovirus con un transgén intacto análogo de una variante mutada no funcional, que se presenta en niños, del gen de la cadena  $\chi$ , que es esencial para la diferenciación en las diferentes células efectoras del sistema inmunitario adaptativo (Cavazzana-Calvo y colaboradores, 2000).

Además, existe la posibilidad de llevar a cabo la transferencia de genes *in vivo*, por una parte mediante una inyección estereotáctica preferente de las partículas infecciosas, y por otra parte mediante una aplicación directa de células productoras de virus (Oldfield y colaboradores, Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Los vectores víricos empleados frecuentemente para la transferencia de genes, de acuerdo con el estado actual de la técnica, son predominantemente unos vectores víricos de retrovirus, lentivirus, adenovirus y adenoasociados. Éstos son unas secuencias circulares de nucleótidos, derivadas de virus naturales, en las que por lo menos los genes que codifican la proteína estructural vírica fueron reemplazados por la construcción artificial que debe ser transferida. Unos nuevos vectores que no proceden de virus, se componen de unas secuencias autónomas de, que se integran por sí solas, los transposones, que son introducidas en la célula anfitriona mediante p.ej. una transfección liposómica, y que fueron empleados por primera vez con éxito para la expresión de transgenes humanos en células de mamíferos (Yant y colaboradores, 2000).

Unos vectores eficaces para una terapia génica se pueden obtener también formando un compuesto complejo del ácido nucleico conforme al invento con unos liposomas, puesto que con ello se puede conseguir una muy alta eficacia de la transfección, en particular de células cutáneas (Alexander y Akhurst 1995, Hum. Mol. Genet. 4:2279-85). En el caso de la lipofección, se producen unas pequeñas vesículas monolaminares a partir de lípidos catiónicos mediante un tratamiento con ultrasonidos de la suspensión de liposomas. El ADN es fijado iónicamente sobre la

superficie de los liposomas, y ciertamente en una relación tal que quede una carga neta positiva y el ADN plasmídico sea convertido en un compuesto complejo en un 100 % por los liposomas. Junto a las mezclas de lípidos de DOTMA (bromuro de 1,2-dioleiloxipropil-3-trimetil-amonio) y de DPOE (dioleil-fosfatidil-etanolamina) empleadas por Felgner y colaboradores (1987, véase más arriba), se sintetizaron mientras tanto numerosas formulaciones nuevas de lípidos y se ensayaron en cuanto a su eficiencia para la transfección de diferentes linajes de células (véanse las citas de Behr y colaboradores 1989, Proc. Natl., Acad. Sci. USA 86:6982-6986; de Felgner y colaboradores, 1994, J. Biol. Chem. 269:2550-25561; y de Gao y Huang 1991, Biochim. Biophys. Acta 1189:195-203). Ejemplos de nuevas formulaciones de lípidos son DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio) o DOGS (TRANSFECTAM: dioctadecil-amidoglicil-espermina). Unas sustancias auxiliares, que aumentan la transferencia de ácidos nucleicos a la célula, pueden ser por ejemplo unas proteínas o unos péptidos, que están unidas/os a un ADN, o unas moléculas sintéticas de ADN peptídico, que hacen posible el transporte del ácido nucleico al núcleo de la célula (véanse las citas de Schwartz y colaboradores, 1999, Gene Therapy 6: 282; y de Brandén y colaboradores 1999, Nature Biotech. 17:784). Las sustancias auxiliares comprenden también unas moléculas, que hacen posible la liberación de ácidos nucleicos en el citoplasma de la célula (véase la cita de Kiehler y colaboradores 1997, Bioconj. Chem. 8:213) o, por ejemplo, unos liposomas (véase la cita de Uhlmann y Peymann 1990, más arriba). Otra forma especialmente adecuada de vectores para la terapia génica se puede obtener aplicando el ácido nucleico conforme al invento sobre partículas de oro y disparando a éstas con ayuda de las denominadas "gene gun" (pistolas de genes) al tejido, de manera preferida en la piel, o unas células (Wang y colaboradores, 1999, J. Invest. Dermatol. 112:775-81). Otro aspecto se refiere a la introducción de un "ADN desnudo (desprovisto de inmunidad)" con la pistola de genes, tal como se describe por ejemplo en la cita de T Niidome y L Huang: Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors (Terapia génica, avances y perspectivas: vectores no víricos); Gene Therapy (2002) 9, 1647-1652 y las referencias que se encuentran allí.

Para el uso en la terapia génica del ácido nucleico conforme al invento es también ventajoso el hecho de que la parte del ácido nucleico, que codifica el polipéptido, contenga una o varias secuencias no codificadoras, inclusive secuencias de intrones, de manera preferida entre el promotor y el codón iniciador del polipéptido, y/o una secuencia de poliA, en particular la secuencia de poliA que se presenta en la naturaleza o una secuencia de poliA del virus SV40, sobre todo junto al extremo 3' del gen, puesto que de esta manera se puede conseguir una estabilización del ARNm (mensajero) (véanse las citas de Jackson 1993, Cell 74:9-14 y Palmiter y colaboradores 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:478-482).

Otro aspecto del presente invento se refiere entonces a un organismo anfitrión procariótico o eucariótico recombinante, que contiene por lo menos una secuencia de ácido nucleico conforme al invento o por lo menos un vector conforme al invento. El organismo anfitrión se puede componer a base de una célula diploide, de una célula de planta, de una célula de mamífero, de una célula de nematodo, de una célula de pez, de una célula de insecto y, en particular, de una célula madre no humana. Un ejemplo preferido sería una célula madre de ratón. Además, el invento pone a disposición un organismo recombinante no humano, en particular de un mamífero (tal como una cabra o una oveja), un roedor (tal como un conejo, un ratón, una rata o un hámster), un nematodo (tal como *Caenorhabditis elegans*), un pez (tal como un pez cebra), una planta (tal como *Arabidopsis thaliana*, maíz, arroz, trigo o patata), un insecto o una medusa, genéticamente deficiente o "knock-out" (es decir con el sistema inmunitario suprimido), en cuyo caso el correspondiente gen para la *7a5/prognostina* había sido mutado o suprimido. Estos organismos de ensayo constituyen unos valiosos medios auxiliares y se pueden utilizar p.ej. para el escrutinio en cuanto a participantes en la fijación (véase p.ej. más abajo). Unos procedimientos para la producción de tales organismos son conocidos para un experto en la especialidad a partir de la bibliografía pertinente.

Otro objeto del presente invento es un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de éste, que fija a un antígeno, para el diagnóstico, el pronóstico y la optimización de la terapia de unas enfermedades asociadas con la expresión del MACC1, o para la identificación de unas sustancias farmacológicamente activas, que está dirigido contra un polipéptido de MACC1 conforme al invento y reacciona específicamente con los polipéptidos de MACC1 conformes al invento, siendo las partes arriba mencionadas del polipéptido o bien inmunógenas por sí mismas, o pudiendo ellas ser hechas inmunógenas o respectivamente aumentadas en su inmunogenicidad mediante acoplamiento con vehículos adecuados, tales como p.ej. una albúmina de suero bovino. Este anticuerpo es o bien policlonal o monoclonal, se prefiere un anticuerpo monoclonal. Por el concepto de "anticuerpo" de acuerdo con el presente invento se entienden también unos anticuerpos producidos por tecnología genética y eventualmente modificados o respectivamente unas partes de éstos que se fijan a antígenos, tales como p.ej. unos anticuerpos quiméricos, unos anticuerpos humanizados, unos anticuerpos multifuncionales, unos anticuerpos bi- u oligoespecíficos, unos anticuerpos monocatenarios, unos fragmentos F(ab) o F(ab)<sub>2</sub> (véanse p.ej. el documento EP-B1-0 368 684, los documentos de patentes de los EE.UU. US 4.816.567, US 4.816.397, y los documentos WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Los anticuerpos conformes al invento se pueden utilizar para el diagnóstico, la vigilancia de una terapia y/o el tratamiento de unas enfermedades asociadas con la expresión del MACC1, o para la identificación de unas sustancias farmacológicamente activas. Otro aspecto se refiere a la producción de unos anticuerpos (pAK, mAK) para la evaluación de cortes histológicos.

Otro aspecto del invento se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo, de manera preferida de un anticuerpo policlonal o monoclonal, para el diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión del MACC1, o para la identificación de unas sustancias farmacológicamente activas, que está

caracterizado por que un organismo que produce anticuerpos es inmunizado con un polipéptido conforme al invento o con un equivalente funcional de éste o con unas partes de éste que tienen por lo menos 6 aminoácidos, de manera preferida por lo menos 8 aminoácidos, en particular por lo menos 12 aminoácidos, o con un ácido nucleico conforme al invento.

5 El procedimiento se efectúa según unos métodos conocidos de un modo general para un experto en la especialidad mediante inmunización de un mamífero, por ejemplo de un conejo, con el polipéptido conforme al invento o con las partes mencionadas de éste, o con el/los ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) a éste, eventualmente en presencia de p.ej. un adyuvante de Freund incompleto y/o de geles de hidróxido de aluminio (véase p.ej. la cita de Diamond y colaboradores 1981, *The New England Journal of Medicine*, páginas 1344-1349). Los anticuerpos policlonales resultantes en un animal debido a una reacción inmunológica se pueden aislar fácilmente a continuación a partir de la sangre según unos métodos conocidos de un modo general, y p.ej. se pueden purificar mediante una cromatografía en columna. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos por ejemplo según el conocido método de Winter & Milstein (1991, *Nature* 349: 293-299).

15 Todavía otro aspecto del presente invento se refiere entonces a una composición farmacéutica, que comprende una molécula de ácido nucleico conforme al invento, un polipéptido conforme al invento, un oligonucleótido conforme al invento o un anticuerpo conforme al invento, eventualmente en común con un vehículo y/o una sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable.

20 procedimientos farmacéuticos tecnológicos. Para esto, las moléculas de ácidos nucleicos conformes al invento, el polipéptido conforme al invento, los oligonucleótidos conformes al invento o un anticuerpo conforme al invento se elaboran con unas adecuadas sustancias auxiliares y de vehículo farmacéuticamente aceptables, para dar las formas medicamentosas adecuadas para las diversas indicaciones y los diversos sitios de aplicación.

25 En este caso, los medicamentos pueden ser producidos de tal manera que se pueda alcanzar la velocidad de liberación deseada en cada caso, p.ej. una rápida inundación y/o un efecto retardado o respectivamente de depósito. Un medicamento puede ser en este caso una pomada, un gel, un emplastro, una emulsión, una loción, una espuma, una crema o unos sistemas de emulsiones de fases mixtas o anfífilos (con una fase mixta de aceite/agua o de agua/aceite), un liposoma, un transfersoma, una pasta o un polvo.

30 El concepto de "sustancia auxiliar" significa conforme al invento cualquier material de relleno, dilución o envasado no tóxico, sólido o líquido, siempre y cuando que éste no reaccione de un modo indebidamente desventajoso con una molécula de ácido nucleico conforme al invento, con un polipéptido conforme al invento, con un oligonucleótido conforme al invento o con un anticuerpo conforme al invento o con el paciente. Las sustancias auxiliares galénicas líquidas son, por ejemplo, agua esterilizada, una solución fisiológica de cloruro de sodio, soluciones de azúcares, etanol y/o aceites. Unas sustancias auxiliares galénicas para la producción de tabletas y cápsulas pueden contener, por ejemplo, un agente aglutinante y un material de carga o relleno.

35 Además, una molécula de ácido nucleico conforme al invento, un polipéptido conforme al invento, un oligonucleótido conforme al invento y/o un anticuerpo conforme al invento se pueden utilizar en forma de unos medicamentos empleados por vía sistémica. A éstos pertenecen los medicamentos parenterales, a los que pertenecen los medicamentos inyectables y las infusiones. Los medicamentos inyectables son producidos o bien en forma de ampollas o también como unos denominados medicamentos inyectables prestos para el uso, p.ej. como jeringas acabadas prestas para el uso o jeringas de un sólo uso, y junto a ello también en botellas perforables para una extracción en múltiples veces. La administración de los medicamentos inyectables se puede efectuar en forma de la aplicación por vía subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) o intracutánea (i.c.). En particular, las formas de inyección en cada caso convenientes se pueden producir en forma de suspensiones de cristales, soluciones, sistemas en forma de nanopartículas o dispersos coloidalmente, tales como p.ej. hidrosoles.

40 Las formulaciones inyectables se pueden preparar además en forma de unos concentrados, que son disueltos o dispersados con unos agentes de dilución acuosos isotónicos. Las infusiones se pueden formular asimismo en forma de soluciones isotónicas, emulsiones grasas, formulaciones de liposomas y microemulsiones. Igual a como los medicamentos inyectables, las formulaciones de infusiones se pueden formular también en forma de concentrados para su dilución. Las formulaciones inyectables se pueden aplicar también en forma de infusiones permanentes en la terapia tanto estacionaria como también ambulante, p.ej. en forma de minibombas.

45 La molécula de ácido nucleico conforme al invento, el polipéptido conforme al invento, el oligonucleótido conforme al invento o un anticuerpo conforme al invento pueden estar fijados en los medicamentos parenterales a unos microvehículos o unas nanopartículas, por ejemplo, a unas partículas finísimamente divididas constituidas sobre la base de poli(met)acrilatos, polilactatos, poliglicolatos, poli(aminoácidos) o poli(éter-uretanos). Las formulaciones parenterales pueden ser modificadas también como formulaciones de depósito, p.ej. las que se constituyen sobre la base del "Multiple Unit Principle" (principio de múltiples unidades), cuando una molécula de ácido nucleico conforme al invento, un polipéptido conforme al invento, un oligonucleótido conforme al invento o un anticuerpo conforme al invento se incorpora en una forma finísimamente dividida o respectivamente dispersada, suspendida o como una suspensión de cristales, o las que se constituyen sobre la base del "Single Unit Principle" (principio de una sola

unidad), cuando una molécula de ácido nucleico conforme al invento, un polipéptido conforme al invento, un oligonucleótido conforme al invento o un anticuerpo conforme al invento se incluye en una forma medicamentosa, p.ej. una tableta o unos bastoncillos, que es implantada a continuación. Frecuentemente, estos implantes o medicamentos de depósito se componen, en el caso de las formas medicamentosas de una sola unidad y de múltiples unidades, de los denominados polímeros biodegradables, tales como p.ej. poliésteres de los ácidos láctico y glicólico, poli(éter-uretanos), poli(aminoácidos), poli(met)acrilatos o polisacáridos.

Como sustancias auxiliares y de vehículo en el caso de la producción de medicamentos parenterales entran en consideración agua esterilizada, unas sustancias que influyen sobre el valor del pH, tales como p.ej. ácidos y bases orgánicos/as e inorgánicos/as, así como sus sales, unas sustancias tamponadoras para el ajuste del valor del pH, unos agentes isotonzantes, tales como p.ej. cloruro de sodio, hidrógenocarbonato de sodio, glucosa y fructosa, unos agentes tensioactivos o respectivamente sustancias activas superficialmente y agentes emulsionantes, tales como p.ej. ésteres parciales de ácidos grasos del poli(oxietileno)sorbitán (Tween®) o p.ej. ésteres de ácidos grasos de un poli(oxietileno) (Cremophor®), aceites grasos, tales como p.ej. aceite de cacahuete, aceite de haba de soja y aceite de ricino, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo y un aceite neutro (Miglyol®), así como unas sustancias auxiliares poliméricas tales como p.ej. una gelatina, un dextrano, una poli(vinil-pirrolidona), unos aditivos para disolventes orgánicos que aumentan su solubilidad, tales como p.ej. propilenglicol, etanol, N,N-dimetilacetamida, propilenglicol o unas sustancias formadoras de compuestos complejos, tales como p.ej. citratos y urea, unos agentes conservantes, tales como p.ej. los ésteres hidroxipropílico y -metílico de ácido benzoico, alcohol bencilico, unos agentes antioxidantes, tales como p.ej. sulfito de sodio, y unos agentes estabilizadores, tales como p.ej. EDTA.

En el caso de las suspensiones, se efectúa una adición de agentes espesantes con el fin de evitar la sedimentación de las moléculas de ácidos nucleicos conformes al invento, de los polipéptidos conformes al invento, de los oligonucleótidos conformes al invento o de un anticuerpo conforme al invento, y una adición de agentes tensioactivos y agentes peptizadores, con el fin de asegurar la aptitud de sacudimiento del sedimento, o de unos agentes formadores de compuestos complejos tales como EDTA. También se pueden conseguir unos compuestos complejos de sustancias activas con diversos polímeros, por ejemplo con poli(etilenglicoles), un poliestireno, una carboximetilcelulosa, Pluronic® o poli(etilenglicol)-ésteres con ácidos grasos de sorbitán. Para la preparación de los materiales liofilizados se utilizan unos agentes mejoradores de detergencia, tales como p.ej. manitol, dextrano, sacarosa, albúmina humana, lactosa, una PVP o ciertos tipos de gelatinas.

Las formas medicamentosas adecuadas en cada caso se pueden producir, en consonancia con las prescripciones de recetas y los modos de proceder conocidas/os para un experto en la especialidad, sobre la base de fundamentos farmacéuticos-físicos.

Un último aspecto se refiere a la administración de los ácidos nucleicos y/o de los oligonucleótidos conformes al invento en el caso de la terapia génica mediante unos habituales sistemas de transfección, tales como, por ejemplo, liposomas, o unas técnicas de "pistola de partículas", o de "pistola de genes con un "ADN desnudo", tales como las que ya se han mencionado más arriba.

Otro objeto del presente invento es una célula anfitriona, que ha sido transfectada con un vector conforme al invento o con otra construcción génica conforme al invento. Las células anfitrionas pueden ser células tanto procarióticas como también eucarióticas, ejemplos de células anfitrionas procarióticas son *E. coli*, y de células eucarióticas son *Saccharomyces cerevisiae* o células de insectos. Otras/os células y organismos útiles se han descrito ya más arriba.

Otro aspecto del presente invento se refiere entonces a una composición de diagnóstico, que comprende una secuencia de ácido nucleico conforme al invento, un polipéptido conforme al invento, un oligonucleótido conforme al invento o un anticuerpo conforme al invento. La composición de diagnóstico conforme al invento puede presentarse también como un parte componente de un estuche de diagnóstico del invento (véase más adelante).

Todavía otro aspecto del presente invento se refiere entonces a un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades tumorales, **siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon**, que comprende las etapas de determinar la expresión del **MACC1** en una muestra biológica a partir de un tejido enfermo, y de comparar esta expresión con la expresión del **MACC1** en un tejido sano, **siendo el MACC1 un polipéptido de MACC1 conforme al invento**. Se prefiere el procedimiento conforme al invento, en cuyo caso la determinación de la expresión del **MACC1** es una hibridación, una PCR, una (RT)-PCR "real time" (= en tiempo real), una reacción de fijación entre un antígeno y un anticuerpo, un ELISA, un análisis óptico del proteoma, una electroforesis en gel uni- o pluridimensional, un análisis por espectrometría de masas, una cromatografía, una secuenciación, un análisis de la metilación, una determinación de los SNP's o unas combinaciones de estos procedimientos.

Así, el procedimiento conforme al invento pone a disposición el establecimiento y el uso de la detección por transcripción de la expresión del **MACC1** mediante la utilización, entre otras, de la RT-PCR en tiempo real. A modo de ejemplo, se determinó el nivel de la expresión del **MACC1** en una muestra desconocida (p.ej. un ARN de un tumor) como un porcentaje de la expresión del **MACC1** en el linaje de células SW620 calibradoras de carcinomas de colon humanos, comercialmente disponible.

Otro aspecto del presente invento se refiere entonces a un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades tumorales, siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon metastatizante. A partir de lo que se ha mencionado más arriba, resulta un valor para pronóstico de los niveles de expresión del **MACC1** generados por las rutas antes mencionadas en forma de parámetros clínicos. Hasta ahora no existe ninguna descripción acerca de unas correlaciones de las expresiones de los transcritos del **MACC1** con unos parámetros clínicos tales como una metastatización y/o una supervivencia exenta de metástasis o respectivamente general. Así, la transfección del ADNc de **MACC1** en unos sistemas in vitro condujo a un crecimiento aumentado y a una migración aumentada de células de carcinoma de colon humanas. En unos experimentos in vivo se midieron en un modelo de animal tanto subcutáneo como también ortotópico unas características de crecimiento aumentado de los clones celulares transfectados. En el modelo ortotópico se llegó, además de esto, a la formación de metástasis en el hígado. La correlación de las expresiones de los transcritos del **MACC1** en particular con el pronóstico para la metastatización lejana de los carcinomas de colon era hasta ahora desconocida y resulta sorprendente.

Conforme al invento, una muestra biológica que debe de ser investigada puede derivarse de una biopsia de tumor procedente de los intestinos, del hígado, de los ganglios linfáticos, de los pulmones, de los huesos o del cerebro. También son posibles, sin embargo, otras muestras biológicas, tales como las de saliva, orina, sangre o partes de éstas.

El presente invento describe además un procedimiento para el tratamiento de enfermedades tumorales, que comprende una modulación de la expresión del **MACC1**. El invento describe la correlación del nivel de la expresión (entre otras por transcripción) del **MACC1** con la especificidad para un órgano de la metastatización, así como de la probabilidad de una metastatización lejana de, entre otros, unos carcinomas de colon. De esta manera se establece el aprovechamiento potencial de este nuevo gen como un gen marcador para el diagnóstico de tumores y, además de esto, como una diana de intervención también para una terapia tumoral destinada al influenciamiento (la evitación) de la metastatización lejana en el caso, entre otros, de un carcinoma de colon. Conforme al invento, se describe un influenciamiento para el tratamiento de enfermedades tumorales mediante la administración de una composición farmacéutica conforme al invento, como la que se ha indicado más arriba. El presente invento describe por consiguiente un procedimiento para el tratamiento de enfermedades tumorales, siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon metastatizante.

La identificación del cometido del **MACC1** en el caso de la metastatización en enfermedades tumorales pone a disposición, en otro aspecto del presente invento, la posibilidad de la utilización del **MACC1** como una "diana" para un procedimiento destinado al descubrimiento de unas sustancias, que se fijan al **MACC1**, siendo el **MACC1** un polipéptido de **MACC1** conforme al invento. Conforme al invento, este procedimiento abarca poner en contacto una célula, que expresa el **MACC1** (por ejemplo de una célula recombinante tal como la que se ha mencionado más arriba) con una sustancia candidata, detectar la presencia de la sustancia candidata, que se fija al **MACC1**, y determinar si la sustancia candidata se fija también al **MACC1**. Unos procedimientos para la realización rutinaria de tales escrutinios son bien conocidos para un experto en la especialidad dentro del estado de la técnica de la farmacia. Mediante unas "tecnologías "High-Troughput"" (de alto caudal de paso) se pueden escrutar unas adecuadas bibliotecas de sustancias. Estas bibliotecas y su escrutinio se conocen para un experto en la especialidad, y se pueden adaptar fácilmente a las circunstancias del presente invento, sin deber de presentar en este caso una actividad inventiva.

Otro aspecto del presente invento se refiere entonces a un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica, que comprende las etapas del procedimiento de escrutinio antes mencionado, y de una formulación adecuada de la sustancia identificada en la etapa c) en una forma farmacéuticamente aceptable, **siendo la sustancia un anticuerpo dirigido contra el MACC1.**

Otro aspecto del presente invento se refiere entonces a la utilización de una secuencia de ácido nucleico conforme al invento, de un polipéptido conforme al invento, de un oligonucleótido conforme al invento o de un anticuerpo conforme al invento para el diagnóstico de enfermedades tumorales, **siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon.** A este fin ya se han expuesto ciertos aspectos más arriba. Además, con ayuda de unas investigaciones de las modificaciones de la expresión del **MACC1** de un paciente se puede determinar también la farmacocinética del agente terapéutico utilizado para el tratamiento, y modificar así adecuadamente los parámetros del tratamiento (siendo conocidos para un experto en la especialidad también otros parámetros conocidos). Este aspecto se conoce asimismo por el concepto de "personalized medicine" (medicina personalizada). Por lo demás, para el diagnóstico o la terapia generador/a de imágenes se pueden adosar también unos engarzadores para el diagnóstico generador de imágenes o la terapia a unos objetos conformes al invento (generación de imágenes moleculares, terapia dirigida). Estos engarzadores son conocidos para un experto en la especialidad, p.ej. a partir de las citas de Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer (Inmunoconjugados de medicamentos a base de anticuerpos monoclonales para el tratamiento dirigido hacia un objetivo de un cáncer). Cancer Immunol Immunother. Mayo de 2003; 52(5):328-37. Publicación electrónica de 16 de Enero de 2003; de Signore A, Annovazzi A, Chianelli M, Corsetti F, Van de Wiele C, Watherhouse RN. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy (Agentes radiofarmacéuticos peptídicos para el diagnóstico y la terapia). Eur J Nucl Med. 2001 Oct; 28(10):1555-65. Publicación electrónica de 31 de Julio de 2001. Erratum in: Eur

J Nucl Med. Noviembre de 2001; 28(11):1737.; y de Mehvar R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents (Dextranos para el suministro dirigido a un objetivo y permanente de agentes terapéuticos y generadores de imágenes), J Control Release. 3 de Octubre de 2000; 69(1):1-25.

5 **El presente invento describe además** la utilización de una secuencia de ácido nucleico conforme al invento como un marcador para enfermedades hereditarias humanas. Para esto se investiga la secuencia del **MACC1** en cuanto a  
 10 unas mutaciones específicas (p.ej. SNP's [acrónimo de "Single Nucleotide Polymorphisms" = polimorfismos de un único nucleótido] u otras mutaciones puntuales), que pueden dar lugar entonces a diferentes preferencias para una metastatización. También se puede utilizar una secuencia de un ácido nucleico conforme al invento o de un  
 oligonucleótido conforme al invento para la terapia génica. Ciertos aspectos acerca de esto ya se han expuesto más  
 arriba e incluyen las técnicas de ARNsi y/o de antisentido.

15 Finalmente, el presente invento abarca también un estuche de diagnóstico, que comprende una composición de diagnóstico tal como se ha expuesto más arriba, eventualmente en común con unos tampones adecuados y/o unas instrucciones de uso. En una forma de realización, el estuche de diagnóstico conforme al invento se presenta en  
 forma de un estuche para una PCR, en particular para una RT-PCR, o para un ELISA. Un ejemplo de un tal estuche para la RT-PCR en tiempo real sería, por ejemplo, con los cebadores y las sondas diseñados/as por los autores del  
 invento para la detección por transcripción de la expresión del MACC1 en común con todos los agentes para la RT-PCR en tiempo real. Además de esto, por los autores del invento se creó un protocolo de trabajo reproducible y  
 sencillo de manipular. Otro aspecto del invento es la inclusión del MACC1 (mediando uso de todos los controles usuales en la técnica) en la tecnología de chips de ADN; tanto en unos chips de ADN, que captan a "todos" los  
 genes conocidos, en cada caso de un modo actualizado, así como también en particular en aquéllos, que contienen unos genes específicos relevantes para un tema, p.ej. unas definidas entidades tumorales, cascadas de  
 transducción de señales, etc.

25 La utilización de la detección de la expresión del gen de MACC1 (7a5/prognostina) recientemente identificado, que aquí se describe, en el tumor primario de un paciente de carcinoma de colon se correlaciona, entre otras, con la metastatización lejana (p.ej. en el hígado y los pulmones). Los autores del invento han identificado el nuevo gen de  
 MACC1 (7a5/prognostina) mediante un análisis comparativo de la expresión en tumores primarios humanos, en  
 30 metástasis en diferentes órganos diana y en los correspondientes tejidos normales de pacientes de carcinoma de colon. Éste está localizado en el cromosoma 7 del genoma humano.

35 La expresión por transcripción del MACC1 es sorprendentemente: a) más alta en tejidos malignos (tumores primarios, metástasis) que en los tejidos normales correspondientes, b) más alta en las metástasis lejanas de los carcinomas de colon, p.ej. en el hígado y los pulmones, que en el correspondiente tumor primario, c) sobre todo más alta en los tumores primarios, que ya se han metastatizado o que en el transcurso de la enfermedad se metastatizan todavía de un modo manifiesto, en comparación con los tumores primarios, que no se metastatizan.

40 Puesto que el invento aquí expuesto de un procedimiento para el pronóstico de una metastatización lejana para pacientes de carcinoma de colon, que se basa en la detección por transcripción del nuevo gen de MACC1, afecta a una cuestión clínica central, puede existir sin restricciones un interés por este invento en todo el mundo para todas las clínicas oncológicas y todos los institutos de investigación.

45 En particular, el invento pone a disposición las siguientes ventajas  
 a) la secuencia del ADNc de MACC1 recientemente identificado así como la secuencia proteínica putativa, habiéndose marcado unos dominios característicos de interacción (Figura 3).  
 b) en sistemas *in vitro*, la transfección del ADNc de MACC1 condujo a un crecimiento aumentado y a una migración aumentada de las células de carcinoma de colon humanas.  
 50 c) en experimentos *in vivo* se midieron en el modelo de animal tanto subcutáneo así como también ortotópico unas características de crecimiento aumentado de los clones celulares transfectados. En el modelo ortotópico se llegó además de esto a la formación de metástasis en el hígado.  
 d) la medición de la expresión relativa del ARNm de MACC1 en tumores primarios, en metástasis así como en tejidos normales correspondientes en pacientes con carcinoma de colon.  
 e) la medición de la expresión relativa del ARNm de MACC1 en tumores primarios de pacientes con un carcinoma de  
 55 colon.

60 Puesto que la utilización de la RT-PCR en tiempo real se está desarrollando crecientemente como el método del estado de la técnica para la analítica de la expresión por transcripción, las premisas acerca de los aparatos para el uso del invento se pueden considerar como supuestas de un modo creciente en los laboratorios por todo el mundo.

65 Por fin, el invento ha de ser ilustrado ejemplificativamente de un modo más detallado en lo sucesivo mediando referencia a las Figuras y las secuencias adjuntadas, en las que

La Figura 1 muestra la expresión relativa del ARNm de MACC1 en tumores primarios de pacientes con carcinomas de colon que presentan una supervivencia exenta de metástasis,

La Figura 2 muestra la expresión relativa del ARNm de MACC1 en tumores primarios de pacientes con carcinomas de colon que presentan un desarrollo de metástasis,

5 La Figura 3 muestra la secuencia del ADNc de MACC1 recientemente identificado así como su secuencia proteínica putativa; los dominios característicos de interacción están marcados,

La Figura 4 muestra la expresión del MACC1 en tumores primarios de pacientes con carcinomas de colon, agrupados según la metastatización y el momento de la metastatización.

10 La Figura 5 muestra la supervivencia exenta de metástasis de pacientes de carcinoma de colon con una expresión baja ( $\leq 240$ ) y alta ( $> 240$ ) del MACC1 en tumores primarios, y

15 La Figura 6 muestra la influencia inhibitoria de un ARNsi específico para el MACC1 sobre la expresión de 7a5/prognostina (A) y la influencia inhibitoria de un ARNsi específico para el MACC1 sobre el comportamiento de migración de células de carcinoma de colon (B),

20 La SEQ ID NO: 1: muestra la secuencia de ADNc del MACC1,  
la SEQ ID NO: 2: muestra la secuencia proteínica del MACC1,  
las SEQ ID NO: 3 hasta SEQ ID NO: 6: muestran los oligonucleótidos utilizados en los Ejemplos, y  
la SEQ ID NO: 7: muestra una molécula ARNsi ejemplificativa procedente de los Ejemplos.

### Ejemplos

25 **Pronóstico de una metastatización mediando la utilización del nivel de expresión del ARNm del MACC1 (mediante una RT-PCR en tiempo real)**

#### Pacientes y tejido humano

30 71 pacientes participaron en este estudio, que se llevó a cabo con un permiso informado de los pacientes. Los tumores de colon primarios de seres humanos (46 muestras de 44 pacientes), las metástasis (52 muestras de 41 pacientes) y los tejidos normales (37 muestras de mucosa, 18 tejidos de hígado, 1 tejido de pulmón y 1 ganglio linfático; de 40 pacientes) se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido perioperativamente y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para otros análisis en el banco de tumores de la clínica Robert Rössle, Berlín. El estado TNM fue determinado por unos patólogos de la clínica Robert Rössle.

#### 35 Microdissección y aislamiento del ARN

Se produjeron unos cortes criogénicos en serie de cada tejido para el aislamiento del ARN (10  $\mu\text{m}$ ) y para la inmunohistoquímica (5  $\mu\text{m}$ ). Para la microdissección de las poblaciones de células tumorales, uno de cada diez cortes criogénicos por cada tejido fue tratado por un patólogo después de una tinción con alumbre hematológico

40 *(falta texto, nota del traductor).*

#### RT-PCR con presentación visual diferencial

45 La RT-PCR (acrónimo de Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction = reacción en cadena de la polimerasa) con presentación visual diferencial se llevó a cabo mediando la utilización del RNAimage Differential Display System 3 (de GenHunter Corp., Nashville, TN, EE.UU). Cada uno de los tres cebadores anclados a una base, que habían sido puestos a disposición, se utilizó para la transcripción inversa de 200 ng de ARN total por cada reacción, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR con presentación visual diferencial se llevó a cabo mediando seguimiento del protocolo recomendado, utilizándose el  $\alpha\text{-}[^{33}\text{P}]\text{dATP}$  (de NEN Life Science, Zaventum, Bélgica) como un marcador y la AmpliTaq Polymerase (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).  
50 Los productos de la PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 5 %. El gel fue transferido a borrón, secado y expuesto durante una noche frente a una película de rayos X (de Kodak BioMax MR, via Sigma, Deisenhofen, Alemania). La película se adaptó de nuevo al gel, con el fin de hacer posible un recorte de las bandas que mostraban una diferente expresión. Estos fragmentos de ADNc se volvieron a amplificar mediante una PCR mediando la utilización de las mismas combinaciones de cebadores y las mismas condiciones de PCR que para la  
55 RT-PCR con presentación visual diferencial, y se clonaron en el vector pCR2.1 (lo que condujo a las construcciones artificiales aquí descritas: pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5, pCR2.1/7a10, Original TA Cloning Kit, Invitrogen).

#### Comprobación de las construcciones artificiales que contienen un fragmento de ADNc

60 Las construcciones artificiales de pCR2.1 (aquí se describen: las pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5 y pCR2.1/7a10) fueron transferidas a borrón mediando la utilización de un aparato Minifold II Slotblot (de Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) cada una sobre cinco membranas de Nylon mediando la utilización de un aparato Minifold II Slotblot (de Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Cada membrana fue hibridada con los productos de la RT-PCR con presentación visual diferencial completa, que se habían producido a partir de un tipo específico de tejido (Consalez y colaboradores, 1996). Con el fin de conseguir una alta actividad específica, los productos de la RT-PCR con  
65 presentación visual diferencial fueron marcados de nuevo con  $\alpha\text{-}[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (de NEN) (en el Random Primed Labeling Kit, de Roche Diagnostics), y fueron purificados (en el Nucleotid Removal Kit, de QIAGEN, Hilden, Alemania). La

5 hibridación se llevó a cabo durante una noche a 65°C (con 6 x SSC, 5 x reactivo de Denhardt, SDS al 0,5 % y 100 µg/ml de ADN separado por corte). Los borrones fueron expuestos frente a una película de rayos X (de Kodak Xomat-AR). Las inserciones de unas construcciones artificiales que mostraban un patrón similar de expresión, tal como se encontró en la RT-PCR con presentación visual diferencial, fueron secuenciadas (por Invitex, Berlín, Alemania).

#### Escrutinio de la biblioteca de ADNc

10 La biblioteca de ADNc STRETCH PLUS de un adenocarcinoma colorrectal humano derivado de los linajes de células SW480 (de Clontech, Heidelberg, Alemania) fue transfectada en la cepa anfitriona bacteriana Y1090 r. Se produjeron unas dobles réplicas en filtros mediando la utilización de unas membranas de nitrato de celulosa reforzado con Optitran (de Schleicher & Schuell). Los filtros fueron desnaturalizados (con NaOH 0,5 N y NaCl 1 M) y neutralizados (con Tris 0,5 M de pH 8, y NaCl 1 M). La construcción artificial pCR2.1/7a5 se utilizó como una sonda en una forma marcada con  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dCTP (de NEN) mediando la utilización del estuche Random Primed Labeling Kit (de Roche Diagnostics). La hibridación se llevó a cabo durante una noche a 65°C (con 5 x SSC, 5x reactivo de Denhardt, SDS al 0,1 % y 100 µg/ml de un ADN separado por corte). Los filtros fueron expuestos entonces frente a una película de rayos X (Kodak Xomat-AR). Las placas positivas fueron entresacadas. La preparación de ADN se llevó a cabo mediando la utilización del estuche de preparación de ADN lambda (de QIAGEN). Las inserciones de ADNc fueron secuenciadas (por Invitex).

#### 20 Prolongación de la información de las secuencias

Las secuencias obtenidas mediante una RT-PCR con presentación visual diferencial y un escrutinio de la biblioteca de ADNc se utilizaron para los análisis de bancos de datos, todos los cuales se establecieron mediando la utilización del paquete de análisis WWW<sup>2</sup>HUSAR en el servidor del grupo Biocomputing Service del DKFZ en Heidelberg (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>). Se determinó un racimo (cluster) de EST (acrónimo de Expressed Sequence Tags = marcaciones de secuencias expresadas), que mostraba una identidad de la secuencia, y que está localizado en el fragmento de la secuencia de ADN genómico AC007001. En la dirección 5' se localizaron otros tres racimos de EST. Se llevó a cabo una RT-PCR que une a las EST (en el GeneAmp RNA PCR Kit, de Applied Biosystems) con el fin de comprobar si los racimos de EST identificados son unas partes componentes del ADNc de 7a5. Mediando la utilización de la nueva información de secuencias y de la secuencia de ADNc de SH3BP4, que mostraba unas similitudes de secuencias en unas regiones que se solapaban, se identificaron unos racimos de EST, que estaban localizados en el fragmento AC005083 de la secuencia de ADN genómico. Se llevó a cabo una RT-PCR de larga distancia (transcripción inversa: Expand Reverse Transkriptase: PCR: Expand High Fidelity PCR, las dos de Roche Diagnostics) con el fin de comprobar si los EST's identificados eran una parte componente del ADNc de MACC1 (7 A 5).

#### 35 5'-RACE

Se llevó a cabo una 5'-RACE, utilizándose el estuche de amplificación de ADNc SMART RACE (de Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Unos productos de PCR separados sobre un gel de agarosa fueron vueltos a amplificar y clonados en el vector pCR2.1 (de Invitrogen) para su secuenciación.

#### 40 Clonación del ORF en un vector de expresión

Se llevó a cabo una RT-PCR de larga distancia, tal como se ha indicado más arriba, utilizándose no obstante un cebador para la amplificación del ORF (acrónimo de Open Reading Frame = marco de lectura abierto) total sin ningún codón de parada. El cebador situado junto al extremo 5' estaba estructurado de tal manera que hiciese posible una clonación dirigida del ORF en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (en el pcDNA3.1Directional TOPO Expression Kit, de Invitrogen), en lo respecta al marco correcto. El procedimiento de clonación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las construcciones artificiales (pcDNA3.1D/7a5-V5-His), que contenían la inserción esperada fueron secuenciadas.

#### 50 Producción de unos clones celulares SW480, que expresan el MACC1 transducido de un modo estable

Con el fin de analizar la función biológica del gen de MACC1 (7a5), se transdujeron la construcción artificial pcDNA3.1D/7a5-V5-His que expresa el MACC1, y la construcción artificial pcDNA3.1D/V5-His/lacZ que expresa el LacZ (de Invitrogen, que servía como testigo), en células SW480 mediando la utilización de lipofectina (de Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la transducción, se utilizaron 10 µg de ADN plasmídico y 15 µl de lipofectina, con el fin de transducir  $5 \times 10^4$  células. 48 h después de la transducción, los clones que llevaban la construcción artificial se seleccionaron en un medio que contenía G418 (de Invitrogen). Después de dos semanas, eran visibles unas colonias, que luego fueron clonadas en forma de anillo y expandidas para realizar otros experimentos. Todos los clones celulares aislados fueron escrutados mediante borrones de transferencia Western y RT-PCR en tiempo real en cuanto a la expresión de MACC1 o de LacZ.

#### 60 Borrones de transferencia Western de unos clones celulares SW480 que expresan el MACC1

65 Unas células SW480 transducidas con MACC1, transducidas con lacZ y de tipo silvestre fueron lisadas en SDS al 1 %, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, y fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 7,5 %. Después de una transferencia eléctrica de borrón (durante 1 h, en la Trans Blot Semi Dry Transfer Cell, de BioRad, Munich, Alemania), se detectó la proteína de MACC1 expresada mediando la utilización de un anticuerpo anti-V5 (de Invitrogen) y de un anticuerpo secundario anti-HRP de ratón (de Promega, Madison, WI, EE.UU). La reacción de

quimioluminiscencia se llevó a cabo con una solución de ECL (de Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### RT-PCR en tiempo real cuantitativa, relativa, de dos etapas,

5 La reacción de la transcriptasa inversa (RT) se llevó a cabo con 50 ng de ARN total (MuLV Reverse Transkriptase, de Applied Biosystems). Para cada PCR en tiempo real cuantitativa (a 95°C durante 60 segundos, 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, de 60°C durante 10 segundos, de 72°C durante 20 segundos), se extrajo 1/5 del volumen de la RT mediando la utilización del dispositivo LightCycler (LightCycler DNA Master Hybridization Probes kit, de Roche Diagnostics). La expresión del MACC1 y la del gen doméstico (House-keeping) de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) se determinaron en unas tandas dobles a partir de la misma reacción de RT. Para la 7a5 se produjo un amplicón de 136 pb (pares de bases) y para la G6PDH se produjo un amplicón de 136 pb por medio de unos cebadores, que fueron reconocidos por unas sondas de hibridación específicas para ciertos genes, marcadas con fluoresceína y con LCRed640 (síntesis de los cebadores y de las sondas: por las entidades BioTeZ y TiB MolBiol, las dos de Berlín, Alemania). El ADNc del calibrador, derivado del linaje de células SW620, se utilizó en 15 unas diluciones en serie simultáneamente en cada pasada.

Para la detección de tumores de los clones SW620 de células humanas en el hígado de un ratón después de un trasplante ortotópico se utilizó una secuencia satélite humana. Se utilizaron los cebadores (sintetizados por la entidad BioTeZ, Berlín) que producían un amplicón (de un modo similar a como lo hicieron Becker y colaboradores, 2002) (síntesis realizada por TiB MolBiol, Berlín). La PCR en tiempo real se llevó a cabo tal como se ha descrito más arriba mediando la utilización de 250 ng de ADN genómico.

Cebador:

hacia adelante: 5' - ttc ttt tga ttc ctc cgg tga - 3' (SEQ ID No. 3)  
 25 dirección inversa: 5' - act ctg atg ggc atg tgc tg - 3' (SEQ ID No. 4)  
 sondas (en este caso para su uso en el Light Cycler):  
 5'- gca gac ttc ctc aag aaa ttc tgg aag atc ta - 3' - FITC (SEQ ID No. 5)  
 LCRed - 5'- agt gtt tca gaa ctt ctg gac att tta gac ga - 3'(SEQ ID No. 6)

30 Temperatura de reanillado: 60°C, número de ciclos: 45

#### Crecimiento en Soft Agar de unos clones de células tumorales SW480 transducidas con el MACC1

Para la evaluación del crecimiento de las células en un Soft Agar (= agar blando), se mezclaron 5 ml de un agar (de Difco, Detroit, MI, EE.UU) al 1 %, calentado previamente a 50°C, con 5 ml del medio DMEM (con rojo de fenol w/o doblemente concentrado, de Invitrogen), suplementado con FCS al 10 % y con antibióticos. 200 µl de una suspensión de células, que contenía  $5 \times 10^4$  células, se añadieron rápidamente a los 10 ml de la mezcla de Soft Agar, se mezclaron enérgicamente, se vertieron en partes alícuotas de 5 ml en cápsulas de Petri de 60 mm y se colocaron sobre hielo durante 5 minutos. Luego, los clones celulares transducidos con el MACC1, los clones celulares transducidos con el LacZ y las células SW480 de tipo silvestre se cultivaron en tandas dobles en un Soft Agar durante 8 días y se recontaron las colonias.

#### Ensayo de migración de células

Unas cámaras de membranas Transwell (con un tamaño de poros de 12,0 µm, de Costar, Heidelberg, Alemania) fueron equilibradas con 1 ml del medio RPMI 1640, que había sido suplementado con FCS al 10 % durante 24 h a 37°C y con 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el medio y se añadieron a las cámaras de membranas de filtración 0,5 ml de una suspensión de células, que contenía  $2,5 \times 10^5$  células, y se añadieron 1,5 ml del medio a la cámara inferior. Se recontó el número de células, que habían migrado a través de la membrana hacia la cámara inferior tras 24 h después de una inoculación de las células (llevada a cabo en tandas triples).

#### Crecimiento in vivo de unos clones celulares SW480 transducidos con el MACC1: trasplante subcutáneo

Para el crecimiento *in vivo* de tumores, el día 0 se trasplantaron  $1 \times 10^7$  células SW480 transducidas con el MACC1, transducidas con el LacZ y de tipo silvestre a lo largo del flanco izquierdo de unos ratones NMRI nu/nu machos, con una edad de 6 - 8 semanas. Cada conjunto de animales se componía de 10 animales. Los animales fueron retenidos durante 39 días, con el fin de hacer posible el desarrollo de unos tumores medibles. El tamaño de los tumores se midió en todos los conjuntos en dos dimensiones en los días 7, 11, 15, 21, 27, 32, 35 y 39. Se calculó el volumen de los tumores ( $\text{anchura}^2 \times \text{longitud}$ )/2 y se indicó como volumen medio de los tumores en cm<sup>3</sup>. Los animales fueron sacrificados y los tumores se extrajeron y se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido para otros análisis.

#### Crecimiento in vivo de unos clones celulares SW480 transducidos con MACC1: trasplante ortotópico

60  $1 \times 10^7$  células SW480 transducidas con el MACC1, transducidas con el LacZ o de tipo silvestre se trasplantaron primeramente por vía subcutánea a lo largo del flanco izquierdo de unos ratones hembras, de color beige, con una edad de 6 - 8 semanas, con SCID (acrónimo de Severe Combined Immunodeficiency = inmunodeficiencia combinada grave), y los tumores se dejaron crecer durante tres semanas. Luego, estos tumores se extrajeron, se cortaron en trozos con un tamaño de  $2 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$  y se trasplantaron ortotópicamente al intestino ciego (caecum) de 65 ratones hembras de color beige con SCID. Cada conjunto de animales se componía de 5 animales. Los animales fueron retenidos durante 70 días, con el fin hacer posible el crecimiento de tumores y la metastatización.

Comenzando el día 16, el tamaño de los tumores se midió una vez por semana en todos los grupos. Los animales fueron sacrificados y los tumores así como los órganos potencialmente metastásicos se extrajeron y se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido para los análisis ulteriores. Después de la extracción, se calcularon los volúmenes finales de los tumores como longitud x anchura x altura y se indicó el volumen medio de los tumores en  $\text{cm}^3$ .

#### Hibridación *in situ* en tejidos humanos

El fragmento de la RT-PCR con presentación visual diferencial, específico para el MACC1, fue transferido a través del pCR2.1/7a5 al vector pBluescript II SK+ (de Stratagene GmbH, Heidelberg, Alemania) para su clonación. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo mediando la utilización de las polimerasas de ARN T7 y SP6 (de Epicentre Technologies, Madison, sondas, WI, EE.UU.) con el fin de obtener unas sondas del mismo sentido y antisentido. La transcripción se llevó a cabo mediando la utilización del estuche DIG Labeling Kit (de Roche Diagnostics).

Unos cortes criogénicos de un tejido humano se fijaron en paraformaldehído y se secaron. La prehibridación se llevó a cabo durante una hora a  $55^\circ\text{C}$  mediando la utilización de 4 x SSC, sulfato de dextrano al 5 %, 1 x el reactivo de Denhardt, formamida al 50 %, 0,25 mg/ml de ARNt de levadura y 0,5 mg/ml de ADN fragmentado de esperma de salmón. La reacción de hibridación se llevó a cabo durante 16 horas a  $55^\circ\text{C}$ , mediando la utilización de la solución de prehibridación, que contenía 500 ng/ml de la sonda de ARN transcrita *in vitro*. Se llevó a cabo un lavado extenso en 2 x SSC y formamida al 50 % a  $55^\circ\text{C}$ . El bloqueo se realizó mediando la utilización del reactivo de bloqueo (blocking) (de Roche Diagnostics) de acuerdo con las prescripciones del fabricante. Los cortes se incubaron durante dos horas con fragmentos Fab anti-DIG-AP (de Roche Diagnostics). Después de haber lavado, se llevó a cabo una detección colorimétrica mediando la utilización de una solución de NBT/BCIP (de Roche Diagnostics) mediante incubación en la oscuridad.

#### Inmunohistoquímica

Unos cortes criogénicos de tumores primarios, de ganglios linfáticos, de metástasis de los pulmones y del hígado así como de los correspondientes tejidos se tiñeron inmunológicamente de acuerdo con una modificación del sistema de amplificación de señales catalizado (CSA acrónimo de Catalysed Signal Amplification) DAKO (de DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca): la reactividad de biotina endógena se bloqueó mediante una irradiación con rayos UVC a 254 nm durante 35 minutos a la temperatura ambiente. Los cortes se volvieron a hidrogenar en una solución acuosa de al 0,01 % de  $\text{NaN}_3$  y un estabilizador durante 30 minutos a  $50^\circ\text{C}$ . La peroxidasa endógena fue bloqueada mediante incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % en metanol durante 30 minutos a  $50^\circ\text{C}$ . El bloqueo de las proteínas se llevó a cabo durante 5 minutos tal como se había recomendado.

El anticuerpo policlonal primario anti-MACC1 humano de conejo se produjo contra un polipéptido derivado de MACC1 (aminoácidos AA 812 - 826, que está localizado cerca del terminal de C: (KLH)-SALDRMKNPVTKHWR, de Eurogentec, Seraing, Bélgica) y a continuación se purificó mediante una cromatografía por afinidad en presencia del antígeno peptídico, acoplado con CNBr-Sepharose (de BioGenes, Berlín, Alemania). Este anticuerpo se utilizó para la inmunohistoquímica en una dilución a 1:1.000. Para evitar la ligación no específica, basada en anticuerpos, con el receptor de tipo Fc, se utilizó un fragmento de anticuerpo  $\text{F(ab)'}_2$  purificado por afinidad, biotinilado, agotado en cuanto al fragmento Fc, con una especificidad anti-conejo (dilución a 1:40.000, de Dianova-Jackson ImmunoResearch, Hamburgo, Alemania). El conjugado de estreptavidina y HRP (peroxidasa de rábano picante) se usó durante 15 minutos a la temperatura ambiente. La detección colorimétrica se llevó a cabo mediando la utilización de un substrato de DAB, siendo seguido el protocolo del fabricante. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina durante 1 minuto. Los cortes se analizaron de acuerdo con aspectos topográficos de la expresión.

#### Análisis estadístico

El grado de significancia estadística se calculó mediando la utilización del ensayo de suma de rangos de Mann - Whitney de dos lados no paramétrico (mediante una RT-PCR en tiempo real) y del ensayo T de dos muestras independientes (crecimiento en Soft Agar, ensayo de migración de células, crecimiento *in vivo*).

#### Diagnóstico constituido sobre la base de la expresión del MACC1 en tumores primarios de pacientes de carcinoma de colon con y sin metastatización

La Figura 4 (representación gráfica de caja (en inglés "box plot") con representación de la mediana) muestra la altura de la expresión del MACC1 en los tumores primarios de pacientes de carcinoma de colon ( $T_{2-4}N_{0-1}$ ),

a) que no se habían metastatizado en el momento del análisis del MACC1 y que en el período de tiempo de observación de 60 meses no se metastatizaron = M0 sin metástasis en el transcurso,

b) que no se habían metastatizado en el momento del análisis del MACC1, pero que se metastatizaron en el período de tiempo de observación de 60 meses = M0 con metástasis en el transcurso, y

c) que ya se habían metastatizado en el momento del análisis del MACC1 = M1

En los tumores primarios de los pacientes, que desarrollaron metástasis en el transcurso y que ya se habían metastatizado, se midieron en este caso unas expresiones manifiestamente más altas del MACC1.

#### Supervivencia exenta de metástasis de pacientes de carcinoma de colon en dependencia del nivel de la expresión del MACC1

La Figura 5 (curva de Kaplan-Meier) muestra la probabilidad para la supervivencia exenta de metástasis en dependencia de una expresión baja o respectivamente alta del MACC1 en el respectivo tumor primario. Como "cut-off" (= límite de corte), se ha calculado el valor relativo de MACC1 de 240, como "bajos" se han definido todos los valores relativos de MACC1  $\leq$  240 y como "altos" se han definido todos los valores relativos de MACC1  $>$  240.

5 Ejemplo 1: Los pacientes con unas expresiones del MACC1  $\leq$  240 en el tumor primario desarrollan metástasis en aproximadamente un 20-25 % (en el período de tiempo de observación)

Ejemplo 2: Los pacientes con unas expresiones del MACC1  $>$  240 en el tumor primario desarrollan metástasis en aproximadamente un 75-80 % (en el período de tiempo de observación)

10 La expresión del MACC1 en el tumor primario es significativamente predictiva para el desarrollo de metástasis lejanas (P=0,0057).

**Intervención terapéutica con un ARNsi específico para el MACC1 en el plano de la expresión**

15 La Figura 6A describe la influencia de unos oligonucleótidos de ARNsi específicos para el MACC1, transfectados de manera transitoria, sobre la expresión por transcripción de MACC1 en un clon celular transfectado establemente con el MACC1 y que lo sobreexpresa fuertemente, de un linaje de células de carcinoma de colon humanas. El testigo no tratado con el ARNsi corresponde a un 100 %.

20 Ejemplo de un oligonucleótido eficaz de un ARNsi específico para el MACC1:

- nt (nucleótidos) 2.233 hasta 2.253 de la secuencia de ADNc de plena longitud del MACC1
- 5' -AAGCTTGGAAAAGGCTGGAGG- 3' (SEQ ID No. 7)

**Intervención con un ARNsi específico para el MACC1 en el plano funcional**

25 La Figura 6B describe la influencia de unos oligonucleótidos de un ARNsi específico para el MACC1, transfectados de manera transitoria, sobre el comportamiento de migración de un clon celular transfectado establemente con el MACC1 y que lo sobreexpresa fuertemente, de un linaje de células de carcinoma de colon humanas. El testigo no tratado con el ARNsi corresponde a un 100 %. En lo que se refiere al protocolo del ensayo de migración, véase más arriba.

30 Mediante la transfección transitoria de un ARNsi específico para el MACC1 se inhibe la expresión del MACC1. La consecuencia de esto consiste en la actividad disminuida de migración de estas células como un parámetro biológico para el potencial de metastatización. Para el uso terapéutico en un paciente, los oligonucleótidos de un ARNsi específico para el MACC1 se clonan preferiblemente en unos correspondientes plásmidos. Así, se alcanza una expresión estable del ARNsi en el tumor primario del paciente, que conduce luego a una inhibición permanente de la expresión del MACC1 y que puede inhibir a la metastatización.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Charité - Universitätsmedizin Berlin

5 <120> 7a5/prognostina y su utilización para el diagnóstico de tumores y la terapia tumoral

<130> U30057PCT

<160> 7

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 2559

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

>400>1

atgcta	aatca	ctgaa	agaaa	acatttt	tcgg	tcagga	agaa	ttgcaca	aatg	tatgtct	gaa	60
gcaaatt	tga	ttgacat	gga	agctgg	aaaa	ctctca	aaaa	gttgca	aatat	tacaga	atgc	120
caggacc	cag	acttgct	tca	caattgg	ccg	gatgct	ttca	cccttc	gtgg	taataa	tgct	180
tccaaag	tgt	caaatcc	att	ctggaat	caa	ctgtct	gctt	ctaacc	catt	tttgga	tgc	240
ataactc	aac	taagaa	ataa	cagga	agaga	aataat	atatt	ccatct	ttaa	ggaaga	tcc	300
tttcttt	tct	gtagaga	aat	agaaa	atgga	aattct	tttg	attcct	ccg	tgatga	actt	360
gatgtgc	atc	agttact	tag	gcagact	tcc	tcaaga	aat	ctgga	agatc	taaaag	tgtt	420
tcagaact	tc	tggacatt	ttt	agacgac	aca	gcacat	gccc	atcaga	gtat	acataa	ctct	480
gaccaga	tcc	tactaca	cga	cttaga	gtgg	cttaaaa	atg	atcggg	aggc	ttataa	aatg	540
gcttggt	ttaa	gtcaac	gcca	gctgg	ccgc	tctgc	cttg	atttga	atac	aattag	tccag	600
agccctg	gat	gggcc	cagac	acaact	tgcg	gaggtc	acca	tagctt	gcaa	agtaa	acat	660
caaggagg	gt	cagtaca	att	acctga	atca	gacatc	actg	ttcatg	tgcc	ccaagg	tcat	720
gtggctg	tgg	gagaatt	cca	agagg	tgtct	ctaagg	gctt	tccttg	atcc	gccaca	catg	780
cttaacc	atg	atctttc	gtg	cactgt	gagc	ccgttg	tgg	aaatca	tgtt	aggca	acctc	840
aataca	atgg	aagcc	ctttt	gctgg	agatg	aaaatt	gggg	ctgaag	taag	aaagg	tcc	900
ttcagcc	aag	tcatg	acaga	aatggt	gtgt	ttacac	agct	tggg	taaga	aggcc	ctttt	960
aaagttt	ttaa	gcaact	gcta	catttata	aaa	gacacc	atcc	aagtca	agct	aatcg	acttg	1020
agtcagg	ttaa	tgtatct	ag	ggttgc	tgc	caagct	aaag	ctctt	ccgtc	accag	tgcc	1080
accattt	ggg	attata	tcca	caaaacc	cacc	tcaatt	ggaa	tttatg	gacc	caaat	atatac	1140
catccc	agtt	ttactg	tgt	tttaac	agtt	tgtgg	acaca	attata	tgcc	aggac	agctt	1200
acaattt	ctg	atatta	agaa	gggtg	gaaaa	aacata	tctc	cagttg	tgtt	tcagct	ctgg	1260
gggaag	cagt	cattttt	tact	tgaca	agcca	caagatt	ttaa	gtattt	ctat	ttttc	ctgt	1320

ES 2 409 338 T3

gatcctgatt ttgaagtaaa gacagaagga gaaaggaaag aaattaaaca aaagcagttg 1380  
gaagcaggtg aagtagttca tcaacaattt ttatcttctt tagttgagca cagagagatg 1440  
cacttgtttg atttttgtgt tcaagtggag cctcccaatg gtgaaccagt tgcacagttc 1500  
tctatcacta ctctgatcc aaccccaaac ctaaaaagac tctcgaatct gccaggctat 1560  
ttgcagaaga aggaggaaat caagtctgct cctttatcac caaaaattct tgttaaatat 1620  
cctacatttc aagataaaac attgaacttt agcaactatg gggtaaccct gaaggcagtg 1680  
ctaagacaaa gcaagattga ttacttcctt gaatatttca aaggggacac aatagctctc 1740  
ctcggggaag gtaaggtaaa agctattggt cagtccaaag tgaagaatg gtatgtagga 1800  
gtcctcagag gtaagattgg acttgtacac tgcaaaaatg tcaaggtgat ttcaaaggag 1860  
caagtaatgt ttatgtcaga tagtgtcttt acaaccagaa atcttcttga acagattgtc 1920  
ctgcctttta aaaaattgac ttatatctac tcagttgtat taaccttggg gtcagaaaaa 1980  
gtttatgatt ggaaagtttt agctgatgtc ctgggttact cacatctgtc cctggaagat 2040  
tttgatcaaa ttcaagcaga caaagaatca gagaaagttt cttatgttat aaagaagtta 2100  
aaggaagatt gccacacaga gagaaataca aggaagtttc tgtatgaact tattgtggct 2160  
cttctgaaaa tggattgcca agagttagtc gcacgtctca tccaagaagc tgctgttctg 2220  
acttcagctg tcaagcttgg aaaaggctgg agggaaactag ctgaaaagtt agtacgactc 2280  
acaaagcaac aaatggaggc atatgaaatt cctcatcgag gaaacactgg agatggtgct 2340  
gttgagatga tgtggaaacc tgcctatgat tttctgtata cctggagtgc tcaactatgga 2400  
aataactaca gagatgtggt acaagacctt cagtcagctt tggacagaat gaaaaaccct 2460  
gtgactaaac actggagaga attaactgga gttttaatac tagtaaattc tttggagggt 2520  
ttgagagtaa ctgcattctc cacttctgag gaagtatag 2559

<210> 2  
<211> 852  
<212> PRT  
5 <213> homo sapiens  
<400> 2

ES 2 409 338 T3

Met Leu Ile Thr Glu Arg Lys His Phe Arg Ser Gly Arg Ile Ala Gln  
1 5 10 15

Ser Met Ser Glu Ala Asn Leu Ile Asp Met Glu Ala Gly Lys Leu Ser  
20 25 30

Lys Ser Cys Asn Ile Thr Glu Cys Gln Asp Pro Asp Leu Leu His Asn  
35 40 45

Trp Pro Asp Ala Phe Thr Leu Arg Gly Asn Asn Ala Ser Lys Val Ala



ES 2 409 338 T3

Met Thr Glu Met Val Cys Leu His Ser Leu Gly Lys Glu Gly Pro Phe  
 305 310 315 320

Lys Val Leu Ser Asn Cys Tyr Ile Tyr Lys Asp Thr Ile Gln Val Lys  
 325 330 335

Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu Val Val Ala Ala Gln Ala  
 340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ala Ala Thr Ile Trp Asp Tyr Ile His Lys  
 355 360 365

Thr Thr Ser Ile Gly Ile Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile His Pro Ser Phe  
 370 375 380

Thr Val Val Leu Thr Val Cys Gly His Asn Tyr Met Pro Gly Gln Leu  
 385 390 395 400

Thr Ile Ser Asp Ile Lys Lys Gly Gly Lys Asn Ile Ser Pro Val Val  
 405 410 415

Phe Gln Leu Trp Gly Lys Gln Ser Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp  
 420 425 430

Leu Ser Ile Ser Ile Phe Ser Cys Asp Pro Asp Phe Glu Val Lys Thr  
 435 440 445

Glu Gly Glu Arg Lys Glu Ile Lys Gln Lys Gln Leu Glu Ala Gly Glu  
 450 455 460

Val Val His Gln Gln Phe Leu Phe Ser Leu Val Glu His Arg Glu Met  
 465 470 475 480

His Leu Phe Asp Phe Cys Val Gln Val Glu Pro Pro Asn Gly Glu Pro  
 485 490 495

Val Ala Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Pro Asn Leu Lys  
 500 505 510

Arg Leu Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Leu Gln Lys Lys Glu Glu Ile Lys  
 515 520 525

Ser Ala Pro Leu Ser Pro Lys Ile Leu Val Lys Tyr Pro Thr Phe Gln  
 530 535 540

Asp Lys Thr Leu Asn Phe Ser Asn Tyr Gly Val Thr Leu Lys Ala Val  
 545 550 555 560

ES 2 409 338 T3

Leu Arg Gln Ser Lys Ile Asp Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Asp  
 565 570 575

Thr Ile Ala Leu Leu Gly Glu Gly Lys Val Lys Ala Ile Gly Gln Ser  
 580 585 590

Lys Val Lys Glu Trp Tyr Val Gly Val Leu Arg Gly Lys Ile Gly Leu  
 595 600 605

Val His Cys Lys Asn Val Lys Val Ile Ser Lys Glu Gln Val Met Phe  
 610 615 620

Met Ser Asp Ser Val Phe Thr Thr Arg Asn Leu Leu Glu Gln Ile Val  
 625 630 635 640

Leu Pro Leu Lys Lys Leu Thr Tyr Ile Tyr Ser Val Val Leu Thr Leu  
 645 650 655

Val Ser Glu Lys Val Tyr Asp Trp Lys Val Leu Ala Asp Val Leu Gly  
 660 665 670

Tyr Ser His Leu Ser Leu Glu Asp Phe Asp Gln Ile Gln Ala Asp Lys  
 675 680 685

Glu Ser Glu Lys Val Ser Tyr Val Ile Lys Lys Leu Lys Glu Asp Cys  
 690 695 700

His Thr Glu Arg Asn Thr Arg Lys Phe Leu Tyr Glu Leu Ile Val Ala  
 705 710 715 720

Leu Leu Lys Met Asp Cys Gln Glu Leu Val Ala Arg Leu Ile Gln Glu  
 725 730 735

Ala Ala Val Leu Thr Ser Ala Val Lys Leu Gly Lys Gly Trp Arg Glu  
 740 745 750

Leu Ala Glu Lys Leu Val Arg Leu Thr Lys Gln Gln Met Glu Ala Tyr  
 755 760 765

Glu Ile Pro His Arg Gly Asn Thr Gly Asp Val Ala Val Glu Met Met  
 770 775 780

Trp Lys Pro Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Thr Trp Ser Ala His Tyr Gly  
 785 790 795 800

Asn Asn Tyr Arg Asp Val Leu Gln Asp Leu Gln Ser Ala Leu Asp Arg  
 805 810 815

ES 2 409 338 T3

Met Lys Asn Pro Val Thr Lys His Trp Arg Glu Leu Thr Gly Val Leu  
 , 820 825 830

Ile Leu Val Asn Ser Leu Glu Val Leu Arg Val Thr Ala Phe Ser Thr  
 835 840 845

Ser Glu Glu Val  
 850

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> homo sapiens

<400> 3  
 ttctttgat tcctccggtg a 21

10 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

15 <400> 4  
 actctgatgg gcatgtgctg 20

<210> 5  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 5  
 25 gcagacttc tcaagaaatt ctggaagatc ta 32

<210> 6  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

30 <400> 6  
 agtgttcag aactctgga catttagac ga 32

<210> 7  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 7  
 40 aagctggaa aaggctggag g 21

## REIVINDICACIONES

1. Secuencia de ácido nucleico, que codifica el polipéptido de MACC1, escogida entre el conjunto formado por:  
 a) una secuencia de ácido nucleico con la secuencia indicada en la SEQ ID NO: 1,  
 5 b) unas secuencias de ácidos nucleicos, que se derivan de la secuencia de ácido nucleico indicada en la SEQ ID NO: 1 como resultado del código genético degenerado.
2. Polipéptido de MACC1 con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 2, que es codificado por una  
 10 secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Oligonucleótido, que se hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la  
 reivindicación 1, que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7.
4. Molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2 u  
 15 oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 como un medicamento.
5. Vector que contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Organismo anfitrión recombinante procariótico o eucariótico no humano, que contiene por lo menos un vector de  
 20 acuerdo con la reivindicación 5.
7. Anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento de éste, que se fija a un antígeno, que reconoce a un  
 polipéptido de MACC1 con la SEQ ID NO: 2.
8. Composición farmacéutica, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1,  
 25 un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, eventualmente en común con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Composición de diagnóstico, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1,  
 30 un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7.
10. Procedimiento para el diagnóstico de enfermedades tumorales, que comprende la etapa de determinar la  
 35 expresión del MACC1 en una muestra biológica procedente de un tejido o de líquidos corporales enfermo(s), y la de comparar esa expresión con la expresión del MACC1 en un tejido o líquido corporal sano, siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon,  
 40 siendo el MACC1 un polipéptido, tal como se ha definido en la reivindicación 2.
11. Procedimiento para el pronóstico de la probabilidad de la metastatización lejana de un cáncer de colon, que  
 comprende la etapa de determinar la expresión del MACC1 en una muestra biológica procedente de un tejido o de  
 45 líquidos corporales enfermo(s), y la de comparar la expresión con la expresión del MACC1 en un tejido o líquido corporal sano,  
 50 siendo el MACC1 un polipéptido, tal como se ha definido en la reivindicación 2.
12. Procedimiento para el diagnóstico de un cáncer de colon de acuerdo con la reivindicación 10 o para el pronóstico  
 de la probabilidad de la metastatización lejana de un cáncer de colon de acuerdo con la reivindicación 11,  
 55 realizándose que la determinación de la expresión del MACC1 comprende una hibridación, una PCR, una (RT)-PCR en tiempo real, una fijación entre un antígeno y un anticuerpo, un ELISA, un análisis óptico del proteoma, una electroforesis en gel uni- o pluridimensional, un análisis por espectrometría de masas, una cromatografía, una secuenciación, un análisis de la metilación, una determinación de los SNP's o unas combinaciones de estos procedimientos.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 12, realizándose que la enfermedad tumoral  
 es un cáncer de colon metastatizante.
14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 10 hasta 13, realizándose que la muestra biológica se  
 60 deriva de una biopsia de un tumor del intestino, del hígado, de los ganglios linfáticos, de los pulmones, de los huesos, o del cerebro o de líquidos corporales.
15. Procedimiento para el descubrimiento de unas sustancias, que se fijan al MACC1, que comprende  
 65 a) poner en contacto de una célula, que expresa el MACC1, con una sustancia candidata,  
 b) detectar la presencia de la sustancia candidata, que se fija al MACC1, y  
 c) determinar si la sustancia candidata se fija también al MACC1.

siendo el MACC1 un polipéptido, tal como se ha definido en la reivindicación 2.

5 16. Procedimiento para la producción de una composición farmacéutica, que comprende las etapas del procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 y la formulación de la sustancia identificada en la etapa c) en una forma farmacéuticamente aceptable, siendo la sustancia un anticuerpo dirigido contra el MACC1.

10 17. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 2, un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 9 para su utilización en el caso del diagnóstico de enfermedades tumorales, siendo la enfermedad tumoral un cáncer de colon, o para el pronóstico de la probabilidad de la metastatización lejana de un cáncer de colon.

15 18. Estuche de diagnóstico, que comprende una composición de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 9, eventualmente en común con unos tampones adecuados y/o unas instrucciones de uso adecuadas.

19. Estuche de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 18 en forma de un estuche de PCR, en particular de RT-PCR, o de ELISA.

Figura 1

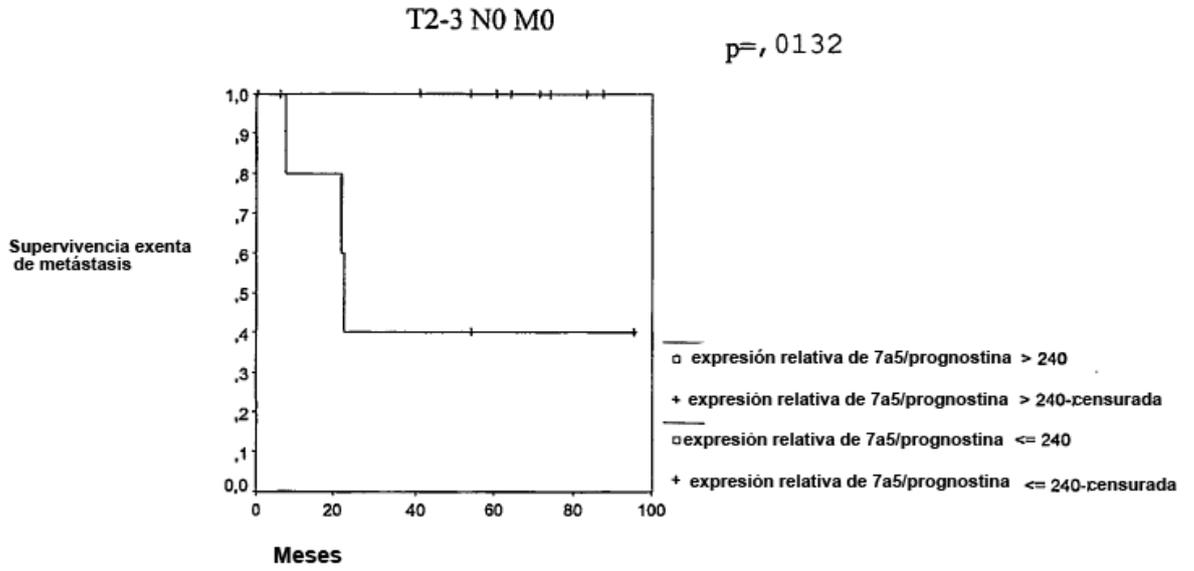


Figura 2

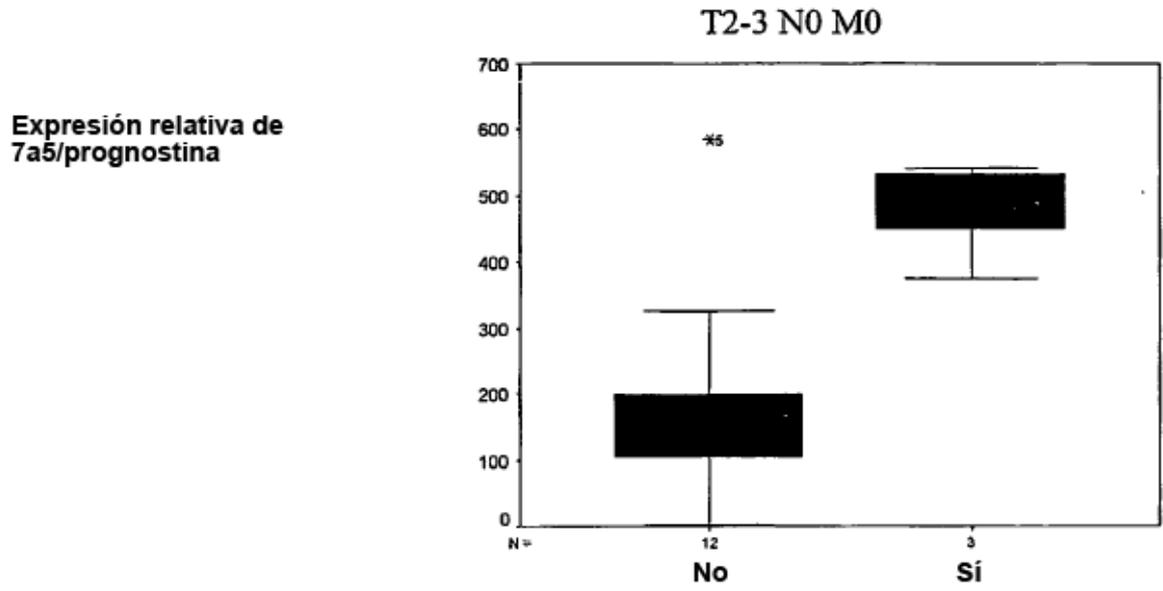


Figura 3

1 ATGCTAATCACTGAAAGAAACATTTTCGGTCAGGAAGAATGCACAAAGTATGCTGAAGCAAATTTGATTGACATGGAAGCTGGAAACTCTCAAAAAGTTGCAATATACAGAAATGC  
M L I T E R K H F R S G R I A Q S M S E A N L I D M E A G K L S K S C N I T E C

**NPF** **NPF**

121 CAGGACCCAGACTTGGCTTCACAAATGGCCCGATGCTTTCACCCTCGTGGTAAATAATGCTTCCAAAGTGCAAAAGCAATTTGGAAATGCACTGCTGCTTTAAACCAATTTTGGATGAC  
Q D P D L L H N W P D A F T L R G N N A S K V A N P F W N Q L S A S N P F L D D

241 ATAACCTCACTAAGAAATAACAGGAAGAGAAATAATATTCATCTTAAAGGAAGATCCTTTCTTTTCTGTAGAGAAATAGAAATGGAAATCTTTTGGATCCTCGGTGATGAACCT  
I T Q L R N N R K R N N I S I L K E D P F L F C R E I E N G N S F D S S G D E L

361 GATGTGATCAGTTACTTAGGCAGACTTCTCAAGAAATCTGGAGATCTAAAGTGTTCAGAACTCTGGACATTTAGACACACAGACATGCCCATCAGAGTATACATAACTCT  
D V H Q L L R R Q T S S R N S G R S K S V S E L L D I L D D T A H A H Q S I H N S

481 GACCAGATCCTACTACAGACTTAGAGTGGCTTAAAAATGATCGGGAGCTTATAAAATGGCTTGGTAAAGTCAACGCCAGCTGGCCCGCTCTGGCTTGGATTTGAATCAAAATAGTCAG  
D Q I L L H D L E W L K N D R E A Y K M A W L S Q R Q L A R S C L D L N T I S Q

601 AGCCCTGGATGGCCACAGCAACTTGGCGAGGTCAACATAGCTTGCAAAAGTAAACCATCAAGGAGGGTCACTACAATACCTGAATCAGACATCACTGTTCATGTGCCCAAGGTCA  
S P G W A Q T Q L A E V T I A C K V N H Q G G S V Q L P E S D I T V H V P Q G H

721 GTGGCTGTGGGAAATCCAGAGGTGTCTCAAGGGCTTCTTGTATCCGCCACATGCTTAAACATGATCTTCTGTGACATGTGAGCCCGTGTGGAAATCATGTTAGGCAACCTC  
V A V G E F Q E V S L R A F L D P P H M L N H D L S C T V S P L E I M L G N L

841 AATACAATGGAAGCCCTTTTGTGAGATGAAAATGGGGCTGAAGTAAAGAGATCCTTTTCCAGCAGTCAAGACAGAAATGGTGTGTTACACAGCTGGGTAAAGAGGCCCTTTT  
N T M E A L L L E N K I G A E V R K D P P S Q V M T E M V C L H S L G K E G P F

961 AAGTTTTAAGCACTGCTACATTTATAAGACACCAATCCAGTCAAGCTAATCAGCTTGGTCAAGTAAATGATCTAGTGGTTGCTGCACAAGCTAAAGCTCTTCCGTACCAGCTGCC  
K V L S N C Y I Y K D T I Q V K L I D L S Q V M Y L V V A A Q A K A L P S P A A

1081 ACCATTTGGGATATATCCACAAAACCACTCAATTTGGAATTTATGGACCCAAATATATCCATCCAGTCTTACTGTGTITTAACAGATTTGTGGACCAATATATGCCAGGACAGCTT  
T I W D Y I H K T T S I G I Y G P K Y I H P S F T V V L T V C G H N Y M P G Q L

1201 ACAATTTCTGAATTAAGAAGGGTGGAAAAACATATCTCCAGTGTGTTCAGCTCTGGGGAGGAGTCAATTTTACTTGACAAGCCACAGATTTAAGTATTTCTATTTTCCCTGT  
T I S D I K K G G K N I S P V V F Q L W G K Q S F L L D K P Q D L S I S I F S C

1321 GATCTGATTTTGAATTAAGCAGAGGAGGAAAGAAAGAAATTAACAAGCAGTGGAGCAGGTGAAGTATCAACAATTTTATTTCTTAGTGAACAGAGAGATG  
D P D F E V K E G E R K E I K Q K Q L E A G E V V H Q Q F L F S L V E H R E M

1441 CACTGTGTGATTTTGTGTTCAAGTGGAGCTCCCAATGGTGAACCTTGCACAGTCTCTATCACTACTCTGATCCACCCCAACCTAAAAGACTCTCGAATCTGCCAGGCTAT  
H L F D F C V Q V E P P N G E P V A Q F S I T T P D P T P N L K R L S N L P G Y

**PXXP**

1561 TTGCAGAAGAAGGAAATCAAGTCTGCTCCTTTATCACCAAAAATCTTGTAAATATCTTACATTCAGATAAAACATTGAATTTAGCAACTATGGGGTAAAGCTGAAGCCAGT  
L Q K K E E I K S A P L S R K I L V K Y P T F Q D K T L N F S N Y G V T L K N V

**SH3**

1681 CTAAACAAAGCAAGATGATTTACTTCTGAAATATTTCAAAAGGACACAAATAGCTCTCCCGGGAAGGTAAGGTAAGCTATTGGTCACTCCAAAGTGAAGAAATGGTATGTAGGA  
L R Q S K I D Y F L E Y F K G D Y I A L L G E G K V K A I G Q S K V K E W Y V G

1801 GTCTCAGAGTAAAGATGGACTTGTACACTGCAAAAATGTCAAGTGAATTTCAAGGAGCAAGTAAATGTTATGTCAGATAGTGTCTTTACAAACAGAAATCTTCTTGAACAGATTGC  
V L R G R I G L V H C K N Y K V I S K E Q V M F M S D S V F T T R N L L E Q I V

**Y**

1921 CTGCCCTTAAAAAATGACTTATATCTACTCAGTTGTATTAACCTTGGTGTGAGAAAAGTTTATGATGGAAAATTTAGCTGATGCTGGGTACTCACATCTGCCCTGGAAGAT  
L P L K K L T Y I Y S V V L T L V S E K V Y D W K V L A D V L G Y S H L S L E D

**Y**

2041 TTGATCAAAATCAAGCAGCAAAAGATCAGAGAAATTTCTTATGTTATAAAGAGTTAAAGGAGATGGCCACAGAGAGAAATACAGGAGATTTCTGTATGAACATATTGTGGCT  
F D Q I Q A D K E S E K V S Y V I K K L K E D C H T E R N T R K F L Y E L I V A

2161 CTCTGAAAATGGATGGCAAGATTTAGTCGCACGCTCTCATCAAGAGCTGCTGTTCTGACTTCAGCTGTCAAGCTTGGAAAAGCTGGAGGAACTAGCTGAAAAGTTAGTACGACTC  
L L K N D C Q E L V A R L I Q E A A V L T S A V K L G K G W R E L A E K L V R L

**Y**

2281 ACAAGCAACAAATGGAGCATATGAAATTCCTCATCGAGGAACACTGGAGATGTTGCTGTTGAGATGATGGAAAACCTGCTATGATTTCTGTATACCTGGAGTCTCACATGGA  
T K Q Q M E A Y E I P H R G N T G D V A V E M H W K P A Y D F L Y T W S A H Y G

2401 AATAACTACAGAGATGTGTACAAGACCTTCACTCAGCTTTGACAGAAATGAAAACCTGTGACTAAACCTGGAGAGAAATTAAGTGGATTTAATACTAGTAAATCTTTGGAGGTT  
N N Y R D V L Q D L Q S A L D R M K N P V T K H W R E L T G V L I L V N S L E V

2521 TTGAGATTAAGTCAATCTCCACTTCTGAGGAAGTATAG  
L R V T A F S T S E E V \*

Figura 4

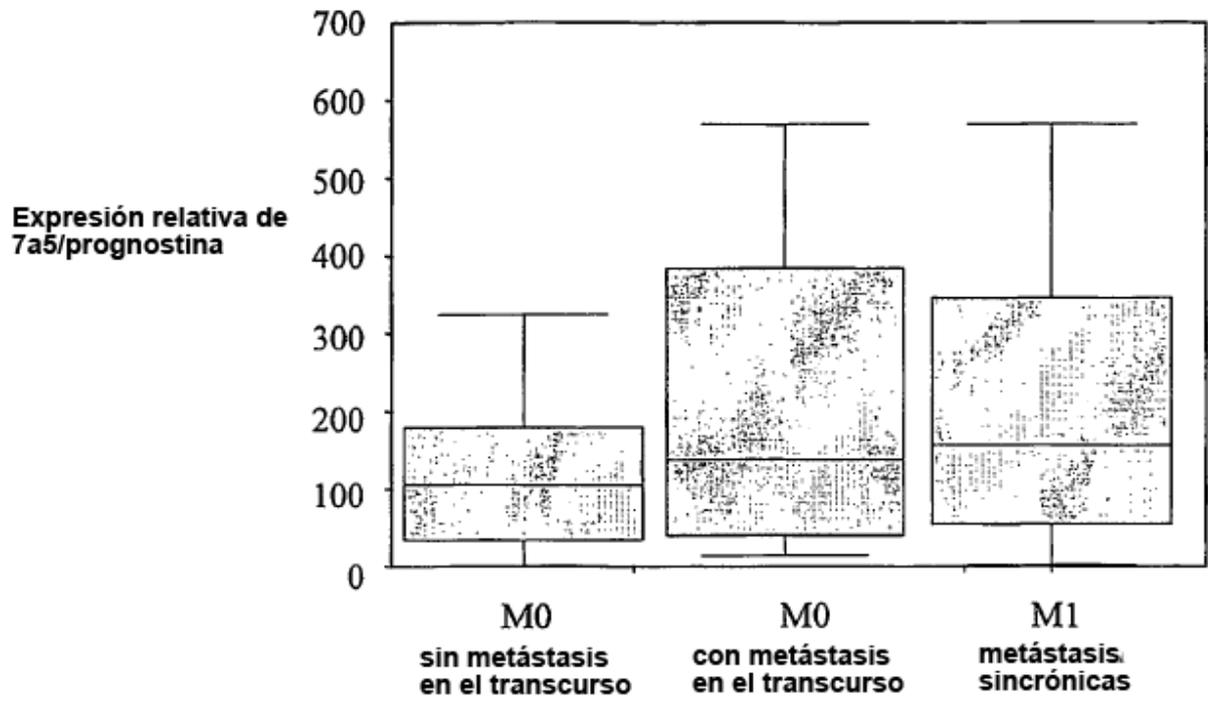


Fig. 5

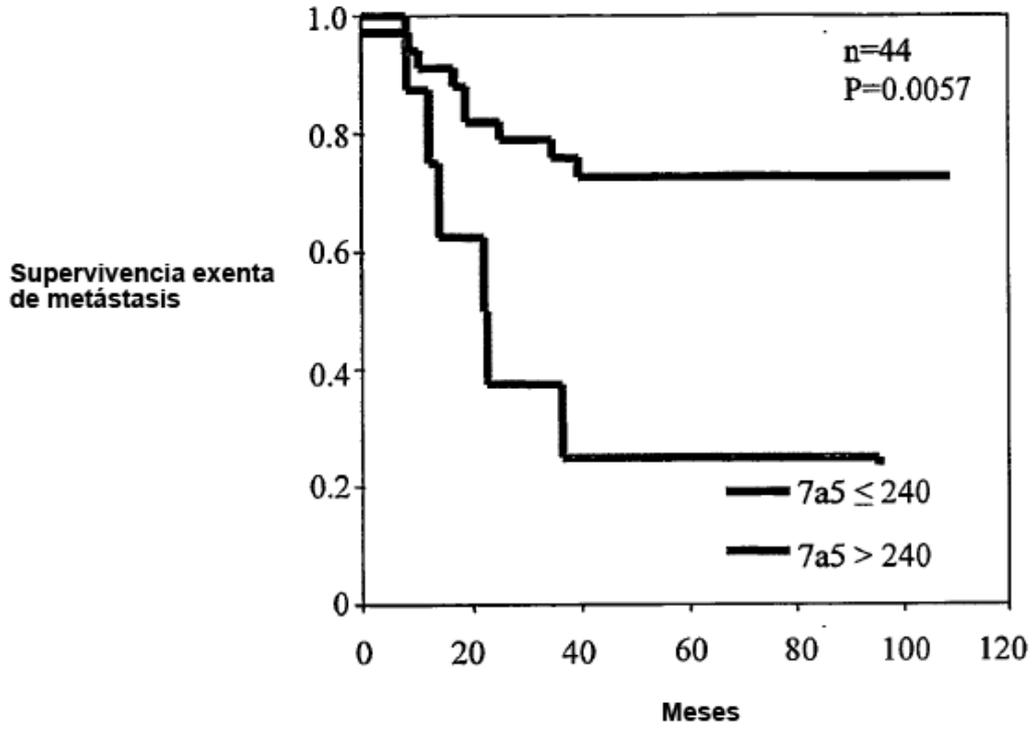
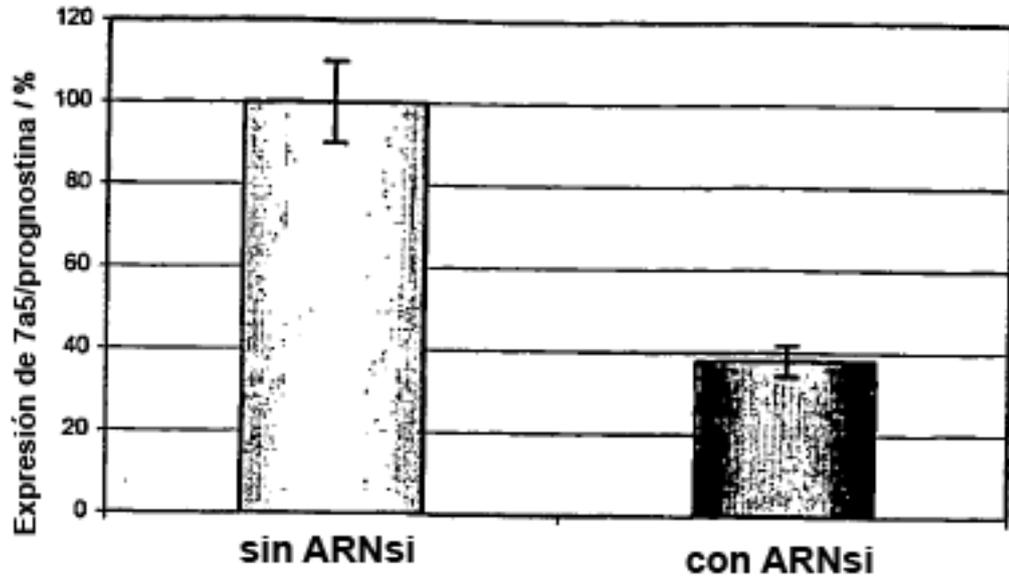


Figura 6

**A**



**B**

