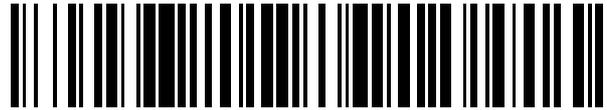


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 381**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7034 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2001 E 10163844 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2230320**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento e imágenes de células de cáncer estomacales y de esófago**

30 Prioridad:

27.03.2000 US 192229 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2015

73 Titular/es:

**THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (100.0%)
Office of Technology Transfer 1020 Locust Street,
Room M6
Philadelphia, Pennsylvania 19107-6799, US**

72 Inventor/es:

**WALDMAN, SCOTT A.;
PARK, JASON y
SCHULZ, STEPHANIE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 548 381 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).

Composiciones para el tratamiento e imágenes de células de cáncer estomacales y de esófago**Descripción****5 ÁREA DEL INVENTO**

10 **[0001]** Este invento se relaciona con métodos de diagnóstico in vivo para detectar cáncer primario y metastásico estomacal y del esófago, y los equipos y reactivos para realizar aquellos métodos. Este invento se relaciona a los compuestos y métodos para la toma de imágenes in vivo de tumores primarios y metastásicos del estómago y del esófago.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

15 **[0002]** Existe una necesidad de reactivos, equipos y métodos para detectar, diagnosticar y monitorear a individuos con cáncer que se origina en el canal alimentario, particularmente cáncer primario y metastásico estomacal y del esófago. Existe una necesidad de reactivos, equipos y métodos para identificar y confirmar que un cáncer de origen desconocido se esté originando en el canal alimentario y para analizar tejidos y muestras de cáncer para identificar y confirmar que el cáncer que se origina en el canal alimentario y para determinar el nivel de migración de aquellas células cancerígenas. Existe una necesidad de composiciones que pueden usar como objetivo específicamente a las células cancerígenas del estómago y del esófago. Existe una necesidad de reactivos para la toma de imágenes que pueden enlazar específicamente a las células cancerígenas estomacales y del esófago. Existe una necesidad para métodos mejorados para la toma de imágenes de células cancerígenas estomacales y del esófago. Existe una necesidad para reactivos terapéuticos que puedan enlazarse específicamente a células cancerígenas estomacales y del esófago. Existe una necesidad para métodos mejorados para el tratamiento de individuos que se sospecha sufren de cáncer primario y/o metastásico estomacal o del esófago. Existe una necesidad para una composición tipo vacuna para tratar el cáncer estomacal y del esófago. Existe una necesidad para una composición tipo vacuna para tratar y prevenir el cáncer estomacal y del esófago. Existe una necesidad para reactivos terapéuticos que pueden entregar específicamente las terapias genéticas, los compuestos antisentido y otros medicamentos a las células cancerígenas estomacales y del esófago.

30 RESUMEN DEL INVENTO

35 **[0003]** Esta descripción es relacionada a métodos in vitro para determinar si un individuo tiene o no tiene cáncer primario y metastásico estomacal y del esófago. También se presentan métodos in vitro para examinar muestras de tejidos no colorrectales y fluidos corporales de un individuo para determinar si es que GCC, que es expresado por las células normales del colon y por células de tumores colorrectales, estomacales y del esófago, está siendo expresado por las células en muestras que no son del colon. La presencia de la proteína GCC o de la transcripción del gen GCC en muestras que no son de la senda del colon es una indicación de la expresión de GCC y es evidencia de que un individuo puede estar padeciendo de cáncer diseminado del colon o cáncer primario o metastásico del estómago y/o del esófago. En pacientes que se sospecha padecen de cáncer colorrectal, la presencia de la proteína GCC o de la transcripción genética GCC en muestras que están afuera de la senda colorrectal apoya la conclusión de que el individuo está padeciendo un cáncer metastásico colorrectal. El diagnóstico de cáncer metastásico colorrectal puede hacerse o confirmarse. En pacientes que se sospecha del padecimiento de cáncer estomacal o del esófago, la presencia de la proteína GCC o de la transcripción genética de GCC en muestras que provienen de afuera del sendero colorrectal apoya la conclusión que el individuo parece de cáncer primario y/o metastásico estomacal o del esófago. La diagnosis de cáncer primario y/o metastásico estomacal o del esófago puede ser hecha o confirmada.

50 **[0004]** También se presentan métodos in vitro para determinar si es que células de tumores que se sospecha que son de cáncer estomacal o del esófago son de origen estomacal o del esófago. Adicionalmente se presenta métodos in vitro para diagnosticar si es que un individuo que se sospecha que padece de cáncer estomacal o del esófago está padeciendo de cáncer estomacal o del esófago. También se presentan métodos in vitro para examinar muestras de tumores de un individuo para determinar si es que la proteína GCC, que es expresada por las células de tumores colorrectales, estomacales o del esófago, está siendo expresada por las células del tumor. La presencia de una proteína GCC o de la transcripción genética de GCC en una muestra de un paciente que se sospecha que tiene cáncer estomacal o del esófago es una indicación de la expresión de GCC y es evidencia de que el individuo podría estar padeciendo cáncer estomacal o del esófago. En tumores de los cuales se sospecha que son tumores estomacales o del esófago, la presencia de una proteína GCC o la transcripción genética de GCC apoya la conclusión de que los tumores son de cáncer estomacal o del esófago y la diagnosis de cáncer estomacal o del esófago.

[0005] También se presentan equipos in vitro para practicar los métodos del invento y reactivos y composiciones útiles como componentes de aquellos equipos in vitro del invento.

65 **[0006]** También se presenta un método para tomar imágenes de tumores metastásicos estomacales y del esófago y métodos para tratar a un individuo que se sospecha padece de tumores primarios y metastásicos estomacales y del

esófago que comprende los pasos para administrar a aquel individuo composiciones farmacéuticas de acuerdo al invento, donde las composiciones o compuestos conjugados están presentes en un monto efectivo para su uso terapéutico o diagnóstico en humanos que sufren de tumores primarios y/o metastásicos estomacales o del esófago.

5 [0007] También se presenta un método para entregar un reactivo a células de tumores estomacales y del esófago primarias y metastásica que comprende los pasos para administrar a un individuo que tiene tumores primarios y/o metastásicos estomacales o del esófago, una composición farmacéutica que comprende a un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, y una composición que no ha sido conjugada que comprende un liposoma que incluye ligandos GCC en su superficie y un componente activo allí encapsulado.

10 [0008] También se presentan células desactivadas de tumores estomacales o del esófago que tienen una proteína que contiene por lo menos un epítipo de una proteína GCC; y las vacunas que la contienen. En algunas secciones, las partículas o células eliminadas o desactivadas comprende una proteína GCC. En algunas secciones, las células o partículas eliminadas o desactivadas son haptenizadas.

15 [0009] También se presentan métodos para tratar a individuos que sufren de cáncer estomacal o del esófago y los métodos de tratamiento para individuos que son susceptibles al cáncer estomacal o del esófago. El método suministra la administración a aquellos individuos de un monto efectivo de aquellas vacunas. El invento se relaciona además al uso de aquellas vacunas como terapias inmunológicas.

20 DESCRIPCIÓN DE LAS SECCIONES IMPORTANTES

Definiciones

25 [0010] Tal como se utiliza aquí, el término "GCC" tiene el propósito de referirse a la proteína celular expresada por células colorrectales normales, así como células cancerígenas metastásicas colorrectales, estomacales y del esófago. En individuos normales, la GCC se encuentra exclusivamente en células del intestino, en particular en células del duodeno, del intestino delgado (yeyuno y el íleon), el intestino grueso, el colon (el ciego, el colon ascendente, el colon transversal, el colon descendente y el colon sigmoide) y el recto.

30 [0011] Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento funcional" tal como se utiliza en el término "fragmento funcional de una transcripción genética GCC" tiene el propósito de referirse a fragmentos de transcripciones genéticas de GCC que son funcionales con respecto a las moléculas de ácidos nucleicos con secuencias completas. Por ejemplo, un fragmento funcional podría ser útil como una sonda de oligonucleótidos o de ácidos nucleicos, un iniciador, un oligonucleótido antisentido o una molécula de ácido nucleico o una secuencia de codificación. La secuencia de nucleótidos que codifican a una proteína GCC humana son presentados en F.J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266:17912-17918.

40 [0012] Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento funcional" es utilizado en el término "fragmento funcional de una proteína GCC" significa fragmentos de la proteína GCC que funcionan de la misma forma que la proteína GCC con secuencias completas. Por ejemplo, un fragmento inmunógenamente funcional de una proteína GCC comprende un epítipo reconocido por un anticuerpo anti-GCC. Un fragmento funcional que enlaza a ligandos de GCC comprende una secuencia que forma una estructura que puede enlazarse a un ligando que reconoce y se enlaza a una proteína GCC.

45 [0013] Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo reconocido por un anticuerpo proteínico anti-GCC" se refiere a aquellos epítipos reconocidos específicamente por un anticuerpo proteínico anti-GCC.

50 [0014] Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos, completos e intactos y a fragmentos Fab y a sus fragmentos F(ab)₂ correspondientes. Anticuerpos completos e intactos incluyen anticuerpos monoclonales tales como los anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.

55 [0015] Tal como se utiliza aquí, el término "ligando GCC" se refiere a compuestos que se enlazan específicamente a una proteína GCC. Los anticuerpos que se enlazan a GCC son ligandos GCC. Un ligando GCC podría ser una proteína, un péptido o un no péptido.

60 [0016] Tal como se utiliza aquí, el término "reactivo" se refiere a compuestos que son reactivos terapéuticos o reactivos de tomas de imágenes.

[0017] Tal como se utiliza aquí, el término "radio estable" se refiere a compuestos que no experimentan un declive radiactivo; es decir, compuestos que no son radiactivos.

65 [0018] Tal como se utiliza aquí, el término "activo terapéutico" se refiere a reactivos quimioterapéuticos, toxinas, elementos radio terapéuticos o radio sensibilizadores.

- [0019] Tal como se utiliza aquí, el término “quimioterapéutico” se refiere a compuestos que, cuando se contactan y/o se incorporan a una célula, producen un efecto en la célula incluyendo la muerte de la célula, la inhibición de la división de la célula o inducir su diferenciación.
- 5 [0020] Tal como se utiliza aquí, el término “toxinas” se refiere a compuestos que, cuando se contactan con, y/o se incorporan a una célula, producen la muerte de esa célula.
- [0021] Tal como se utiliza aquí, el término “radioterapéutico” se refiere a radionúclidos que cuando se contactan con, y/o se incorporan a una célula, producen la muerte de la célula.
- 10 [0022] Tal como se utiliza aquí, el término “reactivo de dirección” se refiere a compuestos que pueden estar enlazados por, y/o reaccionar con otros compuestos. Los reactivos de dirección pueden ser utilizados para entregar anticuerpos o reactivos quimioterapéuticos, toxinas, enzimas, elementos radio - terapéuticos o para tomar imágenes a células que tienen reactivos de dirección asociados con ellas y/o para convertir o transformar de otra forma o mejorar a reactivos que se han administrado en conjunto. Un reactivo de dirección podría incluir una partícula que constituye un primer reactivo que está localizado en la célula que cuando se contacta con un 2º reactivo se convierte en un 3er reactivo que tiene una actividad deseada o causa la conversión del 2º reactivo en un reactivo que tiene una actividad deseada. El resultado es que el reactivo localizado facilita la exposición de un reactivo con una actividad deseada a la célula del cáncer.
- 15 [0023] Tal como se utiliza aquí, el término “reactivo radio sensibilizador” se refiere a reactivos que incrementan la susceptibilidad de las células a los efectos dañinos de la radiación de ionización. Un reactivo radio sensibilizador permite dosis más bajas de radiación para que sean administradas y suministrar una dosis terapéuticamente efectiva.
- 20 [0024] Tal como se utiliza aquí, el término “reactivo para tomar imágenes” se refiere a compuestos que pueden ser detectados.
- [0025] Tal como se utiliza aquí, el término “partícula enlazadora de GCC” se refiere a la porción de un compuesto conjugado que constituye un ligando GCC.
- 25 [0026] Tal como se utiliza aquí, el término “porción activa” se refiere a la parte de un compuesto conjugado que constituye un reactivo.
- [0027] Tal como se utilizan aquí, los términos “compuesto conjugado” y “composición conjugada” son utilizados intercambiamente y se refieren a un compuesto que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa que es capaz de enlazarse a la GCC. Los compuestos conjugados, de acuerdo a este invento, comprender una porción que constituye un ligando GCC y una porción que constituye un reactivo. Por lo tanto, los compuestos conjugados, de acuerdo a este invento, son capaces de enlazarse específicamente de a la GCC e incluyen una porción que es un reactivo terapéutico para tomar imágenes. Las composiciones conjugadas pueden incluir reticuladoras y/o moléculas que sirven como espaciadores entre las porciones.
- 30 [0028] Tal como se utiliza aquí, los términos “reticulador”, “reactivo reticulador”, “reactivo conjugador”, “reactivo de acoplamiento”, “reactivo de condensación” y “reticulador disfuncional” son utilizados intercambiamente y se refieren a grupos moleculares que son utilizados para adherir al ligando GCC y al reactivo para formar un compuesto conjugado.
- 35 [0029] Tal como se utiliza aquí, el término “cáncer colorrectal” tiene el propósito de incluir la definición médica correctamente aceptada que define al cáncer colorrectal como una condición médica caracterizada por células cancerígenas de la senda intestinal debajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, el colon ascendente, el colon transversal, el colon descendente y el colon sigmoide y el recto). Adicionalmente, tal como se utiliza aquí, el término “cáncer colorrectal” tiene el propósito de incluir condiciones médicas que son caracterizadas por las células cancerígenas del duodeno y del intestino delgado (el yeyuno y el íleon). La definición de cáncer colorrectal, tal como se utiliza aquí, es más amplio que la definición médica común pero se hace de esa forma puesto que las células del duodeno y del intestino delgado también contienen GCC.
- 40 [0030] Tal como se utiliza aquí, el término “cáncer estomacal” tiene el propósito de incluir la definición médica aceptada que define a cáncer estomacal como una condición médica caracterizada por células cancerígenas del estómago.
- 45 [0031] Tal como se utiliza aquí, el término “cáncer del esófago” tiene el propósito de incluir la definición médica bien aceptada que define a cáncer del esófago como una condición médica caracterizada por células cancerígenas del esófago.
- 50 [0032] Tal como se utiliza aquí, el término “metástasis” tiene el propósito de referirse al proceso en el cual las células cancerígenas que se originan en un órgano o parte del cuerpo se reubican en otra parte del cuerpo y continúan
- 55
- 60
- 65

replicándose. Las células que han sido producto de metástasis forman subsiguientemente tumores que pueden experimentar otra vez más metástasis. Metástasis, por lo tanto, se refiere al espesamiento del cáncer de una parte del cuerpo donde ocurre originalmente que se transmite a otras partes del cuerpo.

5 **[0033]** Tal como se utiliza aquí, el término “células cancerígenas colorrectales producto de metástasis” se refiere a células cancerígenas colorrectales que han experimentado metástasis. Las células cancerígenas colorrectales que han experimentado metástasis en una parte del cuerpo diferente al duodeno, intestino delgado (el yeyuno y el íleon), el intestino grueso (colon), incluyendo el ciego, el colon ascendente, el colon transverso, el colon descendente y el colon sigmoide y el recto.

10 **[0034]** Tal como se utiliza aquí, el término “células cancerígenas del estómago que han experimentado metástasis” se refiere a células cancerígenas del estómago que han experimentado metástasis. Las células cancerígenas del estómago que han experimentado metástasis ubicadas en una parte del cuerpo que no sea del estómago.

15 **[0035]** Tal como se utiliza aquí, el término “células cancerígenas del esófago que han experimentado metástasis” se refiere a células cancerígenas del esófago que han experimentado metástasis. Las células cancerígenas del esófago que han experimentado metástasis ubicadas en una parte del cuerpo que no sea el esófago.

20 **[0036]** Tal como se utiliza aquí, el término “muestra no colorrectal” y “muestra extra intestinal” son utilizadas intercambiamente y se refieren a una muestra de tejido o fluido corporal de una fuente que no sea el tejido colorrectal. En algunas secciones importantes, la muestra no colorrectal es una muestra de tejidos tales como ganglios linfáticos. En algunas secciones importantes, la muestra no colorrectal es una muestra de un tejido extra intestinal que es un adenocarcinoma de un origen no confirmado. En algunas secciones importantes, la muestra no colorrectal es una muestra sanguínea.

25 **[0037]** Tal como se utiliza aquí, “un individuo que padece de un adenocarcinoma de origen no confirmado” tiene el propósito de referirse a un individuo que tiene un tumor en el cual el origen no ha sido identificado definitivamente.

30 **[0038]** Tal como se utiliza aquí, “un individuo que se sospecha que es susceptible al cáncer estomacal o del esófago” se refiere a un individuo que tiene un riesgo particular de desarrollar cáncer estomacal o del esófago. Ejemplos de individuos que tienen un riesgo particular de desarrollar cáncer estomacal o del esófago son aquellos cuya historia médica familiar indica una incidencia que supera al promedio de cáncer del estómago o del esófago entre miembros familiares y/o aquellos que ya han desarrollado cáncer estomacal o del esófago y que han sido tratados efectivamente y quienes, por lo tanto, enfrentan un riesgo de relapso y de recurrencia.

35 **[0039]** Tal como se utiliza en este documento, el término “composición antisentido” y “moléculas antisentido” son utilizadas intercambiamente y se refieren a compuestos que regulan la transcripción o la traducción por medio de hibridación de ADN o ARN e inhiben y/o evitan que se lleve a cabo la transcripción o la traducción. Las moléculas antisentido incluyen moléculas de ácidos nucleicos y sus derivados y análogos. Moléculas antisentido hibridan al ADN o al ARN en la misma forma que las secuencias de nucleótidos complementarias lo hacen sin importar si las moléculas antisentido son moléculas de ácidos nucleicos o sus derivados o análogos. Las moléculas antisentido podrían inhibir o evitar la transcripción o traducción de genes cuyas expresiones están vinculadas al cáncer.

40 **[0040]** Tal como se utiliza aquí, el término “inmunógeno GCC” se refiere a la proteína GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que tiene el mismo producto o uno de sus productos hapnetizados, células y partículas que muestran lo menos un epítipo GCC, y células hapnetizadas y partículas hapnetizadas que muestran por lo menos un epítipo GCC.

45 **[0041]** Tal como se utiliza aquí, el término “vector de expresión recombinante” se refiere a un plásmido, un fago, una partícula viral u otro vector que, cuando se introduce en un anfitrión apropiado, contiene los elementos genéticos necesarios para dirigir la expresión de la secuencia de codificación que codifica a la proteína. La secuencia de codificación está vinculada operacionalmente a las secuencias necesarias regulatorias. Los vectores de expresión son bien conocidos y están disponibles fácilmente. Ejemplos de vectores de expresión incluyen plásmidos, fagos, vectores virales y otras moléculas de ácidos nucleicos o moléculas de ácidos nucleicos que contienen vehículos útiles para transformar a células anfitrionas y facilitar la expresión de la secuencia de codificación.

50 **[0042]** Tal como se utiliza aquí, el término “transcripción ilegítima” se refiere a la expresión de bajo nivel o de fondo de los genes específicos de tejidos en las células de otros tejidos. El fenómeno de transcripción ilegítima, por lo tanto, suministra copias de ARNm para una transcripción específica de tejidos en otros tejidos. Si las técnicas de detección utilizadas para detectar expresiones genéticas son lo suficientemente sensibles para detectar una transcripción ilegítima, el nivel de expresión de la transcripción en las muestras negativas debido a la transcripción ilegítima deben discontinuarse utilizando ensayos de control y/o cuantitativos y/u otros medios para eliminar la incidencia de positivos falsos debido a transcripciones ilegítimas. Alternamente, la detección de evidencia de la expresión genética GCC en una muestra se logra sin detectar transcripciones genéticas GCC presentes debido a restricciones ilegítimas. Esto se logra usando técnicas que no son lo suficientemente sensibles para detectar la transcripción genética GCC debido a una transcripción ilegítima de fondo que está presente.

5 **[0043]** La patente de Estados Unidos número 5,518,888, emitida el 21 de mayo de 1996, la patente de Estados Unidos número 5,601,990 emitida el 11 de febrero de 1997, la patente de Estados Unidos número 6,060,037 emitida el 26 de abril de 2000, la patente de Estados Unidos número 5,962,220 emitida el 5 de octubre de 1999, la patente de Estados Unidos número 5,879,656 emitida el 9 de marzo de 1999, relacionadas a la dirección hacia receptores ST para tratar, tomar imágenes, detectar y vacunar en contra del cáncer colorrectal que ha experimentado metástasis. Ahora se ha descubierto que las células cancerígenas estomacales y del esófago metastásicas expresan receptores ST (GCC). Asimismo, las composiciones y métodos descritos en las patentes y aplicaciones que se acaban de listar pueden ser utilizadas para tratar, tomar imágenes, detectar y vacunar en contra del cáncer estomacal y del esófago primario y metastásico. Este invento adapta los inventos anteriores puesto que se relaciona al cáncer colorrectal que experimentado metástasis para tratar, tomar imágenes, detectar y vacunar en contra del cáncer estomacal y del esófago primario y metastásico.

15 **GCC**

20 **[0044]** Los carcinomas derivados de las células colorrectales, del estómago o del esófago expresan GCC. La expresión de GCC por parte de aquellos tumores permite a esta proteína y a su ARNm el servir como un biomarcador específico para la presencia de células cancerígenas en tejidos extra intestinales y en la sangre. En efecto, esta característica permite la detección de ARNm de GCC por medio de análisis RT-PCR utilizado como una prueba diagnóstica para pacientes con cáncer colorrectal, estomacal o del esófago y hacer seguimiento a pacientes después de la cirugía en busca de evidencia de una enfermedad recurrente en su sangre, así como para detectar cánceres colorrectales, estomacales y del esófago. Además, la GCC puede ser usada como objetivo con un ligando conjugado a un reactivo para entregar al reactivo a las células del tumor in vivo.

25 **[0045]** La patente de Estados Unidos número 5,518,888 emitida el 21 de mayo de 1996 para Waldman, la aplicación PCT PCT/US94/12232 completada el 26 de octubre de 1994, la aplicación de Estados Unidos con el número de serie 08/467,920 completada el 6 de junio de 1995, y la aplicación de Estados Unidos con el número de serie 08/583,447 completada el 5 de enero de 1996, informan que los tumores colorrectales que han experimentado metástasis pueden ser utilizados como objetivos para la entrega de compuestos activos por parte de receptores ST de dirección (también referidos, como guanilina ciclasa C o GCC. La presencia de receptores ST en células afuera del sendero intestinal como un marcador para cáncer colorrectal permite la examinación, identificación y el tratamiento de individuos con tumores colorrectales que han experimentado metástasis. Los receptores ST también pueden ser utilizados para dirigir la entrega de compuestos terapéuticos genéticos y de antisentido a células colorrectales.

35 **[0046]** La patente de Estados Unidos número 5,601,990 emitida el 11 de febrero de 1997 para Waldman, la aplicación PCT PCT/US94/12232 completada el 26 de octubre de 1994 y la aplicación PCT PCT/US97/07467 completada el 2 de mayo de 1997, presentan que la detección de evidencia de expresión de receptores ST en muestras de tejidos y en fluidos corporales provenientes de afuera del sendero intestinal indican un cáncer colorrectal con metástasis.

40 **[0047]** La aplicación PCT PCT/US97/07565 completada el 2 de mayo de 1997, presenta que inmunógenos con epítopes que pueden ser utilizados como objetivos por anticuerpos que reaccionan con receptores ST pueden ser utilizados en composiciones de vacunas útiles como composiciones cancerígenas colorrectales profilácticas y terapéuticas anti metástasis.

45 **[0048]** Se ha descubierto que, adicionalmente a células normales del colon, las células de carcinoma con metástasis del colon, estomacales y del esófago también expresan GCC. Las células normales estomacales y del esófago no expresan GCC. Por lo tanto, este invento suministra el uso de GCC como un marcador de diagnosis molecular específico para la diagnosis, exámenes y vigilancia post operativa de pacientes con cáncer estomacal y del esófago primario y con metástasis.

50 **[0049]** La detección de la expresión de GCC utilizando técnicas moleculares, incluyendo, pero sin limitarse a, RT-PCR, puede utilizarse para diagnosticar y examinar pacientes, hacer seguimiento del desarrollo de la recurrencia después de la cirugía y/o remisión, y, potencialmente, examinar gente normal en busca del desarrollo de cáncer colorrectal, estomacal o del esófago.

55 **[0050]** La GCC es única en que es expresada únicamente en células intestinales normales. Las células de la mucosa que revisten al intestino se mantienen juntas por uniones apretadas que forman una barrera en contra del paso de los contenidos intestinales a la corriente sanguínea y los componentes de la corriente sanguínea al lumen intestinal. Por lo tanto, la ubicación apical de las células que expresan GCC resulta en el aislamiento de aquellas células del sistema circulatorio de tal forma que se puede considerar que están separadas del resto del cuerpo; en esencia "afuera" del cuerpo. Por lo tanto, el resto del cuerpo es considerado "afuera" de la senda intestinal. Composiciones administradas "afuera" de la senda intestinal se mantienen aparte y segregadas de las únicas células que expresan normalmente a GCC. En contraste, las muestras de tejidos tomadas de tejidos afuera de la senda intestinal normalmente no contienen células que expresan GCC.

5 **[0051]** En individuos que padecen de cáncer colorrectal, las células cancerígenas a menudo se derivan de células que producen y que muestran el GCC y estas células cancerígenas continúan produciendo GCC. Se ha observado que el GCC se expresa por las células cancerígenas colorrectales. Asimismo, GCC es expresado por células cancerígenas estomacales y del esófago.

10 **[0052]** La expresión de GCC por células de tumores colorrectales suministra un objetivo detectable para exámenes, pruebas y monitoreo in vitro, así como un objetivo para la entrega in vivo de composiciones conjugadas que comprenden reactivos para la toma de imágenes y tratamientos. Las GCC también pueden servir como blanco para vacunas que podrían ser utilizadas para proteger en contra del cáncer colorrectal con metástasis o para tratar a individuos con cáncer colorrectal con metástasis.

15 **[0053]** La expresión de GCC por células de tumores estomacales y del esófago suministran un objetivo detectable para exámenes, monitoreos y pruebas in vitro así como un blanco para la entrega in vivo de composiciones conjugadas que comprenden reactivos para la toma de imágenes y tratamientos. Las GCC también sirven como blancos para vacunas que pueden ser utilizados para proteger en contra de cánceres estomacales y del esófago primarios y metastásicos o para el tratamiento de individuos con cánceres estomacales y del esófago primarios y metastásicos.

20 **Diagnosis In vitro**

25 **[0054]** De acuerdo a ciertas secciones del invento, las composiciones son provistas para examinar, diagnosticar y analizar pacientes y muestras de pacientes para detectar evidencia de expresiones GCC por células que están afuera del sendero intestinal donde la expresión de GCC podría sugerir un cáncer estomacal o del esófago primario o metastásico. En pacientes que se sospecha que tienen cáncer estomacal o del esófago primario o metastásico, la evidencia de expresiones GCC por células que están afuera de la senda intestinal es una indicación de cáncer estomacal o del esófago primario o metastásico y puede ser utilizado para la diagnosis, monitoreo y pruebas de aquellos pacientes.

30 **[0055]** También se presentan métodos, composiciones y equipos utilizados en la examinación y análisis in vitro de pacientes y muestras de pacientes para detectar evidencia de expresiones GCC por células de tumores afuera de la senda intestinal donde la presencia de células que expresan GCC sugieren o confirman que un tumor es de origen de cáncer colorrectal o estomacal o del esófago. En un aspecto adicional del invento, se suministran composiciones que son útiles para visualizar células cancerígenas estomacales o del esófago primarias o metastásicas.

35 **[0056]** Composiciones, métodos y equipos de exámenes y diagnosis in vitro pueden ser utilizados para monitorear a individuos que se ubican en un grupo de riesgo alto para cáncer de estómago o del esófago tales como aquellas personas que han sido diagnosticadas con una enfermedad localizada y/o una enfermedad con metástasis y/o aquellos que están vinculados genéticamente a la enfermedad. Composiciones, métodos y equipos para la examinación y el diagnóstico in vitro pueden ser utilizados para monitorear a individuos que están experimentando y/o han sido tratados para el cáncer estomacal o del esófago para determinar si el cáncer ha experimentado metástasis. Las composiciones, métodos y equipos para la examinación y diagnóstico in vitro pueden ser utilizados en el monitoreo de individuos que de otra forma son susceptibles, es decir, individuos a quienes se ha identificado como predispuestos genéticamente por medio de una examinación genética y/o historial médico familiar. Avances en la comprensión genética y los desarrollos tecnológicos así como la epidemiología permiten la determinación de una evaluación de probabilidad y de riesgo para un individuo para desarrollar cáncer estomacal o del esófago. Utilizando los historiales de salud familiar y/o exámenes genéticos, es posible el estimar la probabilidad para que un individuo en particular pueda desarrollar ciertos tipos de cáncer incluyendo el cáncer estomacal o del esófago. Aquellos individuos que han sido identificados como predispuestos para desarrollar una forma particular de cáncer pueden ser monitoreados o examinados para detectar evidencia de cáncer estomacal o del esófago. Cuando se descubre tal evidencia, un tratamiento temprano puede tomarse para combatir a la enfermedad. Asimismo, individuos que tienen el riesgo de desarrollar cáncer estomacal o del esófago podrían ser identificados y se podrían aislar muestras de aquellos individuos. Es particularmente útil para monitorear a individuos que han sido identificados por tener historiales médicos familiares que incluyen parientes que han padecido de cáncer estomacal o del esófago. Asimismo, es particularmente útil para monitorear a individuos que han sido diagnosticados con cáncer estomacal o del esófago y, particularmente aquellos que han sido tratados y a quienes se les removió tumores y/o que están experimentando de otra forma una remisión incluyendo aquellos que han sido tratados para cáncer estomacal o del esófago.

60 **[0057]** Las composiciones, métodos y equipos para la examinación y diagnosis in vitro pueden ser utilizados para el análisis de tumores. La expresión de GCC es un marcador para el tipo celular y sugiere el origen de adenocarcinoma de origen no confirmado que se sospecha que son de origen gástrico o del esófago pudiendo ser tumores estomacales o del esófago. La detección de la expresión GCC también puede ser utilizada para asistir en una diagnosis inicial de cáncer estomacal o del esófago o para confirmar a aquellos diagnósticos. Los tumores que se creen que son de origen estomacal o del esófago pueden confirmarse como tales utilizando las composiciones, métodos y equipos aquí descritos.

- 5 **[0058]** Las composiciones, equipos y métodos para la examinación y diagnóstico in vitro pueden ser utilizados para analizar muestras de tejidos del estómago o del esófago para identificar cánceres estomacales o del esófago primarios.
- 10 **[0059]** De acuerdo al invento, se presentan compuestos que enlazan a la transcripción o a la proteína genética de GCC. Tejidos normales en el cuerpo no tienen transcripciones o proteínas GCC excepto las células de la senda intestinal. La expresión de GCC es un marcador para tipos celulares y es útil en la identificación de cáncer estomacal o del esófago en muestras extra intestinales.
- 15 **[0060]** Muestras de tejidos y de fluidos no colorrectales o muestras de tumores pueden ser examinadas para identificar la presencia o la ausencia de la proteína GCC. Técnicas tales como ensayos ELISA y Western blots pueden realizarse para determinar si existe GCC en una muestra.
- 20 **[0061]** Muestras de tejidos y fluidos no colorrectales o muestras de tumores pueden examinarse para identificar si se está expresando GCC en células afuera de la senda colorrectal al detectar la presencia o ausencia de transcripciones genéticas GCC. La presencia de transcripciones genéticas GCC o cDNA generado a partir de estas puede determinarse utilizando técnicas tales como la amplificación PCR, tecnología de oligonucleótidos ramificados, Northern Blots (ARNm), Southern Blots (cADN), o hibridación de oligonucleótidos. Células
- 25 **[0062]** Las células de muestras de tejidos no colorrectales o muestras de tumores pueden examinarse para identificar la presencia o ausencia de proteínas GCC. Técnicas tales como blots de inmunohistoquímica pueden realizarse en secciones de tejidos para determinar si existen GCC en una muestra.
- 30 **[0063]** Las células de muestras de tejidos no colorrectales o muestras de tumores pueden examinarse para determinar si se está expresando GCC en células afuera de la senda colorrectal al detectar la presencia o ausencia de la transcripción genética de GCC. La presencia de la transcripción genética de GCC o el cDNA generado a partir de estas en células de secciones de tejidos puede determinarse utilizando técnicas tales como hibridación in situ.
- 35 **[0064]** La presencia de GCC en tejidos no colorrectales y en muestras de fluidos o en células de muestras de tejidos no colorrectales sugiere un posible cáncer estomacal o del esófago. La presencia de GCC en una muestra de tumores o en células de tumores sugiere que el tumor puede ser de un origen estomacal o del esófago. La presencia de la transcripción genética de GCC en muestras de tejidos no colorrectales y de fluidos corporales o en células de muestras de tejidos no colorrectales sugieren la posibilidad de cáncer estomacal o del esófago. La presencia de la transcripción genética de GCC en muestras de tumores y en células de tumores sugiere que el tumor podría ser de origen estomacal o del esófago.
- 40 **[0065]** Se pueden obtener muestras de tejido extirpado o material de biopsia incluyendo biopsia por medio de agujas. La preparación del tejido para su extirpación para la patología quirúrgica puede incluir la preparación del tejido para ser congelado y preparado utilizando técnicas estándar. Ensayos para enlaces de inmunohistoquímica e hibridación in situ en secciones de tejidos se realizan en células fijadas. Muestras extra intestinales pueden ser homogeneizadas por medio de técnicas estándar tales como la sonicación, interrupción mecánica o lisis química tales como lisis por medio de detergentes. También se contempla que muestras de tumores en fluidos corporales tales como la sangre, orina, líquidos linfáticos, fluidos espinales cerebrales, fluidos amnióticos, fluidos de la vagina, semen y muestras de heces también pueden ser examinadas para determinar si aquellos tumores son de origen colorrectal, estomacal o del esófago.
- 45 **[0066]** Muestras de tejidos no colorrectales pueden obtenerse de cualquier tejido excepto de aquellos de la senda intestinal abajo del intestino delgado (es decir, el intestino grueso (colon), incluyendo la ciega, el colon ascendente, el colon transversal, el colon descendente y el colon sigmoide, y el recto) y adicionalmente el duodeno y el intestino delgado (el yeyuno y el íleon). Las células normales de todos los tejidos excepto aquellas de la senda colorrectal no expresan GCC. Por lo tanto, si la proteína GCC de la transcripción genética GCC es detectada en muestras no colorrectales, esto sugiere la presencia de cáncer colorrectal, estomacal o del esófago. En algunas secciones importantes, las muestras de tejidos son ganglios linfáticos.
- 50 **[0067]** Las muestras de tejidos pueden obtenerse por medio de técnicas quirúrgicas estándar incluyendo la utilización de jeringas de biopsia. Una persona con conocimiento en la industria apreciará fácilmente la variedad de muestras de prueba que pueden ser examinadas para detectar GCC y reconocerá métodos para obtener las muestras de tejidos.
- 55 **[0068]** Las muestras de tejidos pueden ser homogeneizadas y preparadas de otra forma para la examinación de la presencia de GCC por técnicas muy conocidas tales como la sonicación, la interrupción mecánica, lisis química tal como lisis mediante detergentes o sus combinaciones.
- 60 **[0069]** Ejemplos de muestras de fluidos corporales incluyen sangre, orina, fluido linfático, fluido espinal cerebral, fluido amniótico, fluido vaginal y semen. En algunas secciones importantes, la sangre es utilizada como una muestra
- 65

de fluidos corporales. Las células pueden aislarse de la muestra de fluidos utilizando métodos como por ejemplo, la centrifugación. Una persona con conocimiento en la industria apreciará fácilmente la variedad de muestras de prueba que pueden ser examinadas para detectar GCC. Muestras de prueba pueden ser obtenidas por métodos tales como el retiro de fluido con una jeringa o con un algodón. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otros métodos para obtener las muestras de prueba.

[0070] En un ensayo utilizando una muestra sanguínea, el plasma sanguíneo puede ser separado de las células sanguíneas. El plasma sanguíneo puede ser examinado para detectar GCC incluyendo proteínas truncadas que son liberadas en la sangre cuando uno o más GCC son divididas o desprendidas de sus células tumorales. En algunas secciones, las fracciones de células sanguíneas son examinadas para detectar la presencia de células tumorales estomacales o del esófago. En algunas secciones, los linfocitos que se encuentran presentes en la fracción de células sanguíneas son examinados al utilizar las células y detectar la presencia de la proteína GCC o la transcripción genética de GCC que pueden estar presentes como resultado de la existencia de células tumorales estomacales o del esófago que pueden haberse sumergido en las células sanguíneas. En algunas secciones importantes, las células CD34+ son removidas antes del aislamiento de ARNm de las muestras utilizando columnas inmunológicas que están disponibles comercialmente.

[0071] Aspectos de esta presentación incluyen varios métodos para determinar si una muestra contiene células que expresan GCC por medio de un análisis molecular que se basa en secuencias de nucleótidos para detectar la transcripción genética de GCC. Varios métodos diferentes están disponibles para hacerlo de esa forma incluyendo aquellos que utilizan tecnologías de Reacción de Cadenas de Polimerasas (PCR - Polymerase Chain Reaction), tecnología de oligonucleótidos ramificados, tecnología de Northern blot, tecnología de hibridación de oligonucleótidos y tecnología de hibridación in situ.

[0072] También se presentan sondas de oligonucleótidos e iniciadores usados en los métodos para identificar a la transcripción genética de GCC y equipos de diagnóstico que comprenden aquellos componentes.

[0073] Los métodos que se basan en la secuencia de ARNm para detectar la transcripción genética de GCC incluyen, pero no se limitan a, la tecnología de reacción de cadenas de polimerasas, tecnología de oligonucleótidos ramificados, la tecnología de Northern y Southern blot, la tecnología de hibridación in situ y la tecnología de hibridación de oligonucleótidos.

[0074] Los métodos aquí descritos tienen el propósito de plantear ejemplos de cómo este invento puede ser utilizado y no tienen el propósito de limitar el alcance del invento. Se contempla que otra metodología que se base en secuencias para detectar la presencia de la transcripción genética de GCC en muestras no colorrectales puede utilizarse de acuerdo al invento.

[0075] Un método preferido para detectar la transcripción genética de GCC en el material genético derivado de muestras no colorrectales utiliza la tecnología de reacción de cadenas de polimerasas (PCR - polymerase chain reaction). La tecnología PCR estratificada rutinariamente por aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria y se utiliza para diagnósticos que son bien conocidos y aceptados. Los métodos para aplicar la tecnología PCR se muestran en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" ("Protocolos PCR: Una Guía para Métodos y Aplicaciones", Innis, M.A., et al. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, CA (1990). Aplicaciones para tecnologías PCR se presentan en "Polymerase Chain Reaction" ("Reacciones de Cadenas de Polimerasas") Erlich, H.A., et al., Eds. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) la cual es incorporada en este documento en referencia. La patente de Estados Unidos número 4,683,202, la patente de Estados Unidos número 4,683,195, la patente de Estados Unidos número 4,965,188 y la patente de Estados Unidos número 5,075,216, describen métodos para realizar PCR. Los PCR pueden ser practicados rutinariamente utilizando el equipo Perkin Elmer Cetus GENE AMP RNA PCR, parte número N808-0017.

[0076] La tecnología PCR permite la rápida generación de varias copias de secuencias de ADN al suministrar iniciadores 5' y 3' que hibridan las secuencias presentes en una molécula de ARN o de ADN, y suministran además nucleótidos libres y una enzima que llena las bases complementarias de la secuencia de nucleótidos entre los iniciadores con nucleótidos libres para producir una cepa complementaria de ADN. La enzima completará a las secuencias complementarias que se encuentran adyacentes a los iniciadores. En ambos, en el iniciador 5' y 3' se divisan las secuencias de nucleótidos en el mismo fragmento pequeño del ácido nucleico, resultando en la amplificación exponencial de un producto de tamaño específico de doble cepa. Si un solo iniciador hibrida al fragmento de ácido nucleico, la amplificación lineal produce productos de una sola cepa de variables grandes.

[0077] Los iniciadores PCR pueden designarse rutinariamente por aquellas personas que tienen conocimiento en la industria utilizando información secuencial. La secuencia de nucleótidos de la transcripción genética GCC es establecida en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1. Para realizar este método, se extrae ARN de células en una muestra y se le hace pruebas o se utiliza para hacer un cDNA utilizando métodos conocidos y materiales que se encuentran fácilmente. Aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria pueden preparar fácilmente iniciadores PCR. Un conjunto de iniciadores generalmente contiene a 2 iniciadores. Cuando se llevan a cabo PCR en ARNm o cDNA extraídos de aquel ARNm, si la transcripción genética de GCC o el

- cDNA ahí generado, si la transcripción genética de GCC o el cDNA de ahí generado está presente, varias copias de ARNm o cDNA serán realizadas. Si no están presentes, el PCR no generará un producto detectable discreto. Los iniciadores son generalmente de 8-50 nucleótidos, preferiblemente alrededor de 15-35 nucleótidos, más preferiblemente de 18-28 nucleótidos, que son idénticos o complementarios para, y por lo tanto, hibridar a la transcripción genética de GCC o al cDNA de ahí generado. En secciones importantes, los iniciadores tienen cada uno de 15-35 nucleótidos, más preferiblemente de 18-28 fragmentos de nucleótidos de la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1. El iniciador debe hibridar a la secuencia que debe ser amplificada. Los iniciadores típicos tienen 18-28 nucleótidos de largo y generalmente tienen una composición de un 50 por ciento a 60 por ciento de G + C. Todo el iniciador es preferiblemente complementario a la secuencia que debe hibridar. Preferiblemente, los iniciadores generan productos PCR de 100 parejas base a 2000 parejas base. Sin embargo, es posible generar productos de 50 hasta 10 kb y más. Si el ARNm es utilizado como una plantilla, los iniciadores deben hibridar a las secuencias de ARNm. Si el cDNA es utilizado como una plantilla, los iniciadores deben hibridar a las secuencias de cDNA.
- [0078]** El ARNm o cDNA es combinado con los iniciadores, los nucleótidos libres y las enzimas siguiendo protocolos PCR estándar. La mezcla experimenta una serie de cambios de temperatura. Si la transcripción genética de GCC o la cDNA de ahí generada está presente, eso es, si ambos iniciadores hibridan a las secuencias en la misma molécula, la molécula que contiene a los iniciadores y a las secuencias complementarias que intervienen serán amplificadas exponencialmente. El ADN amplificado puede ser detectado fácilmente con una variedad de medios bien conocidos. Sin ninguna transcripción genética de GCC o el cDNA de ahí generado no está presente, ningún producto PCR será amplificado exponencialmente. La tecnología PCR, por lo tanto, suministra un método extremadamente sencillo, fácil y confiable para detectar a la transcripción genética de GCC en la muestra.
- [0079]** El producto PCR puede ser detectado por medio de varias formas bien conocidas. El método preferido para detectar la presencia de ADN amplificado es el separar el material de reacción PCR por medio de electroforesis de gel y colorando el gel con bromuro de etidio para visualizar el ADN amplificado si estuviera presente. Un estándar del tamaño con el tamaño esperado del ADN amplificado es ejecutado preferiblemente de en el gel cómo control.
- [0080]** En algunas instancias, tales como cuando se recuperan montos inusualmente pequeños de ARN y solamente montos pequeños de cDNA son generados, es deseable o necesario el realizar una reacción PCR en el primer producto de reacción PCR. Eso es, si fuese difícil el detectar cantidades de ADN amplificado que son producidas por la primera reacción, una 2ª PCR puede ser realizada para realizar varias copias de secuencias de ADN del primer ADN amplificado. Un conjunto anidado de iniciadores son utilizados en la 2ª reacción PCR. El conjunto anidado de iniciadores hibridan a la secuencia corriente abajo del iniciador 5' y corriente arriba del iniciador 3' utilizados en la primera reacción.
- [0081]** También se presentan oligonucleótidos que son útiles como iniciadores para realizar métodos PCR para amplificar la transcripción genética de GCC o el cDNA de ahí generado.
- [0082]** De acuerdo a la presentación, equipos de diagnóstico pueden ser ensamblados los cuales son útiles para practicar los métodos para detectar la presencia de la transcripción genética de GCC o el cDNA de ahí generado en muestras no colorrectales. Aquellos equipos de diagnóstico comprenden oligonucleótidos que son útiles como iniciadores para realizar los métodos PCR. Es preferido que los equipos de diagnóstico tengan un contenedor que posea un marcador de tamaño para ser ejecutado como un estándar en un gel utilizado para detectar la presencia de ADN amplificado. El marcador de tamaño tiene el mismo tamaño que el ADN generado por el iniciador en la presencia de la transcripción genética de GCC o el cDNA de allí generado. Componentes adicionales en algunos equipos incluyen instrucciones para ejecutar el ensayo. Adicionalmente el equipo puede comprender opcionalmente imágenes o fotografías que representan la apariencia de resultados positivos y negativos. Los controles positivos y negativos también son provistos.
- [0083]** Los ensayos PCR son útiles para detectar la transcripción genética de GCC en muestras y células de tejido homogeneizado en muestras de fluidos corporales. Se contempla que el PCR en la porción del plasma de una muestra de fluidos podría ser útil para detectar la transcripción genética de GCC.
- [0084]** Otro método para determinar si una muestra contiene células que expresan GCC es por medio del análisis de hibridación de oligonucleótidos de cadenas ramificadas del ARNm extraído de una muestra. La hibridación de oligonucleótidos de cadenas ramificadas podría realizarse tal como se describió en la patente de Estados Unidos número 5,597,909, la patente de Estados Unidos número 5,437,977 y la patente de Estados Unidos número 5,430,138. Los reactivos pueden ser diseñados siguiendo las enseñanzas de aquellas patentes y aquella secuencia de la transcripción genética de GCC.
- [0085]** Otro método para determinar si una muestra contiene células que expresan a GCC es por medio del análisis de Northern blot del ARNm extraído de una muestra no colorrectal. Las técnicas para realizar los análisis de Northern blot son bien conocidos por aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria y se describen en Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. La extracción de ARNm, la

separación electroforética de ARNm, la absorción, la preparación de sondas y la hibridación son técnicas muy conocidas que pueden ser realizadas rutinariamente utilizando materiales de inicio que se pueden encontrar fácilmente.

- 5 **[0086]** El ARNm es extraído usando columnas poli dT y el material es separado por medio de electroforesis, por ejemplo, transferido a papel de nitrocelulosa. Las sondas marcadas hechas de un fragmento o varios fragmentos específicos aislados pueden ser utilizadas para visualizar la presencia de fragmentos complementarios fijados en el papel. Las sondas que son útiles para identificar al ARNm en un Northern blot tienen una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la transcripción genética de GCC. Aquellas personas con conocimiento normal en la
- 10 industria podrían utilizar la información secuencial en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: para diseñar aquellas sondas o para aislar y clonar la transcripción genética de GCC o el cDNA de ahí generado para ser utilizados como una sonda. Aquellas sondas tienen por lo menos a 15 nucleótidos, preferiblemente de 30-200, más preferiblemente de 40-100 fragmentos de nucleótidos y podrían ser toda la transcripción genética de GCC.
- 15 **[0087]** Equipos de diagnóstico pueden ser ensamblados los cuales son útiles para practicar los métodos para detectar la presencia de la transcripción genética GCC en muestras no colorrectales por medio del análisis de Northern blot. Tales equipos de diagnóstico comprenden oligonucleótidos que son útiles como sondas para hibridar el ARNm. Las sondas pueden ser radio marcadas. Es preferible que los equipos de diagnóstico tengan un contenedor con un marcador de tamaño para ser ejecutado como un estándar en un gel. Es preferible que los
- 20 equipos de diagnóstico tengan un contenedor con el control positivo que hibride a la sonda. Componentes adicionales en algunos equipos incluyen instrucciones para ejecutar el ensayo. Adicionalmente, el equipo podría comprender opcionalmente descripciones o fotografías que representa la apariencia de los resultados positivos y negativos.
- 25 **[0088]** El análisis de Northern blot es útil para la transcripción genética de GCC por medio de tecnología de hibridación de oligonucleótidos. Se contempla que el PCR en la porción de plasma de una muestra de fluidos podría usarse para detectar la transcripción genética de GCC.
- 30 **[0089]** Otro método para detectar la presencia de la transcripción genética de GCC por medio de tecnologías de hibridación de oligonucleótidos. La tecnología de hibridación de oligonucleótidos es bien conocida para aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria. Brevemente, sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótidos específica que hibridan a la secuencia de nucleótidos de la transcripción genética de GCC. ARN o cDNA hecho de ARN de una muestra se fijan, usualmente a un papel filtro o algo similar. Las sondas son agregadas y mantenidas bajo condiciones que permitan la hibridación sólo si las sondas complementan enteramente
- 35 al material genético que ha sido fijado. Las condiciones son lo suficientemente exigentes como para lavar y desprender las sondas en las cuales sólo una porción de la sonda hibrida al material fijo. La detección de la sonda en el filtro lavado indica la presencia de secuencias complementarias.
- 40 **[0090]** Las sondas que son útiles en los ensayos de oligonucleótidos de por lo menos 18 nucleótidos de ADN complementario y pueden ser tan largas como una secuencia complementaria completa a la transcripción genética de GCC. Las sondas pueden tener de 30-200 nucleótidos, preferiblemente de 40-100 nucleótidos.
- 45 **[0091]** Una persona con un conocimiento normal en la industria, utilizando la información secuencial presentada en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1 puede diseñar sondas útiles para los métodos aquí descritos. Las condiciones de hibridación pueden ser optimizadas rutinariamente para minimizar la señal de fondo por parte de la hibridación complementaria no completa. Las sondas pueden ser colones de una longitud completa. Las sondas tienen por lo menos 15 nucleótidos, preferiblemente 30-200, más preferiblemente 40 - 100 fragmentos de nucleótidos y pueden tener toda la transcripción genética de GCC.
- 50 **[0092]** También se presentan oligonucleótidos marcados que son útiles como sondas para realizar hibridación de oligonucleótidos. Las sondas marcadas son etiquetadas con nucleótidos radio-marcados o son detectables de otra forma por medio de sistemas de detección radiactivos que se pueden conseguir fácilmente.
- 55 **[0093]** Equipos de diagnóstico pueden ser armados los cuales son útiles para practicar los métodos de hibridación de oligonucleótidos. Aquellos equipos de diagnosis comprenden un oligonucleótido marcado que codifica porciones de la transcripción genética de GCC. Es preferido que las sondas marcadas de los equipos de diagnóstico de oligonucleótidos sean marcadas con un radio - nucleótido. Los equipos de diagnóstico que se basan en hibridación de oligonucleótidos preferiblemente comprenden muestras de ADN que representan controles positivos y negativos. Una muestra de ADN de control positivo es una que contiene una molécula de ácido nucleico que tiene una
- 60 secuencia de nucleótidos que es enteramente complementaria a las sondas del equipo de tal forma que las sondas hibridan a la molécula bajo condiciones de ensayo. Una muestra de ADN de control negativo es una que contiene por lo menos una molécula de ácido nucleico, la secuencia de nucleótidos de la cual es parcialmente complementaria a la muestra de ADN de control negativo. Componentes adicionales en algunos equipos incluyen instrucciones para ejecutar el ensayo. Adicionalmente, el equipo puede comprender opcionalmente descripciones o
- 65 fotografías que representan la apariencia de los resultados positivos y negativos.

- [0094]** Las técnicas de hibridación de oligonucleótidos son útiles para detectar la transcripción genética de GCC en muestras y células de tejidos homogeneizadas en muestras de fluidos corporales. Se contempla que PCR en la porción de plasma de una muestra de fluidos podría ser utilizada para detectar la transcripción genética de GCC.
- 5 **[0095]** Esta presentación se relaciona a equipos in vitro para evaluar muestras de tumores para determinar si es que tienen un origen estomacal o del esófago y a reactivos y composiciones útiles para su práctica. Muestras tumorales pueden aislarse de individuos que están experimentando o que se están recuperando de cirugías para remover tumores en el estómago o el esófago, tumores en otros órganos o material de biopsia. La muestra tumoral es
10 analizada para identificar la presencia o ausencia de la transcripción genética de GCC. Técnicas tales como ensayos de inmunohistoquímica pueden realizarse para determinar si es que GCC está presente en las células en la muestra tumoral. La presencia de ARNm que codifica a la proteína GCC o el cDNA de ahí generado puede determinarse utilizando técnicas tales como hibridación in situ, inmunohistoquímica y ensayos de enlaces de ST in situ.
- 15 **[0096]** La tecnología de hibridación in situ es bien conocida por aquellas personas con conocimiento normal en la industria. Brevemente, las células son fijadas y sondas detectables que contienen una secuencia de nucleótidos específica son agregadas a las células fijadas. Si las células contienen secuencias de nucleótidos complementarias, las sondas, que pueden ser detectadas, las hibridarán.
- 20 **[0097]** Las sondas útiles en ensayos oligonucleótidos tienen por lo menos 18 nucleótidos de ADN complementario y pueden ser tan largas como una secuencia complementaria completa para la transcripción genética de GCC. En algunas secciones importantes, las sondas del invento tienen 30-200 nucleótidos, preferiblemente 40-100 nucleótidos.
- 25 **[0098]** Una persona con conocimiento normal en la industria, utilizando la información secuencial establecida en la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: puede diseñar sondas útiles en la tecnología de hibridación in situ para identificar células que expresan a GCC. Las sondas hibridan preferiblemente a una secuencia de nucleótidos que corresponde a la transcripción genética de GCC. Las condiciones de hibridación pueden ser optimizadas rutinariamente para minimizar señales de fondo por medio de hibridación complementaria no completa. Las sondas
30 hibridan preferiblemente a la transcripción genética de GCC de longitud completa. Las sondas tienen por lo menos 15 nucleótidos, preferiblemente de 30-200, más preferiblemente de 40-100 fragmentos de nucleótidos y pueden ser la transcripción genética de GCC, más preferiblemente de 18-28 fragmentos de nucleótidos de la transcripción genética de GCC.
- 35 **[0099]** Las sondas son completamente complementarias y no hibridan bien a secuencias parcialmente complementarias. Para hibridación in situ de acuerdo al invento, es preferido que las sondas sean detectables por fluorescencia. Un procedimiento común es el marcar las sondas con nucleótidos modificados de biotina y entonces detectar con avidina marcada fluorescentemente. Por lo tanto, la sonda no tiene que ser marcada en sí con fluorescencia pero puede ser detectada subsiguientemente con un marcador fluorescente.
- 40 **[0100]** Esta presentación incluye oligonucleótidos marcados que son útiles como sondas para realizar hibridación de oligonucleótidos. Es decir, son completamente complementarios con secuencias de ARNm pero no con secuencias genómicas. Las sondas marcadas de este invento son etiquetadas con nucleótidos radio - marcados o son detectables de otra forma por medio de sistemas de detección no radiactivos que son disponibles fácilmente.
- 45 **[0101]** Este invento se relaciona a las sondas útiles para hibridación in situ para identificar células que expresan GCC.
- 50 **[0102]** Las células son fijadas y las sondas son agregadas al material genético. Las sondas hibridarán a secuencias de ácidos nucleicos complementarios presentes en la muestra. Utilizando un microscopio fluorescente, las sondas pueden ser visualizadas por sus marcadores fluorescentes.
- 55 **[0103]** Equipos de diagnóstico pueden ser ensamblados los cuales son útiles para practicar métodos de hibridación in situ de la intervención que son completamente complementarios con secuencias de ARNm pero no con las secuencias genómicas. Por ejemplo, la secuencia de ARNm incluye diferentes secuencias de exones. Es preferible que las sondas marcadas de los equipos de diagnóstico in situ de acuerdo a este invento sean marcadas con un marcador fluorescente.
- 60 **[0104]** Las técnicas de inmunohistoquímica pueden ser utilizadas para identificar y marcar esencialmente células con GCC. Tal "marcación" permite un análisis de la migración metastásica. Anticuerpos anti-GCC tales como aquellos descritos anteriormente de células contactadas con células fijadas y el GCC presente en las células reaccionadas con los anticuerpos. Los anticuerpos son marcados en una forma detectable o detectados utilizando anticuerpos o proteínas A marcados como segundos para manchar a las células.
- 65 **[0105]** Las técnicas aquí descritas para evaluar secciones tumorales también pueden ser utilizadas para analizar secciones de tejidos para muestras de ganglios linfáticos así como otros tejidos para identificar la presencia de

células que expresan GCC. Las muestras pueden ser preparadas y “manchadas” para detectar la expresión de GCC.

5 **[0106]** Métodos de inmuno-ensayos pueden ser utilizados en la diagnosis de individuos que padecen de cáncer estomacal o del esófago al detectar la presencia de GCC en muestras de tejidos no colorrectales o fluidos corporales de un individuo que se sospecha tiene o es susceptible a cáncer estomacal o del esófago utilizando anticuerpos que fueron producidos en respuesta a la exposición a aquella proteína GCC. Además, los métodos de inmuno - ensayos pueden ser utilizados para identificar a individuos que padecen de cáncer estomacal o del esófago al detectar la presencia de GCC en muestras de tumores utilizando anticuerpos que fueron producidos en respuesta a la exposición de aquella proteína GCC.

15 **[0107]** Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son preferiblemente generados en contra de GCC hechos en células humanas. Los inmuno - ensayos son bien conocidos y su diseño puede ser hecho rutinariamente por aquellas personas que tengan un conocimiento normal en la industria. Aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria pueden producir anticuerpos monoclonales con enlaces específicos a GCC y son útiles en métodos y equipos del invento utilizando técnicas estándar y materiales de inicio que son disponibles fácilmente. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son señaladas en Harlow, E. y D. Lane, (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual (Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, suministra un guía detallada para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales que se enlazan específicamente a proteínas objetivo. Está dentro del alcance de este invento el incluir a Fabs, Fabs recombinantes, F(Ab)₂s, F(Ab)₂s recombinantes que se enlazan específicamente a productos de traducción de GCC en lugar de anticuerpos.

25 **[0108]** Brevemente, la proteína GCC es inyectada en ratones. El vaso del ratón es removido, las células del vaso son aisladas y fusionadas con células inmortalizadas de ratón. Las células híbridas o hibridomas, son cultivados y aquellas células que secretan anticuerpos son seleccionadas. Los anticuerpos son analizados y, si se encuentra que se enlazan específicamente a los GCC, el hibridoma que los produce es cultivado para producir un suministro continuo de anticuerpos específicos anti-GCC.

30 **[0109]** Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son preferible en generados en contra de GCC hechos en células humanas.

35 **[0110]** Los medios para detectar la presencia de una proteína en una muestra de prueba son de rutina y una persona que tenga un conocimiento normal en la industria puede detectar la presencia o ausencia de una proteína o un anticuerpo utilizando métodos bien conocidos. Un método bien conocido para detectar la presencia de una proteína es un inmuno - ensayo. Una persona con conocimiento normal en la industria puede apreciar fácilmente de la multitud de formas para practicar un inmuno - ensayo para detectar la presencia de una proteína GCC en una muestra.

40 **[0111]** De acuerdo a algunas secciones, inmuno - ensayos comprenden el permitir a proteínas en la muestra enlazarse a un soporte de fase sólida tal como una superficie de plástico. Anticuerpos detectables son agregados entonces los cuales se enlazan selectivamente con el GCC. La detección del anticuerpo detectable indica la presencia de GCC. El anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo marcado o no marcado. Anticuerpos marcados pueden ser detectados utilizando un 2º anticuerpo marcado que se enlaza específicamente al primer anticuerpo o un 2º anticuerpo no marcado que puede ser detectado utilizando una proteína A marcada, una proteína que tiene complejos con anticuerpos. Varios procedimientos de inmuno – ensayos son descritos en Immunoassays for the 80's (Inmuno - ensayo para la Década de los Ochentas) A. Voller et al., Eds., University Park, 1981.

50 **[0112]** Inmuno ensayos simples pueden ser realizados en los cuales un soporte de fase sólida es contactado con la muestra de prueba. Cualquier proteína presente en la muestra de prueba se enlaza al soporte de fase sólida y puede ser detectado por medio de una preparación de anticuerpos detectable específica. Un ejemplo claro de esto es la esencia del dot blot, Western blot y cualquier otro ensayo similar.

55 **[0113]** Otros inmuno - ensayos podrían ser más complicados pero suministrarían realmente resultados excelentes. Ensayos inmuno - métricos típicos y preferidos incluyen ensayos “hacia adelante” para la detección de una proteína en la cual un primer anticuerpo anti-proteína enlazado a un soporte de fase sólida es contactado con la muestra de prueba. Después de un período de incubación adecuado, el soporte de fase sólida es lavado para remover las proteínas no enlazadas. Un 2º anticuerpo anti-proteína distinto es agregado el cual es específico para una porción de la proteína específica no reconocida por el primer anticuerpo. El 2º anticuerpo es preferiblemente detectable. Después de un 2º período de incubación para permitir al anticuerpo detectable establecer un complejo con la proteína específica enlazada al soporte de fase sólida a través del primer anticuerpo, el soporte de fase sólida es lavado una 2ª vez para remover al anticuerpo detectable no enlazado. Alternamente, el 2º anticuerpo podría no ser detectable. En este caso, un 3er anticuerpo detectable, que enlaza al 2º anticuerpo es agregado al sistema. Este tipo de ensayo “tipo emparedado hacia adelante” podría ser un ensayo simple de sí/no para determinar si es que el enlace ha ocurrido o podría ser hecho cuantitativamente al comparar el monto total de anticuerpos detectables con los que se obtuvieron en un control. Ensayos como estos “de 2 lugares” o “tipo emparedados” son descritos por

Wide, Radioimmune Assay Method (Método de Ensayos Radio - Inmunológicos), Kirkham, Ed., E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970, pp. 199-206.

5 **[0114]** Otros tipos de ensayos inmuno - métricos son los denominados ensayos "simultáneos" y "en reversa". Un ensayo simultáneo involucra un solo paso de incubación donde el primer anticuerpo enlazado al soporte de fase sólida, el 2º anticuerpo detectable y la muestra de prueba son agregados al mismo tiempo. Después de que se haya completado la incubación, el soporte de la fase sólida es lavado para remover a las proteínas no enlazadas. La presencia de anticuerpos detectables asociados con el soporte sólido se determina como si fuera un ensayo convencional "tipo emparedado hacia adelante". El ensayo simultáneo también podría ser adaptado en una forma similar para la detección de anticuerpos en una muestra de prueba.

10 **[0115]** El ensayo "en reversa" comprende una adición de pasos de una solución de anticuerpos detectables a la muestra de prueba seguida por un período de incubación y la adición de anticuerpos enlazados a un soporte de fase sólida después de un período adicional de incubación. El soporte de fase sólida es lavado en forma convencional para remover complejos proteinicos/de anticuerpos enlazados y anticuerpos detectables que no han reaccionado. La determinación de los anticuerpos detectables asociados con el soporte de fase sólida es determinado como en los ensayos "simultáneos" y "hacia adelante". El ensayo en reversa también podría ser adaptado en una forma similar para la detección de anticuerpos en una muestra de prueba.

15 **[0116]** El primer componente del ensayo inmuno - métrico podría ser agregado en nitrocelulosa u otro soporte de fase sólida que sea capaz de inmovilizar a las proteínas. El primer componente para determinar la presencia de GCC en la muestra de prueba es un anticuerpo anti-GCC. El término "soporte de fase sólida" o "soporte" se refiere a cualquier material capaz de enlazar a las proteínas. Soportes de fase sólida bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosa natural y modificada, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del soporte puede ser soluble hasta cierto grado o insoluble para propósitos de este invento. La configuración del soporte puede ser esférica, tal como en una esfera, o cilíndrica, como la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de una vara. Alternamente, la superficie podría ser plana tal como una lámina, una zona de pruebas, etcétera aquellas personas con conocimiento en la industria conocerán muchos otros "soportes adecuados de fase sólida" para enlazar proteínas o podrán determinar los mismos por medio de experimentación rutinaria. Un soporte de fase sólida preferido es un plato de micro titulación de 96 pozos.

20 **[0117]** Para detectar la presencia de GCC, se utiliza anticuerpos anti-GCC detectables. Algunos métodos son bien conocidos para detección de anticuerpos.

25 **[0118]** Un método en el cual los anticuerpos pueden ser marcados en forma detectable es al vincular los anticuerpos a una enzima y subsiguientemente utilizar los anticuerpos en un inmuno - ensayo enzimático (EIS - enzyme immunoassay) o un ensayo inmuno - absorbente enlazado con enzimas (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), tal como una captura ELISA. La enzima, cuando se expone subsiguientemente a su sustrato, reacciona con el sustrato y genera una porción química que puede ser detectada, por ejemplo, por medio de espectrofotometría, fluorometría o medios visuales. Las enzimas que pueden ser utilizadas para marcar detectablemente anticuerpos incluyen, pero no se limitan a deshidrogenasa de malato, nucleasa de estafilococos, isomerasa de delta-5-esteroide, deshidrogenasa de alcohol de levadura, deshidrogenasa de alfa-glicerofosfato, isomerasa de fosfato de triosa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, oxidasa de glucosa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otras enzimas que también podría ser utilizadas.

30 **[0119]** Otro método en el cual anticuerpos pueden ser marcados en forma detectable es por medio de isótopos radiactivos y el uso subsiguiente en un ensayo radio inmunológicos (RIA - radioimmunoassay) (refiérase, por ejemplo, a Work, T.S. et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology (Técnicas de Laboratorio y Bioquímica en Biología Molecular), North Holland Publishing Company, N.Y., 1978. El isótopo radiactivo puede ser detectado por medios tales como el uso de un contador de gama o un contador de centelleo o por auto radiografía. Isótopos que son particularmente útiles para el propósito de este invento son ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , y ^{14}C . Preferiblemente ^{125}I como isótopo. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otros radioisótopos que podrían ser utilizados.

35 **[0120]** También es posible el marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado de forma fluorescente es expuesto a la luz de la longitud de onda apropiada, su presencia es detectada debido a su fluorescencia. Entre los compuestos de marcación fluorescente más utilizados se encuentran isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otros compuestos fluorescentes que podrían ser utilizados.

40 **[0121]** Los anticuerpos también pueden ser marcados en forma detectable utilizando metales que emiten fluorescencia tales como ^{152}Eu u otros de las series de lantánida. Estos metales pueden estar adheridos al anticuerpo de la proteína específica utilizando tales grupos quelantes como el ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Una persona con conocimiento en la industria reconocerá

fácilmente otros metales emisores de fluorescencia así como otros grupos quelantes de metales que también podrían ser utilizados.

5 **[0122]** Un anticuerpo también puede ser marcado en forma detectable al acoplarse a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado en forma quimioluminiscente es determinada al detectar la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcación quimioluminiscente que son particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otros compuestos de quimioluminiscencia que también podrían ser utilizados.

10 **[0123]** Asimismo, un compuesto bioluminiscente podría ser utilizado para marcar anticuerpos. Bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los cuales una proteína catalizadora incrementa la eficiencia de la reacción de quimioluminiscencia. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina al detectar la presencia de luminiscencia. Compuestos bioluminiscentes importantes para propósitos de marcaciones son luciferina, luciferasa y aequorina. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente de otros compuestos bioluminiscentes que también podrían ser utilizados.

20 **[0124]** La detección del anticuerpo específico a la proteína, fragmento o derivado puede lograrse por medio de un contador de centelleo si, por ejemplo, la marcación detectable es un emisor radiactivo de gama. Alternamente, la detección podría lograrse por medio de un fluorómetro si, por ejemplo, la marcación es un material fluorescente. En el caso de una marcación enzimática, la detección puede lograrse por medio de métodos clorométricos que utilizan un sustrato para la enzima. La detección también puede ser lograda por medio de una comparación visual de la magnitud de luz de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados similarmente. Una persona con conocimiento en la industria reconocerá fácilmente otros métodos apropiados para la detección que también podrían ser utilizados.

25 **[0125]** La actividad de enlaces a un lote específico de anticuerpos podría determinarse de acuerdo a métodos muy conocidos. Aquellas personas con conocimiento en la industria podrán determinar condiciones operativas y óptimas de ensayos para cada determinación al utilizar experimentación rutinaria.

30 **[0126]** Controles positivos y negativos pueden ser realizados en los cuales puntos conocidos de proteínas GCC y proteínas no GCC, respectivamente, son agregadas a los ensayos que se están realizando en forma paralela con el ensayo de prueba. Una persona con conocimiento en la industria tendrá el conocimiento necesario para realizar los controles apropiados. Adicionalmente, el equipo podría incluir instrucciones para realizar el ensayo. Adicionalmente, el equipo opcionalmente incluiría descripciones o fotografías que representan la apariencia de resultados positivos y negativos.

35 **[0127]** GCC podría ser producido como un reactivo para controles positivos rutinariamente. Una persona con conocimiento en la industria apreciará las formas diferentes en las cuales la proteína GCC puede ser producida y aislada.

40 **[0128]** La composición de anticuerpos se refiere al anticuerpo o anticuerpos requeridos para la detección de la proteína. Por ejemplo, la composición de anticuerpos utilizada para la detección de un GCC en una muestra de prueba comprende un primer anticuerpo que enlaza al GCC, así como un 2º o 3er anticuerpo detectable que enlaza al primero o el 2º anticuerpo, respectivamente.

45 **[0129]** Para examinar una muestra de prueba para detectar la presencia de un GCC, se puede realizar un ensayo inmuno - métrico estándar tal como el que se describe más adelante. Un primer anticuerpo anti-GCC, que reconoce una porción específica de GCC, es agregado a un plato de micro - titulación de 96 pozos en un volumen de amortiguación. El plato es incubado durante un período de tiempo suficiente para que ocurran los enlaces y subsiguientemente es lavado con PBS para remover los anticuerpos enlazados. El plato es bloqueado entonces con una solución PBS/BSA para evitar que proteínas de la muestra se enlacen no específicamente al plato de micro titulación. La muestra de prueba es agregada subsiguientemente a los pozos y el plato es incubado durante un período de tiempo suficiente para que ocurran los enlaces. Los pozos son lavados con PBS para remover proteínas no enlazadas. Los anticuerpos anti-GCC marcados, que reconocen porciones de GCC no reconocidas por el primer anticuerpo, son agregadas a los pozos. El plato es incubado durante un período de tiempo suficiente para que ocurran los enlaces y subsiguientemente lavado con PBS para remover anticuerpos anti-GCC marcados no enlazados. Los anticuerpos anti-GCC marcados, que reconocen porciones de GCC no reconocidas por el primer anticuerpo, son agregados a los pozos. El plato es incubado durante un período de tiempo suficiente para que ocurran los enlaces y subsiguientemente se lava con PBS para remover los anticuerpos anti-GCC marcados no enlazados. El monto de anticuerpos anti-GCC enlazados y marcados es determinado subsiguientemente por medio de técnicas estándar.

60 **[0130]** Los equipos que son útiles para la detección de GCC en una muestra de prueba tienen un contenedor con anticuerpos anti-GCC y un contenedor o contenedores con controles. Los controles incluyen una muestra de control

que no contiene GCC y/u otra muestra de control que contiene los GCC. Los anticuerpos anti-GCC utilizados en el equipo son detectables tales como los que fueron marcados una forma detectable. Si el anticuerpo anti-GCC detectable no es marcado, podría ser detectado por segundos anticuerpos o una proteína A por ejemplo, lo cual también podría ser provisto en algunos equipos en contenedores separados. Componentes adicionales en algunos equipos incluyen un soporte sólido, un amortiguador e instrucciones para ejecutar el ensayo. Adicionalmente, el equipo podría incluir descripciones o fotografías que representan la apariencia de los resultados positivos y negativos.

[0131] Los ensayos inmunológicos son útiles para detectar GCC en muestras de tejidos homogeneizadas y en muestras de fluidos corporales incluyendo la porción de plasma o células en la muestra de fluidos.

[0132] Los Western blots podrían ser útiles para ayudar a la diagnosis de individuos que padecen de cáncer estomacal o del esófago para detectar la presencia de GCC de tejidos no colorrectales o fluidos corporales. Western blots también pueden ser utilizados para detectar la presencia de GCC en una muestra de un tumor de un individuo que sufre de cáncer. Los Western blots utilizan anticuerpos anti-GCC detectables para enlazarse a cualquier GCC presente en una muestra y por lo tanto indica la presencia del receptor en la muestra.

[0133] Las técnicas del Western blot, que son descritas en Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, son similares a ensayos inmunológicos con la diferencia esencial de que antes de exponer a la muestra a los anticuerpos, las proteínas en las muestras o separadas por medio de electroforesis de gel y las proteínas separadas son sondeadas con anticuerpos. En algunas secciones importantes, la matriz es una matriz de gel SDS-PAGE y las proteínas separadas en la matriz son transferidas a un portador tal como un papel filtro antes de sondear con anticuerpos. Los anticuerpos anti-GCC descritos anteriormente son útiles en los métodos de Western blot.

[0134] Generalmente, las muestras son homogeneizadas y las células son realizadas usando detergente tal como Tritón-X. El material es separado entonces por medio de técnicas estándar de acuerdo a Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0135] Los equipos son útiles para la detección de GCC en una muestra de prueba por medio de Western Blot tienen un contenedor con anticuerpos anti-GCC y un contenedor o contenedores con controles. Los controles incluyen una muestra de control que no contiene GCC y/u otra muestra de control que contiene GCC. Los anticuerpos anti-GCC utilizados en el equipo son detectables tales como los marcados para ser detectables. Si el anticuerpo anti-GCC no es marcado, podría ser detectado por segundos anticuerpos o proteínas A, por ejemplo, lo cual podría ser provisto en algunos equipos en contenedores separados. Componentes adicionales en algunos equipos incluyen instrucciones para ejecutar el ensayo. Adicionalmente el equipo podría contener descripciones o fotografías que representan la apariencia de resultados positivos y negativos.

[0136] Los Western Blots son útiles para detectar GCC en muestras de tejidos homogeneizadas y muestras de fluidos corporales incluyendo la porción o células de plasma en una muestra de fluidos.

Toma de imágenes y terapias in vivo

[0137] De acuerdo a algunas secciones del invento, composiciones y métodos in vivo son suministrados para detectar, tomar imágenes o tratar tumores estomacales o del esófago primarios y/o metastásicos en un individuo.

[0138] Cuando las composiciones conjugadas de este invento analizadas fuera del senda intestinal tal como cuando son administradas en el sistema circulatorio, estas permanecen segregadas de las células que se alinean con la senda intestinal y sólo se enlazarán a células afuera de la senda intestinal que expresan a GCC. Las composiciones conjugadas no se enlazarán a las células normales pero se enlazarán a las células estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas. Por lo tanto, las porciones activas de composiciones conjugadas administradas afuera de la senda intestinal son entregadas a las células que expresan GCC tales como las células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas.

[0139] Composiciones farmacéuticas terapéuticas y de diagnóstico útiles para este invento incluyen compuestos conjugados que se dirigen específicamente a células que expresan GCC. Estos compuestos conjugados incluyen porciones que se enlazan a GCC que no se enlazan a células de tejidos normales en el cuerpo excepto a células de la senda intestinal puesto que las células de otros tejidos no expresan a GCC.

[0140] En contraste con las células colorrectales, las células cancerígenas que expresan GCC son accesibles a sustancias administradas afuera de la senda intestinal, por ejemplo, administradas en el sistema circulatorio. Los únicos GCC en tejidos normales existen en las membranas apicales de las células de la mucosa intestinal y por lo tanto están aisladas efectivamente de los reactivos quimioterapéuticos y de toma de imágenes dirigidos al cáncer administrados afuera de la senda intestinal debido a la barrera de mucosa intestinal. Por lo tanto, las células

cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas pueden ser un objetivo para los compuestos conjugados de este invento al introducir aquellos compuestos fuera de la senda intestinal de tal forma, por ejemplo, al administrar las composiciones farmacéuticas que contienen a los compuestos conjugados en el sistema circulatorio.

5 [0141] Una persona con conocimiento normal en la industria puede identificar individuos que se sospecha padecen de cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico. En aquellos individuos diagnosticados con cáncer estomacal o del esófago, no es inusual y en algunos casos la terapia estándar es sospechar metástasis e intentar agresivamente el erradicar las células productos de metástasis. Este invento suministra composiciones y métodos farmacéuticos para tomar imágenes y gracias a estos diagnosticar más definitivamente una enfermedad primaria y metastásica. Además, este invento suministra composiciones farmacéuticas que contienen reactivos terapéuticos para dirigir específicamente y eliminar células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas. Además, este invento suministra composiciones farmacéuticas que contienen elementos terapéuticos para eliminar específicamente células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas.

10 [0142] Las composiciones farmacéuticas que contienen composiciones conjugadas de este invento podrían ser utilizadas para diagnosticar o tratar a individuos que padecen de tumores estomacales o del esófago primarios y/o metastásicos.

15 [0143] Este invento se basa en el uso de porciones que se enlazan con GCC en una composición conjugada. Las porciones que se enlazan con GCC son en esencia una porción de la composición conjugada que actúa como un ligando para un GCC y por lo tanto se enlaza específicamente a este. La composición conjugada también incluye una porción activa que es asociada con la porción de enlaces a GCC; la porción activa es un reactivo que es útil para tomar imágenes, para dirección para neutralización o para eliminar a la célula.

20 [0144] La porción que enlaza a la GCC es una porción con un ligando GCC de una composición conjugada. De acuerdo a la presentación, el ligando GCC podría ser un anticuerpo.

25 [0145] Los compuestos conjugados contienen porciones enlazadoras de GCC que contienen un anticuerpo anti-GCC también son presentadas en este documento.

30 [0146] Preferiblemente, el ligando GCC utilizado como la porción enlazadora de GCC es lo más pequeña posible. Por lo tanto, es preferido que el ligando GCC sea una molécula pequeña que no sea un péptido o un péptido pequeño, preferiblemente con menos de 25 aminoácidos, más preferiblemente menos de 20 aminoácidos. En algunas secciones, el ligando GCC que constituye en la porción enlazadora de GCC de una composición conjugada que es menor a 15 aminoácidos. El péptido enlazador de GCC comprende menos de 10 aminoácidos y péptidos enlazadores de GCC menores a 5 aminoácidos pueden ser utilizados como porciones enlazadoras de GCC de acuerdo a este invento. Está dentro del alcance de este invento el incluir moléculas más grandes que sirvan como porciones enlazadoras de GCC, incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas tales como anticuerpos que se enlazan específicamente a GCC.

35 [0147] Ligandos GCC útiles como porciones enlazadoras de GCC pueden identificarse utilizando varias tecnologías de examinación de bibliotecas combinatorias tales como aquellas establecidas en el Ejemplo 1 en este documento.

40 [0148] Un ensayo puede ser utilizado para probar a las composiciones de péptidos y de no péptidos para determinar si es que éstas son ligandos GCC o, para probar composiciones conjugadas para determinar si estas poseen actividades de enlazamiento a GCC. Tales composiciones que se enlazan específicamente a GCC pueden identificarse por medio de un ensayo de enlaces competitivos utilizando anticuerpos que se conocen por enlazar a GCC. Un ensayo de enlaces competitivos es una técnica estándar en farmacología que puede ser realizada fácilmente por aquellas personas que tienen conocimiento normal en la industria utilizando materiales de inicio que pueden ser encontrados fácilmente.

45 [0149] Las GCC pueden ser producidas sintéticamente, recombinantemente o aisladas de fuentes naturales.

50 [0150] Utilizando una síntesis de fase sólida como un ejemplo, el aminoácido protegido o derivado es adherido a un soporte sólido inerte por medio de su carboxilo no protegido o un grupo amino. El grupo protector de aminos o el grupo de carboxilos es removido selectivamente y el próximo aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) protegido adecuadamente de es agregado y mezclado y reaccionado con el residuo ya adherido al soporte sólido. El grupo protector del grupo de aminos o de carboxilos es removido entonces de este residuo de aminoácidos agregado recientemente, y el próximo aminoácido (protegido adecuadamente) es agregado entonces, y así sucesivamente. Después de que todos los aminoácidos deseados han sido enlazados en la secuencia apropiada, cualquier grupo terminal o lateral remanente que esté protegiendo a los grupos (y el soporte sólido) son removidos secuencialmente o concurrentemente, para suministrar el péptido final. El péptido es preferiblemente desprovisto de aminoácidos bencilados o metilbencilados. Aquellas porciones de los grupos protectores pueden ser utilizadas en el transcurso de la síntesis, pero éstas son removidas antes de que los péptido

55 60 65

sean utilizados. Reacciones adicionales podrían ser necesarias, tal como se describe en otras secciones, para formar vinculaciones intra - moleculares para restringir la conformación.

5 **[0151]** Anticuerpos en contra de GCC pueden ser producidos rutinariamente y utilizados en ensayos competitivos para identificar ligandos GCC o como materiales de inicio para compuestos conjugados.

10 **[0152]** De acuerdo a este invento, la porción activa podría ser un reactivo terapéutico o un reactivo de toma de imágenes. Una persona con conocimiento normal en la industria podrá reconocer fácilmente las ventajas de poder dirigir específicamente a las células cancerígenas con un ligando GCC y conjugar aquel ligando con muchos reactivos diferentes.

15 **[0153]** Elementos quimioterapéuticos útiles como porciones activas que cuando se conjugan a porciones enlazadoras de GCC son entregadas específicamente a las células que expresan GCC tales como células cancerígenas estomacales o del esófago, son comúnmente entidades químicas pequeñas producidas por medio de síntesis química. Los elementos quimioterapéuticos incluyen medicamentos citotóxicos y citostáticos. Los elementos quimioterapéuticos pueden incluir aquellos que tienen otros efectos en células tales como la marcha atrás del estado transformado a un estado diferenciado o aquellos que inhiben a la replicación de células. Ejemplos de elementos quimioterapéuticos incluyen medicamentos comunes citotóxicos o citostáticos tales como por ejemplo: metotrexato (ametopterin), doxorubicina (adrimicina), daunorrubicina, citosinarabinósido, etopósido 5-4 fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, y otras mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida), cis-platino, vindesina (y otros alcaloides de la vinca), mitomicina y bleomicina. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen: purotionina (oligopéptido de harina de cebada), macromomicin, derivados de 1,4-benzoquinona y trenimón.

25 **[0154]** Las toxinas son útiles como porciones activas. Cuando una toxina conjugada con una porción enlazadora de GCC, la composición conjugada, es entregada específicamente a una célula que expresa GCC tal como las células cancerígenas estomacales o del esófago por medio de la porción enlazadora de GCC y la porción tóxica mata a las células. Las toxinas son generalmente productos tóxicos complejos de varios organismos que incluyen bacterias, plantas, etcétera. Ejemplos de toxinas incluyen, pero no se limitan a: ricino, cadena de ricino A (toxina de ricino), Exotoxina de Pseudomonas (PE - Pseudomonas exotoxin), toxina de la difteria (DT - diphtheria toxin), Clostridium perfringens fosfolipasa C (PLC - phospholipase C), ribonucleasa pancreática bovina (BPR - bovine pancreatic ribonuclease), proteína antiviral de fitolaca (PAP - pokeweed antiviral protein), abrina, cadena de abrina A (toxina abrina), factor de veneno de cobra (CVF - cobra venom factor), gelonina (GEL), saporina (SAP), modicina, viscumina y volkensina. Tal como se mencionó anteriormente, cuando toxinas proteínicas son utilizadas con péptidos enlazadores de GCC, composiciones conjugadas podrían ser producidas utilizando técnicas de ADN recombinantes. Brevemente, una molécula de ADN recombinante puede ser construida y ésta codifica al ligando GCC y a la toxina en el gen quimérico. Cuando el gen quimérico es expresado, una proteína de fusión es producida que incluye a una porción enlazadora de GCC y una porción activa. Las toxinas proteínicas también son útiles para formar compuestos conjugados con péptidos enlazadores de GCC por medio de enlaces no peptídicos.

40 **[0155]** Adicionalmente, existen otros métodos para utilizar reactivos para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, composiciones conjugadas pueden ser producidas que incluyen una porción enlazadora de GCC y una porción activa que es una enzima activa. La porción enlazadora de GCC localiza específicamente a la composición conjugada a las células tumorales. Un pro-medicamento inactivo que puede ser convertido por la enzima a un medicamento activo es administrado al paciente. El pro-medicamento es convertido solamente en un medicamento activo por la enzima que se localiza en el tumor. Un ejemplo de una pareja encima/pro-medicamento incluye a fosfatasa alcalina / etoposidefosfato. En un caso como estos, la fosfatasa alcalina es conjugada a un ligando enlazador de GCC. El compuesto conjugado es administrado y localiza a la célula del cáncer. Cuando exista contacto con el etoposidefosfato (el pro-medicamento), el etoposidefosfato es convertido en etopósido, un medicamento quimioterapéutico que es absorbido por la célula cancerígena.

50 **[0156]** Reactivos radiosensibilizadores son sustancias que incrementa la sensibilidad de las células a la radiación. Ejemplos de reactivos radio - sensibilizadores incluyen a nitroimidazoles, metronidazol y misonidazol (refiérase a: DeVita, V.T. Jr. en Harrison's Principles of Internal Medicine (Principios de Harrison de Medicina Interna), p.68, McGraw-Hill Book Co., N.Y. 1983. El compuesto conjugado que comprende un reactivo radio - sensibilizador como la porción significativa es administrado y localiza a la célula cancerígena estomacal o del esófago primaria y/o metastásica. Cuando existe una exposición del individuo a la radiación, el reactivo radio- sensibilizador es "activado" y causa la muerte de la célula.

60 **[0157]** Radionúclidos podrían ser utilizados en composiciones farmacéuticas que son útiles para procedimientos de radioterapia o de toma de imágenes.

65 **[0158]** Ejemplos de radionúclidos útiles como toxinas en terapias de radiación incluyen: ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb y ^{212}Bi . Otros radio nucleótidos que han sido utilizados por aquellas personas con conocimiento normal en la industria incluyen: ^{32}P y ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}MPT , ^{197}Hg , todos emisores negativos y/o de barrena. Algunos radio nucleótidos preferidos incluyen: ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At y $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$.

5 [0159] De acuerdo a este invento, las porciones activas podrían ser reactivos de toma de imágenes. Los residuos de
 10 toma de imágenes son útiles para procedimientos de diagnóstico así como para procedimientos utilizados para
 15 identificar la ubicación de las células cancerígenas. La toma de imágenes puede realizarse con muchos
 procedimientos bien conocidos para aquellas personas con conocimiento normal en la industria y el reactivo de toma
 de imágenes apropiado útil en aquellos procedimientos puede ser conjugado a un ligando de GCC por medio de
 métodos bien conocidos. Las imágenes pueden ser realizadas, por ejemplo, por medio de radioescintigrafía, toma de
 imágenes con resonancia magnética (MRI - magnetic resonance imaging) nuclear o tomografía computarizada
 (detección CT - computed tomography). Los reactivos de tomas de imágenes de radio nucleótidos más utilizados
 comúnmente incluyen yodo e indio radiactivos. La toma de imágenes por medio de una detección CT podría utilizar
 un metal pesado tal como quelantes de hierro. Una detección MRI podría utilizar quelantes de gadolinio o
 manganeso. Adicionalmente, en una tomografía de emisión de positrones (PET - positron emission tomography)
 podría ser posible utilizar emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio. Ejemplos de radio
 nucleótidos útiles para los procedimientos de toma de imágenes incluyen: ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{77}Br ,
 ^{81}Rb / ^{81}MKr , ^{87}MSr , ^{99}MTc , ^{111}In , ^{113}MIn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}I , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{132}I , ^{197}Hg , ^{203}Pb y ^{206}Bi .

20 [0160] Es preferido que las composiciones conjugadas sean no inmunogénicas o inmuno - génicas en un nivel muy
 bajo. Asimismo, es preferible que la porción enlazadora de GCC sea un péptido o un no péptido pequeño no
 inmunogénico o inmunogénico con un nivel muy bajo. La porción enlazadora de GCC puede ser un anticuerpo
 humanizado o primatizado o un anticuerpo de humanos.

25 [0161] Los ligandos de GCC son conjugados para activar reactivos por medio de una variedad de técnicas bien
 conocidas realizadas fácilmente sin experimentación indebida para aquellas personas con conocimiento normal en la
 industria. La técnica utilizada para conjugar el ligando de GCC al reactivo depende de la naturaleza molecular del
 30 ligando GCC y el reactivo. Después de que el ligando de GCC y el reactivo son conjugados para formar una sola
 molécula, se pueden realizar ensayos para asegurar que la molécula conjugada retiene las actividades de las
 porciones. El ensayo de enlaces competitivos descrito anteriormente puede ser utilizado para confirmar que la
 porción enlazadora de GCC retiene su actividad enlazadora como un compuesto conjugado. Similarmente,
 la actividad de la porción activa puede ser probada utilizando varios ensayos para cada tipo respectivo de reactivo. Los
 radio nucleótidos retienen su actividad, es decir, su radiactividad, sin importar la conjugación. En referencia a los
 reactivos que son toxinas, medicamentos y reactivos de dirección, ensayos estándar para demostrar la actividad de
 las formas no conjugadas de estos compuestos pueden ser utilizadas para confirmar que la actividad haya sido
 retenida.

35 [0162] La conjugación puede ser lograda directamente entre el ligando GCC y el reactivo, o vinculando grupos
 moleculares intermedios que pueden ser provistos entre el ligando de GCC y el reactivo. Reticuladores son
 particularmente útiles para facilitar la conjugación al suministrar lugares de adherencia para cada porción. Los
 40 reticuladores pueden incluir grupos adicionales moleculares que sirven como espaciadores para separar a las
 porciones entre sí para evitar que interfieran con la actividad de sus contrapartes.

45 [0163] Una persona con conocimiento normal en la industria podría conjugar un ligando de GCC a un medicamento
 quimioterapéutico utilizando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, Magerstadt, M. Antibody Conjugates and
 Malignant Disease (Conjugaciones de Anticuerpos y Enfermedades Malignas). (1991) CRC Press, Boca Raton,
 Estados Unidos, pp. 110-152) enseña la conjugación de varios medicamentos citostáticos a aminoácidos de
 anticuerpos. Tales reacciones podrían aplicarse para conjugar medicamentos quimioterapéuticos a ligandos de
 GCC, incluyendo anticuerpos anti-GCC, con un reticulador apropiado. La mayoría de los reactivos
 50 quimioterapéuticos que se usan actualmente en tratamiento de cáncer poseen grupos funcionales que son dóciles
 para la reticulación química directa con proteínas. Por ejemplo, grupos de aminos libres están disponibles en
 metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, cis-platino, vindesina, mitomicina y bleomicina
 mientras que los grupos de ácidos carboxílicos libres están disponibles en metotrexato, melfalán y clorambucil. Estos
 grupos funcionales, eso es, aminos libres y ácidos carboxílicos, son objetivos para una variedad de reactivos
 reticuladores químicos o homobifuncionales y heterobifuncionales que pueden reticular a estos medicamentos
 directamente al grupo de aminos libres de un anticuerpo. Por ejemplo, un procedimiento para reticular los ligandos
 55 de GCC que tienen un grupo de aminos libres a reactivos que tienen un grupo de aminos libres tales como el
 metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, cis-platino, vindesina, mitomicina y bleomicina, o
 fosfatasa alcalina, o toxinas en proteínas o toxinas basadas en péptidos que utiliza ésteres de succinimidilo
 homobifuncionales, preferiblemente con espaciadores de cadenas de carbono tales como suberato de
 disuccinimidilo (Pierce Co, Rockford, IL). En caso de que se requiera un compuesto conjugado divisible, el mismo
 60 protocolo sería utilizado usando 3,3'- ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato; Pierce Co.).

65 [0164] Para conjugar un ligando de GCC que es un péptido o una proteína a un reactivo que se basa en un péptido
 tal como una toxina, el ligando GCC y la toxina pueden ser producidos como una sola proteína fusionada ya sea por
 una síntesis estándar de péptidos o por medio de tecnología de ADN recombinante, las cuales pueden ser
 realizadas rutinariamente por aquellas personas que tienen un conocimiento normal en la industria. Alternamente,
 dos péptidos, el péptido ligando de GCC y la toxina que se basa en péptidos pueden ser producidos y/o aislados
 como péptidos separados y ser conjugados utilizando reticuladores. Tal como con las composiciones conjugadas

que contienen medicamentos quimioterapéuticos, la conjugación de péptidos enlazadores de GCC y toxinas pueden explotar la habilidad de modificar el grupo de amino libres individual de un péptido enlazador de GCC mientras se preserva la función enlazadora de receptores de esta molécula.

5 **[0165]** Una persona con conocimiento ordinario en la industria podría conjugar un ligando de GCC a un radionucleótido utilizando técnicas muy conocidas. Por ejemplo, Magerstadt, M. (1991) *Antibody Conjugates And Malignant Disease* (Conjugaciones de Anticuerpos y Enfermedades Malignas), CRC Press, Boca Raton, FLA.; y Barchel, S. W. y Rhodes, B. H., (1983) *Radioimaging and Radiotherapy* (Toma de Imágenes Radiactivas y Radioterapia), Elsevier, NY, NY enseñan la conjugación de varios radionucleótidos terapéuticos y diagnósticos para aminoácidos de anticuerpos.

10 **[0166]** Esta presentación suministra composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos conjugados del invento y portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede ser formulada por una persona con conocimiento normal de la industria. Portadores farmacéuticamente adecuados son descritos en Remington's *Pharmaceutical Sciences* (Ciencias Farmacéuticas de Remington), A. Osol, un texto referencial estándar en este campo. Cuando se ejecuten los métodos aquí presentados, los compuestos conjugados pueden ser utilizados individualmente o en combinación con otros reactivos de diagnóstico, terapéuticos o adicionales. Aquellos reactivos adicionales incluyen excipientes tales como colorantes, agentes estabilizadores, agentes osmóticos y agentes antibacterianos. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente estériles y libres de pirógenos.

15 **[0167]** Las composiciones conjugadas pueden ser, por ejemplo, formuladas como una solución, una suspensión o una emulsión en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de aquellos vehículos son agua, sustancias salinas, la solución de Ringer, solución de dextrosa, y 5 por ciento de albúmina sérica humana. Liposomas también pueden ser utilizados. El vehículo puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, amortiguadores y conservantes). La formulación es esterilizada por técnicas usadas comúnmente. Un ejemplo, una composición parenteral adecuada para la administración por medio de inyección se prepara al disolver 1.5 por ciento de la masa de un ingrediente activo en un 0.9 por ciento de solución de cloruro de sodio.

20 **[0168]** Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas ya sea como una sola dosis o con múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas ya sea como reactivos terapéuticos individuales o en combinación con otros reactivos terapéuticos. Los tratamientos de este invento pueden ser combinados con terapias convencionales, que podrían ser administradas secuencialmente o simultáneamente.

25 **[0169]** Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por medio de cualquier método que permite a la composición conjugada el alcanzar a las células objetivo. En algunas secciones, rutas de administración incluyen aquellas seleccionadas de un grupo que consiste de administración intravenosa, intra - arterial, intra - peritoneal, administración local al suministro de sangre del órgano en el cual el tumor reside o directamente en el tumor en sí. La administración intravenosa es la modalidad preferida de administración. Puede lograrse con la ayuda de una bomba de infusión. Adicionalmente a un spray intra - operativo, los compuestos conjugados pueden ser entregados en forma intratecal, intraventricularmente, estereotácticamente, intrahepáticamente tal como a través de la vena porta, por medio de inhalación e intrapleuralmente.

30 **[0170]** La dosis administrada varía dependiendo de factores tales como: la naturaleza de la porción activa; la naturaleza de la composición conjugada; las características farmacodinámicas; su modalidad y ruta de administración; edad, salud y masa del receptor; naturaleza y magnitud de los síntomas; tipo de tratamiento concurrente; y la frecuencia del tratamiento.

35 **[0171]** Puesto que los compuestos conjugados son dirigidos específicamente a las células con una o más moléculas GCC, compuestos conjugados que comprenden elementos quimioterapéuticos o toxinas son administrados en dosis menores que aquellas que son utilizadas cuando los elementos quimioterapéuticos o toxinas son administrados como reactivos no conjugados, preferiblemente en dosis que contienen hasta 100 veces menos reactivos. En algunas secciones, compuestos conjugados que comprenden elementos quimioterapéuticos y toxinas son administrados en dosis que contienen de 10-100 veces menos reactivos como una porción activa que la dosis de un elemento quimioterapéutico o toxina administrado como reactivos no conjugados. Para determinar la dosis apropiada, el monto del compuesto es medido preferiblemente en moles en vez de por masa. En esta forma, la masa variable de diferentes porciones enlazadoras de GCC no afecta al cálculo. Asumiendo una tasa de uno a uno de la porción enlazadora de GCC a la porción activa en composiciones conjugadas del invento, menos moles de compuestos conjugados podrían ser administrados en comparación con los moles de los compuestos no conjugados administrados, preferiblemente hasta 100 veces menos moles.

40 **[0172]** Comúnmente, las conjugaciones y terapéuticas son administradas intravenosamente en varias dosis divididas.

65

[0173] Hasta 20 gramos IV/dosis de metotrexato es administrado comúnmente en una forma no conjugada. Cuando el metotrexato es administrado como una porción activa en un compuesto conjugado del invento, existe una reducción de dosis de 10 a 100 veces. Por lo tanto, asumiendo que cada compuesto conjugado incluye una molécula de metotrexato conjugada a una porción enlazadora de GCC, del monto total del compuesto conjugado administrado, hasta alrededor de 0.2-2.0 gramos de metotrexato está presente y por lo tanto es administrado. En algunas secciones, el monto total de compuesto conjugado administrado está presente y por lo tanto administrado hasta alrededor de 200 miligramos-2 gramos de metotrexato.

[0174] Para dosificar a las sesiones conjugadas que contienen porciones de enlaces de GCC enlazados a porciones activas que son radioisótopos en composiciones farmacéuticas útiles como reactivos de tomas de imágenes, se asume que cada porción enlazadora de GCC está enlazada a una porción activa radiactiva. El monto del radioisótopo a ser administrado depende del radioisótopo. Aquellas personas con un conocimiento normal en la industria podrán formular fácilmente del monto del compuesto conjugado a ser administrado basándose en la actividad específica y la energía del radionúclido específico utilizado como una porción activa. Típicamente, 0.1-100 milicurios por dosis de reactivo de toma de imágenes, preferiblemente 1-10 milicurios, más a menudo 2-5 milicurios son administrados.

[0175] Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas útiles como reactivos de toma de imágenes que comprenden composiciones conjugadas contienen una porción de enlace de GCC y una porción radiactiva que contiene 0.1-100 milicurios, en algunas secciones preferiblemente 1-10 milicurios, en algunas secciones preferiblemente de 2-5 milicurios, en algunas secciones preferiblemente 1-5 milicurios. Ejemplos de dosis incluyen: ^{131}I = entre alrededor de 0.1-100 milicurios por dosis, en algunas secciones preferiblemente de 1-10 milicurios, en algunas secciones 2-5 milicurios, y en algunas secciones alrededor de 4 milicurios; ^{111}In = entre alrededor de 0.1-100 milicurios por dosis, en algunas secciones preferiblemente de 1-10 milicurios, en algunas secciones 1-5 milicurios, y en algunas secciones alrededor de 2 milicurios; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ = entre alrededor de 0.1-100 milicurios por dosis, en algunas secciones preferiblemente 5-75 milicurios, en algunas secciones 10-50 milicurios, y en algunas secciones alrededor de 27 milicurios. Wessels B.W. y R.D. Rogus (1984) Med. Phys. 11:638 y Kwok, C.S. et al. (1985) Med. Phys. 12:405 presentan cálculos de dosis detalladas para conjugaciones diagnósticas y terapéuticas que pueden ser utilizadas en la preparación de composiciones farmacéuticas que incluyen compuestos conjugados radiactivos.

[0176] También se presenta un método para el tratamiento de individuos que se sospecha padecen de cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico. Aquellos individuos pueden ser tratados por medio de la administración al individuo de una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es un reactivo terapéutico radio-estable. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una partícula enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es un reactivo radio-estable y la porción enlazadora de GCC es un anticuerpo. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción reactiva donde la porción activa es un reactivo terapéutico radio-estable. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que contiene una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es un reactivo radio-estable seleccionado de un grupo que consiste de: metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4 fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cis-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotionina, macromomycin, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de la difteria, fosfolipasa de Clostridium perfringens C, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antiviral de hierba carmín, abrina, cadena A de abrina, factor de veneno de cobra, gelonina, saporina, modecina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. El individuo que está siendo tratado puede ser diagnosticado como portador de cáncer estomacal con metástasis o puede ser diagnosticado como portador de cáncer estomacal o del esófago primario y puede ser sujeto al tratamiento proactivamente en caso de que existiese alguna metástasis que no ha sido detectada. La composición farmacéutica contiene un monto terapéuticamente efectivo de la composición conjugada. Un monto terapéuticamente efectivo es un monto que es efectivo como para causar un efecto citotóxico o citostático en las células cancerígenas sin causar efectos colaterales letales en el individuo.

[0177] También se presenta un método para tratar a individuos que se sospecha padecen de cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico. Aquellos individuos pueden ser tratados por medio de la administración al individuo de una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es radiactiva. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es radiactiva y la porción enlazadora de GCC es un anticuerpo. En algunas instancias, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es un reactivo radiactivo seleccionado de un grupo que consiste de ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{109}Pd , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{33}P , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os ,

¹⁹³MpT, ¹⁹⁷Hg, ³²P y ³³P, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ¹⁹³MpT, ¹⁹⁷Hg, todos emisores negativos y/o de barrena beta. El individuo que está siendo tratado puede ser diagnosticado como portador de cáncer con metástasis o puede ser diagnosticado como portador de cáncer localizado y podría ser sujeto al tratamiento proactivamente en el caso de que existiese metástasis que no ha sido detectada. La composición farmacéutica contiene un monto terapéuticamente efectivo de la composición conjugada. Un monto terapéuticamente efectivo es un monto que ese efectivo para causar un efecto citotóxico o citostático en las células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas sin causar efectos colaterales letales al individuo. La composición puede ser inyectada intratumoralmente en los tumores principales.

5
10
15
20
25
30
35

[0178] También se presenta un método para detectar células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas en un individuo que se sospecha padece de cáncer estomacal o del esófago primario o con metástasis por medio de toma de imágenes radiactivas. Se puede sospechar que individuos tienen tumores estomacales o del esófago primarios y la diagnosis puede ser confirmada administrando al individuo, un reactivo de toma de imágenes que se enlaza a GCC. Se puede tomar imágenes de los tumores al detectar la localización en el esófago o el estómago. A individuos se les puede diagnosticar como que padecen de cáncer estomacal o del esófago con metástasis y las células cancerígenas estomacales o del esófago con metástasis pueden ser detectadas administrando al individuo, preferiblemente por medio de administración intravenosas, una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que comprende una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es radiactiva y detecta la presencia de una acumulación localizada o un aglutinamiento de radiactividad, indicando la presencia de las células con GCC. En algunas secciones de este invento, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que contiene una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción significativa es un elemento reactivo y la porción enlazadora de GCC es un anticuerpo. En algunas secciones, la composición farmacéutica comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto conjugado que contiene una porción enlazadora de GCC y una porción activa donde la porción activa es un reactivo radiactivo seleccionado de un grupo que consiste de: metales pesados reactivos tales como quelantes de hierro, quelantes radioactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, ⁴³K, ⁵²Fe, ⁵⁷Co, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷⁷Br, ⁸¹Rb/⁸¹MKr, ⁸⁷MSr, ⁹⁹MTC, ¹¹¹In, ¹¹³MIn, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹²⁷Cs, ¹²⁹Cs, ¹³¹I, ¹³²I, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Pb y ²⁰⁶Bi. El individuo que está siendo tratado se le puede diagnosticar como portador de cáncer estomacal o del esófago con metástasis o se le puede diagnosticar como portador de cáncer estomacal o del esófago localizado y podría ser expuesto al tratamiento de una forma proactiva en el caso de que existiese una metástasis que todavía no ha sido detectada. La composición farmacéutica contiene un monto diagnósticamente efectivo de la composición conjugada. Un monto diagnósticamente efectivo es un monto que puede ser detectado en un lugar en el cuerpo donde las células con GCC están ubicadas sin causar efectos colaterales letales en el individuo.

Toma de imágenes foto dinámicas y terapia

40
45

[0179] De acuerdo algunas secciones del invento, las porciones enlazadoras de GCC son conjugaciones para reactivos o elementos terapéuticos fotoactivados de toma de imágenes. Maier A. et al. Lasers in Surgery and Medicine (Láseres en Cirugía y Medicina) 26:461-466 (2000) presenta un ejemplo de terapia fotodinámica. QLT, Inc (Vancouver, BC) distribuye comercialmente reactivos fotosensibles que pueden ser vinculados a ligandos de GCC. Aquellos compuestos conjugados pueden ser utilizados en terapias foto - dinámicas y protocolos de toma de imágenes para activar a los reactivos conjugados enlazados con GCC que se usan como blancos en las células tumorales. En algunas secciones, los compuestos conjugados son aplicados a un aerosol intraoperativo el cual es expuesto subsiguientemente a la luz para activar a compuestos enlazados a células que expresan GCC.

50

[0180] En algunas secciones, los reactivos foto - dinámicos son fluoróforo o porfirina. Ejemplos de porfirina incluyen: derivados de hematóporfirina (HPD - hematoporphyrin derivative) y porfímero sódico (Photofrin®). Una 2ª generación de fotos - sensibilizadores es la verteporfin BPD. En algunas secciones el fluoróforo es tetrametilrotamina. Láseres son generalmente la fuente principal de luz utilizada para activar a las porfirinas. Diodos Emisores de Luz (LEDs - Light Emitting Diodes) y fuentes de luz fluorescente también podrían ser utilizados en algunas aplicaciones.

55

[0181] En algunas secciones, el reactivo foto - dinámico es ligado al GCC de la terminal N del GCC.

[0182] Adicionalmente al aerosol intra - operativo, compuestos conjugados pueden derivarse en forma intratecal, intraventricular, estereotáctica, intrahepática tal como a través de la vena porta, por medio de inhalación o en forma intrapleurar.

60 Entrega de medicamentos dirigida en forma general a las células cancerígenas estomacales o del esófago

65

[0183] Otro aspecto del invento se relaciona a las composiciones no conjugadas y conjugadas que comprenden un ligando de GCC utilizado para entregar reactivos terapéuticos a células que comprenden un GCC tal como células cancerígenas estomacales y del esófago primarias y/o metastásicas. En algunas secciones, el reactivo es un medicamento o una toxina tal como: metotrexato, doxorubicina, daunorubicina, citosinarabinósido, etopósido 5-4 fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cis-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotionina, macromomicina,

derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena de ricina A, exotoxina de Pseudomonas, toxina de la difteria, fosfolipasa de Clostridium perfringens C, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antiviral de fitolaca, abrina, cadena A de abrina, factor de veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol y misonidazol. Material genético es entregado a las células cancerígenas para producir un antígeno que puede ser utilizado como objetivo para el sistema inmunológico o para producir una proteína que mate a la célula o inhiba su proliferación. En algunas secciones, el ligando de GCC es utilizado para entregar ácidos nucleicos que codifican las moléculas de ácidos nucleicos que reemplazan genes endógenos defectuosos o que codifican proteínas terapéuticas. En algunas secciones, las composiciones son utilizadas en protocolos de terapia genética para entregar a individuos, el material genético necesitado y/o deseado para contrarrestar una deficiencia genética.

[0184] En algunas secciones, el ligando es combinado con o incorporado a un vehículo de entrega convirtiendo por lo tanto al vehículo de entrega en un vehículo de entrega dirigido específicamente. Por ejemplo, un péptido enlazador de GCC puede ser integrado a la porción exterior de una partícula viral haciendo que el virus sea un virus específico de células que portan a GCC. Asimismo, la proteína de un virus puede ser diseñada para que sea producida como una proteína de fusión que incluye un péptido enlazador de GCC activo que está expuesto o es accesible de otra forma en la parte exterior de la partícula viral haciendo que el virus sea un virus específico de células que portan a GCC. En algunas secciones, un ligando GCC puede ser integrado o incorporado de otra forma en los liposomas donde el ligando de GCC está expuesto o es accesible de otra forma a la parte exterior del liposoma haciendo que aquellos liposomas se dirijan específicamente a las células portadoras de GCC.

[0185] El reactivo en composiciones conjugadas o no conjugadas de acuerdo a este aspecto del invento es un medicamento, una toxina o una molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser un ARN o preferiblemente un ADN. En algunas secciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula antisentido o codifica una secuencia antisentido cuya presencia en la célula inhibe la producción de una proteína no deseada. En algunas secciones, la molécula de ácido nucleico codifica a una ribozima cuya presencia en la célula inhibe la producción de proteínas no deseadas. En algunas secciones, la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o un péptido que es producido en una forma deseable en la célula. En algunas secciones, la molécula de ácido nucleico codifica una copia funcional de un gen que es defectuoso en la célula objetivo. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es vinculada operativamente a los elementos regulatorios necesarios para expresar la secuencia de codificación en la célula.

[0186] Los liposomas son vesículas pequeñas compuestas de lípidos. Estructuras genéticas que codifican a las proteínas que se desea que se expresen las en las células portadoras de GCC introducidas al centro de estas vesículas. La carcasa exterior de estas vesículas comprenden un ligando de GCC. Liposomes (Liposomas) volúmenes 1, 2 y 3 CRC Press Inc. Boca Raton FLA, presentan la preparación de reactivos encapsulados con liposomas que incluyen anticuerpos en la cáscara exterior. En este invento, un ligando de GCC tal como por ejemplo, anticuerpos anti-GCC son asociados con la carcasa exterior. Composiciones no conjugadas que comprenden un ligando de GCC en la matriz de un liposoma con un reactivo adentro incluyen aquellas composiciones en las cuales el ligando de GCC es preferiblemente un anticuerpo

[0187] En una sección, la entrega de copias normales del gen supresor tumoral p53 para las células cancerígenas se logra utilizando un ligando de GCC para dirigir la terapia genética. Las mutaciones del gen supresor de tumores p53 parece jugar un rol importante en el desarrollo de muchos cánceres. Un método para combatir esta enfermedad es la entrega de copias normales de este gen a las células cancerígenas que expresan formas de mutaciones de este gen. Estructuras físicas que comprenden los genes supresores de tumores normales p53 son incorporados a liposomas que comprenden un ligando de GCC. La composición es entregada al tumor. Los ligandos de GCC orientan y dirigen específicamente a los liposomas que contienen el gen normal para corregir la lesión creada por el gen supresor p53. La preparación de estructuras genéticas puede ser realizada por personas que tienen un conocimiento normal en la industria. Este invento permite que aquellas estructuras sean dirigidas específicamente al usar los ligandos de GCC. Las composiciones aquí descritas incluyen un ligando de GCC tal como el anticuerpo anti-GCC asociado con un vehículo de entrega y una estructura genética que comprende una secuencia de codificación para una proteína cuya producción es deseada en las células de la senda intestinal ligadas a las secuencias regulatorias necesarias para su expresión en las células. Para la absorción por parte de las células de la célula intestinal, las composiciones son administradas oralmente o por medio de un enema donde estas entrarán a la senda intestinal y contactan a las células que contienen GCC. Los vehículos de entregas se asocian con la GCC por virtud del ligando de GCC y el vehículo es internalizado a las células o el reactivo/estructura genética es absorbido de otra forma por las células. Una vez internalizada, la estructura puede suministrar un efecto terapéutico al individuo.

Antisentido

[0188] También se presentan equipos y métodos que son útiles para prevenir y tratar a las células cancerígenas estomacales o del esófago al suministrar los medios para entregar específicamente compuestos antisentido a las células cancerígenas del estómago o del esófago y por lo tanto detener la expresión de genes en aquellas células en

las cuales expresiones genéticas no deseables están ocurriendo 100 tener efectos negativos en las células en las que no ocurre aquella expresión.

5 **[0189]** Las composiciones conjugadas son útiles para establecer como objetivo a las células que expresan GCC incluyendo las células cancerígenas estomacales o del esófago. Las composiciones conjugadas no se enlazarán a las células derivadas no colorrectales. Las células no colorrectales, que no tienen GCC, no absorben a las composiciones conjugadas. Las células colorrectales normales tienen GCC y absorberán a las composiciones. Esta presentación cubre a las composiciones y métodos para entregar composiciones antisentido a las células cancerígenas estomacales o del esófago.

10 **[0190]** Esta presentación suministra un método celular específico en el cual solamente células colorrectales normales y cancerígenas y células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas están expuestas a la porción activa del compuesto y sólo aquellas células sufren efectos por el compuesto conjugado. La porción enlazadora de GCC se vincula a células colorrectales cancerígenas y normales y a células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas. En el momento en el que estas células enlazan, el compuesto conjugado es internalizado y la entrega del compuesto conjugado incluyendo la porción antisentido de la molécula tiene efecto. La presencia del compuesto conjugado en las células colorrectales normales no tiene efecto en aquellas células porque el gen asociado con el cáncer para el cual la molécula antisentido que compone a la porción activa del compuesto conjugado que es complementario no se está expresando. Sin embargo, en las células cancerígenas colorrectales, el gen cancerígeno para el cual la molécula antisentido compone a la porción activa del compuesto conjugado es complementario y está siendo expresado. La presencia del compuesto conjugado en las células cancerígenas colorrectales sirve para prevenir o evitar la transcripción o traducción del gen cancerígeno y por lo tanto reducir o eliminar al fenotipo transformado.

25 **[0191]** El compuesto conjugado puede ser utilizado para combatir el cáncer colorrectal, estomacal o del esófago primario y/o con metástasis así como para evitar la aparición del fenotipo transformado en las células normales del colon. Por lo tanto puede ser utilizado terapéuticamente así como profilácticamente.

30 **[0192]** Una persona con conocimiento formal en la industria puede identificar fácilmente individuos que se sospecha padecen de cáncer estomacal o del esófago. En aquellos individuos diagnosticados con cáncer estomacal o del esófago, es terapia estándar es sospechar metástasis e intento dar agresivamente el erradicar a las células con metástasis. Esta presentación suministra composiciones y métodos farmacéuticos para utilizar como objetivo específicamente y eliminar células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas. Además, este invento suministra composiciones farmacéuticas que comprenden elementos terapéuticos y métodos para eliminar específicamente células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas.

35 **[0193]** Esta presentación se basa en el uso de una porción enlazadora de GCC en una composición conjugada. La porciones enlazadora de productos GCC son esencialmente una porción de la composición conjugada que actúa como un ligando a la GCC y por lo tanto se enlaza específicamente a esto los receptores. La composición conjugada también incluye una porción activa que es asociada con la porción enlazadora de GCC; la porción activa puede ser una composición antisentido útil para inhibir o evitar la transcripción o traducción de la expresión de genes cuya expresión es asociada con el cáncer.

40 **[0194]** Aquí se presenta la una porción activa donde la porción activa es una composición antisentido. En particular, la molécula antisentido que compone a la porción significativa de un compuesto conjugado hibrida al ADN o al ARN en una célula cancerígena estomacal o del esófago e inhibe y/o evita la transcripción o traducción del ADN o del ARN para que estos no ocurran. Las composiciones antisentido pueden ser una molécula de ácido nucleico, un derivado o un análogo. La naturaleza única de la composición antisentido puede ser aquella de una molécula de ácido nucleico o una molécula de ácido nucleico modificada o una molécula que no es de ácido nucleico que posee grupos funcionales que mimetizan a una molécula de ADN o de ARN que es complementaria a la molécula de ADN o de ARN cuya expresión debe ser inhibida o prevenida de otra forma. Las composiciones antisentido inhiben o evitan la transcripción o traducción de genes cuya expresión está vinculada al cáncer estomacal o del esófago, es decir genes asociados con el cáncer.

45 **[0195]** Inserciones y eliminaciones de mutaciones de puntos en K-ras y H-ras han sido identificados en los tumores. Las características, rejas de las alteraciones de los oncogenes HER-2/ERBB-2, HER-1/ERBB-1, HRAS-1, C-MYC y anti-oncogenes p53, RB1.

50 **[0196]** La carcinogénesis química en un modelo de rata demostró mutaciones de puntos en fos, un oncogén que media la regulación y proliferación de transcripciones. Refiérase a: Alexander, RJ, et al. Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea (alteraciones oncogénicas en tumores de colon de rata por medio de N-metil-N-nitrosourea). American Journal of the Medical Sciences (Revista Americana de Ciencias Médicas). 303(1):16-24, 1992, enero.

60 **[0197]** La carcinogénesis química en un modelo de rata demostró mutaciones de puntos en la abl. oncogénica. Refiérase a: Alexander, RJ, et al. Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea

(alteraciones oncogénicas en tumores de colon de rata por medio de N-metil-N-nitrosourea). American Journal of the Medical Sciences (Revista Americana de Ciencias Médicas). 303(1):16-24, 1992, enero.

5 **[0198]** MYC es un oncogén que juega un rol en la regulación de transcripciones y de proliferación. Un oligonucleótido antisentido de base 15 para myc complementario a la región de iniciación de traducción de exón II fue incubado con células cancerígenas colorrectales. Esta molécula antisentido inhibió la proliferación de las células cancerígenas colorrectales en una forma dependiente de dosis. Interesantemente, la absorción de este oligonucleótido fue baja (0.7 por ciento). También, la transferencia de un cromosoma normal 5 a las células cancerígenas colorrectales resultó en la regulación de la expresión de myc y la pérdida de proliferación. Esta información sugiere que un gen supresor tumoral importante en la regulación de myc está contenido en este cromosoma.

15 **[0199]** Una fosfatasa de tirosina proteínica nueva, G1, ha sido identificada. La examinación de ARNm que codifica a esta proteína en las células tumorales colorrectales reveló que esta experiencia mutaciones y eliminaciones de punto en estas células y podría jugar un rol en las características de proliferación de estas células. Takekawa, M. et al. Chromosomal localization of the protein tyrosine phosphatase G1 gene and characterization of the aberrant transcripts in human colon cancer cells (localización cromosómica del gen G1 de fosfatasa de tirosina proteínica y la caracterización de transcripciones aberrantes en células cancerígenas del colon humanas). FEBS Letters. 339(3):222-8, 1994 Feb. 21.

20 **[0200]** La gastrina regula el crecimiento de las células cancerígenas del colon por medio de un mecanismo cíclico dependiente de AMP mediado por PKA. Los oligodeoxinucleótidos de la subunidad regulatoria de una clase específica de PKA inhibió los efectos promotores de crecimiento del AMP cíclico en las células de carcinoma del colon. Refiérase a: Bold, RJ, et al. Experimental gene therapy of human colon cancer (terapia genética experimental de cáncer de colon humano). Surgery (cirugía). 116(2):189-95; discusión 195-6, 1994 Aug. y Yokozaki, H., et al. An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells (oligodeoxinucleótidos antisentido que agotan la subunidad alfa RI de la quinasa proteínica cíclica que depende de AMP que inducen la inhibición de crecimiento en las células cancerígenas humanas). Cancer Research (Investigación del Cáncer). 53(4):868-72, 1993 Feb 15.

30 **[0201]** CRIPTO es un gen relacionado con el factor de crecimiento epidérmico expresado en la mayoría de tumores cancerígenos colorrectales. Los oligodeoxinucleótidos fosforotioatos antisentido del extremo 5' de ARNm de CRIPTO redujeron significativamente la expresión de CRIPTO e inhibieron el crecimiento celular tumoral colorrectal in vitro e in vivo. Ciardiello, F. et al. Inhibition of CRIPTO expression and tumorigenicity in human colon cancer cells by antisense RNA and oligodeoxynucleotides (inhibición de la expresión CRIPTO en tumorigenicidad en células cancerígenas del colon humanas por medio de ARN y oligodeoxinucleótidos antisentido) Oncogene (Oncogén). 9(1):291-8, 1994 enero.

40 **[0202]** Muchas células de carcinoma secretan el factor alfa de crecimiento transformante. Un oligonucleótido antisentido del nucleótido 23 al ARNm alfa de TGF inhibió la síntesis y la proliferación del ADN de las células cancerígenas colorrectales. Sizeland, AM, Burgess, AW. Antisense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line (oligonucleótidos alfa del factor de crecimiento transformante antisentido que inhiben la proliferación estimulada autocrina de una línea celular de carcinoma de colon). Molecular Biology of the Cell (Biología Molecular de la Célula). 3(11):1235-43, 1992 Nov.

45 **[0203]** Las composiciones antisentido que incluyen oligonucleótidos, derivados y sus análogos, protocolos de conjugación, y estrategias antisentido para la inhibición de la transcripción y traducción son descritas en general en: Antisense Research and Applications (Investigación y Aplicaciones Antisentido), Croke, S. y B. Lebleu, eds. CRC Press, Inc. Boca Raton FLA 1993; Nucleic Acids in Chemistry and Biology (Ácidos Nucleicos en Química y Biología Blackburn), G. y M.J. Gait, eds. IRL Press at Oxford University Press, Inc. New York 1990; y Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (Oligonucleótidos y Análogos: Un Método Práctico), Eckstein F. ed., IRL Press at Oxford University Press, Inc. Nueva York 1991.

55 **[0204]** Las moléculas antisentido comprenden una secuencia complementaria a un fragmento de un gen cancerígeno colorrectal. Refiérase a Ullrich et al., EMBO J., 1986, 5:2503.

60 **[0205]** Las composiciones antisentido que pueden componer a una porción activa en compuestos conjugados del in vitro incluyen oligonucleótidos formados de homopirimidinas que pueden reconocer estiramientos locales de homopurinas en la hélice doble de ADN y vincularse a estas en la ranura mayor para formar una hélice triple. Refiérase a: Helen, C y Toulme, JJ. Specific regulation of gene expression by antisense, sense, and antigenic nucleic acids (regulación específica de la expresión genética por parte de los ácidos nucleicos antisentido, sentido, y antígenos). Biochem. Biophys Acta, 1049:99-125, 1990. La formación de hélices triples interrumpiría la capacidad del gen específico para experimentar la transcripción por parte de la polimerasa del ARN. La formación de hélices triples utilizando oligonucleótidos específicos de myc ha sido observada. Refiérase a: Cooney, M, et al. Science (Ciencia) 241:456-459.

65

[0206] Los oligonucleótidos antisentido del ADN o del ARN complementarios a las secuencias en los límites entre los intrones y exones pueden ser utilizados para evitar la maduración de las transcripciones de ARN nucleares generada recientemente de genes específicos en el ARNm para la transcripción.

5 **[0207]** El ARN antisentido complementario a genes específicos puede hibridarse con el ARNm para ese gen y prevenir su traducción. El ARN antisentido puede ser provisto a las células como un ARN "listo para ser utilizado" sintetizado in vitro o como un gen antisentido transfectedo establemente a células que generan el ARN antisentido en el momento de la transcripción. La hibridación con el ARNm resulta en una degradación de la moléculas hibridadas por la RNasa H y/o inhibición de la formación de complejos de traducción. Ambos resultan en una falla para producir el producto del gen original.

10 **[0208]** Las secuencias antisentido de ADN o de ARN pueden ser entregadas a las células. Varias modificaciones químicas han sido desarrolladas para prolongar la estabilidad y mejorar la función de estas moléculas sin interferir en la estabilidad para reconocer secuencias específicas. Esto incluye incrementar su resistencia a la degradación por medio de ADNasas, incluyendo fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforotioatos, anómeros alfa, que incrementan su afinidad para su objetivo por medio de enlaces covalentes a varios agentes intercalados tales como psoralenos, y una absorción que se incrementa por las células por la conjugación a varios grupos incluyendo la polilisina. Estas moléculas reconocen secuencias específicas codificadas en el ARNm y su hibridación previene la traducción de, y los incrementos de, la degradación de estos mensajes.

15 **[0209]** Las composiciones conjugadas de la presentación suministran un medio específico y efectivo para terminar la expresión de los genes que causan la transformación neoclásica. Las GCC experimentan una endocitosis inducida por ligandos y puede entregar a los compuestos conjugados al citoplasma de las células.

20 **[0210]** Las porciones enlazadoras de GCC son conjugadas directamente a las composiciones antisentido tales como los ácidos nucleicos que están activos para inducir una respuesta. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido para MYC son conjugados directamente a un anticuerpo anti-GCC. Esto ha sido realizado utilizando péptidos que se enlazan al receptor CD4. Refiérase a: Cohen, JS, ed. Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression (Oligodesoxinucleótidos: Inhibidores Antisentido de Expresiones Genéticas). Topics in Molecular and Structural Biology (Temas en Biología Molecular y Estructural). CRC Press, Inc., Boca Raton, 1989. El esqueleto preciso y su síntesis no son especificados y pueden ser seleccionados de técnicas bien establecidas. La síntesis involucraría una conjugación química o una síntesis directa de la molécula quimérica por medio de síntesis de fases sólidas utilizando química FMOC. Refiérase a: Haralambidis, J, et al. (1987) Tetrahedron (Tetraedro) Lett. 28:5199-5202. Alternamente, la conjugación de péptidos-ácidos nucleicos puede sintetizarse directamente por medio de síntesis de fases sólidas como una quimera de péptidos-ácidos nucleicos de péptidos por medio de una síntesis de fases sólidas. Nielsen, PE, et al. (1994) Sequence-specific transcription arrest by peptide nucleic acid bound to the DNA template strand (paro de transcripciones secuenciales específicas por medio de ácidos nucleicos de péptidos enlazados a cepas de plantillas de ADN). Gene (gen) 149:139-145.

25 **[0211]** En algunas secciones, la polilisina puede ser diseñada para conjugar composiciones del invento en una forma no covalente para ácidos nucleicos y utilizada para mejorar la entrega de estas moléculas al citoplasma de las células. Adicionalmente, los péptidos y proteínas pueden conjugarse a la poli lisina en una forma covalente y esta conjugación con complejos con ácidos nucleicos en una forma no covalente para mejorar aún más la especificidad y eficiencia de absorción de los ácidos nucleicos a las células. Por lo tanto, el ligando de GCC es conjugado químicamente a la poli lisina por medio de técnicas establecidas. La conjugación de ligandos de productos de traducciones polilisina-GCC-1 pueden tener complejos con los ácidos nucleicos que se escojan. Por lo tanto, las conjugaciones de polilisina- orosomucoide fueron utilizadas para plásmidos específicamente que contienen genes a ser expresados para células de hepatomas que expresan al receptor orosomucoide. Este método puede ser utilizado para la entrega de genes u oligonucleótidos completos. Por lo tanto, tiene el potencial de terminar la expresión de un gen no deseado (por ejemplo, MYC, ras) o reemplazar la función de un gen perdido o eliminado (por ejemplo, hMSH2, hMLH1, hPMS1, y hPMS2).

30 **[0212]** De acuerdo a una sección importante, Myc sirve como un gen cuya expresión es inhibida por una molécula antisentido dentro de una composición conjugada. Las porciones enlazadoras de GCC son utilizadas para entregar un oligonucleótido antisentido que se basa en 15 al myc complementario a la región de iniciación de traducción del exón II. El oligonucleótido antisentido de base 15 para el MYC es sintetizado tal como se reportó por Collins, JF, Herman, P, Schuch, C, Bagby GC, Jr. Journal of Clinical Investigation (Revista de Investigación Clínica). 89(5):1523-7, 1992 May. En algunas secciones, la composición conjugada se conjuga a polilisina tal como ha sido reportado previamente. Wu, GY, y Wu, CH. (1988) Evidence for ed gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro (evidencia para la entrega genética de ed para las células de hepatomas G2 in vitro). Biochem. 27:887-892.

35 **[0213]** Las composiciones conjugadas pueden ser sintetizadas como una molécula quimérica directamente por medio de la síntesis de la fase sólida. Concentraciones pmolares y nanomolares para esta conjugación suprimen la síntesis de MYC en las células cancerígenas colorrectales in vitro.

65

[0214] Las moléculas antisentido se inutilizan preferiblemente a, es decir, son complementarias a, una secuencia de nucleótidos que tiene de 5-50 nucleótidos de largo, más preferiblemente de 5-25 nucleótidos y en algunas secciones desde 10-15 nucleótidos.

5 **[0215]** Adicionalmente, emparejamientos equivocados dentro de las secuencias identificadas anteriormente, que logran los métodos del invento, de tal forma que las secuencias mal emparejadas son sustancialmente complementarias a las secuencias genéticas de cáncer también son consideradas dentro del alcance de la presentación. Los emparejamientos equivocados que permiten una complementariedad sustancial a las secuencias genéticas de cáncer serán conocidas por aquellas personas con conocimiento en la industria una vez que estén armadas con esta presentación. Los oligos también pueden ser no modificados o modificados.

10 **[0216]** Las composiciones y métodos terapéuticos pueden ser utilizados para combatir el cáncer estomacal o del esófago en casos donde el cáncer está localizado y/o está acompañado de metástasis. Se les administra a los individuos un monto terapéuticamente efectivo de compuestos conjugados. Un monto terapéuticamente efectivo es un monto que es efectivo para causar un efecto citotóxico o citostático en las células cancerígenas sin causar efectos colaterales letales en el individuo. Un individuo a quien se le ha administrado un monto terapéuticamente efectivo de una composición conjugada tiene una probabilidad incrementada de la eliminación del cáncer estomacal o del esófago en comparación al riesgo si el individuo no hubiera recibido el monto terapéuticamente efectivo.

15 **[0217]** Para tratar el cáncer estomacal o del esófago localizado, un monto terapéuticamente efectivo de un compuesto conjugado es administrado de tal forma que entre en contacto con el tumor localizado. Por lo tanto, el compuesto conjugado puede ser administrado oralmente o en forma intra - tumoral. La formulación oral y rectal son enseñadas en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), 18va edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton PA.

20 **[0218]** Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas por medio de una sola dosis o en múltiples dosis. Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas como agentes terapéuticos individuales o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los tratamientos pueden ser combinados con terapias convencionales, que pueden ser administradas secuencialmente o simultáneamente.

25 **[0219]** Esta presentación es dirigida a un método de entrega de compuestos antisentido a células colorrectales cancerígenas y normales y las células cancerígenas estomacales o del esófago e inhiben la expresión de genes cancerígenos en mamíferos. Los métodos comprenden la administración a un mamífero de un monto efectivo de una composición conjugada que comprende una porción enlazadora de GCC conjugada a un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia que es complementaria a una región de ADN o de ARNm de un gen cancerígeno.

30 **[0220]** Los compuestos conjugados pueden ser administrados a mamíferos en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, seleccionado en referencia a la ruta deseada de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las dosis pueden ser establecidas en relación a la masa, y condición clínica del paciente. Las composiciones conjugadas de este invento serán administradas durante un tiempo suficiente para que los mamíferos se liberen de células no diferenciadas y/o células que dan un fenotipo anormal. En métodos terapéuticos el tratamiento se extiende durante un período suficiente tiempo para inhibir la proliferación células transformadas y las composiciones conjugadas pueden ser administradas en conjunto con otros agentes quimioterapéuticos para administrar y combatir el cáncer del paciente.

35 **[0221]** Los compuestos conjugados pueden ser utilizados en el método individualmente o en combinación con otros compuestos. El monto a ser administrado dependerá de tales factores como la edad, la masa y la condición clínica del paciente. Refiérase a Gennaro, Alfonso, ed., Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), 18va edición, 1990, Mack Publishing Co., Easton PA.

50 **Vacunas terapéuticas y profilácticas**

[0222] También se presenta vacunas didácticas y terapéuticas para proteger a individuos en contra de células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas y para el tratamiento de individuos que padecen de células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas.

[0223] GCC sirve como un objetivo en contra del cual una respuesta inmunológica protectora y terapéutica puede ser inducida. Específicamente, las vacunas son provistas las cuales inducen una respuesta inmunológica en contra de GCC. Las vacunas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes tecnologías de vacunas:

- 60
- 1) Vacunas de ADN, es decir vacunas en las cuales el ADN codifica por lo menos un epítotope de un GCC y es administrado a células del individuo donde el epítotope es expresado y sirve como un blanco para una respuesta inmunológica;
 - 65 2) Vacunas mediadas por un vector infeccioso que es un adenovirus, vaxinia virus, salmonella y BCG recombinantes donde el vector contiene información genética que codifica por lo menos un epítotope de

una proteína de GCC de tal forma que cuando el vector infeccioso es administrado a un individuo, el epítotope es expresado y sirve como un objetivo para una respuesta inmunológica;

- 5
- 3) Vacunas muertas o inactivas que a) comprenden células muertas o partículas virales inactivas que muestran por lo menos un epítotope de una proteína de GCC y b) cuando se administran a un individuo sirven como un objetivo para una respuesta inmunológica;
- 10
- 4) Vacunas haptenizadas muertas o desactivadas que a) se conforman de células muertas o partículas virales desactivadas que muestran por lo menos un epítotope de una proteína de GCC, b) son haptenizadas para ser más inmunogénicas y c) cuando son administradas a un individuo sirven como un objetivo para una respuesta inmunológica;
- 15
- 5) Vacunas tipo subunidades que son vacunas que incluyen moléculas proteínicas que incluyen por lo menos un epítotope de una proteína de GCC; y
- 6) Vacunas tipo subunidades haptenizadas que son vacunas que a) incluyen moléculas proteínicas que incluyen por lo menos un epítotope de una proteína de GCC y b) son haptenizadas para ser más inmunogénicas.

20

[0224] Esta presentación se relaciona a la administración a un individuo de una molécula proteínica o de ácidos nucleicos que comprenden o codifican, respectivamente, un epítotope inmunogénico en contra del cual una respuesta inmunológica terapéutica y profiláctica puede inducirse. Aquellos epítotos son generalmente de por lo menos 6-8 aminoácidos de largo. Las vacunas por lo tanto comprenden proteínas que son por lo menos, o ácidos nucleótidos que codifican por lo menos a de 6-8 aminoácidos de largo de una proteína de GCC. Las vacunas pueden comprender proteínas que tienen por lo menos, o ácidos nucleicos que codifican a por lo menos 10 a alrededor de 25

25

comprender proteínas que tienen por lo menos, o ácidos nucleicos que codifican a por lo menos 10 a alrededor de 1000 aminoácidos de largo. Las vacunas pueden comprender proteínas que tienen por lo menos, o ácidos nucleicos que codifican a por lo menos, alrededor de 25 a 500 aminoácidos de largo. Las vacunas pueden comprender a proteínas que tienen por lo menos, o ácidos nucleicos que codifican a por lo menos, 50 alrededor de 400 aminoácidos de largo. Las vacunas pueden comprender a proteínas que tienen por lo menos, o ácidos nucleicos que codifican a por lo menos, alrededor de 100 a 300 aminoácidos de largo.

30

[0225] También se presenta composiciones para, y métodos para el tratamiento de individuos que se conoce que portan células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas. El cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico puede ser diagnosticado.

35

[0226] por aquellas personas con conocimiento normal en la industria que utilizan los métodos aquí descritos o protocolos patológicos clínicos y de laboratorio aceptados en la industria. También se presenta una vacuna inmuno-terapéutica para tratar a individuos a quienes se les ha diagnosticado que padecen cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico. Las vacunas inmuno-terapéuticas pueden ser administradas en combinación con otras terapias.

40

[0227] También se presentan composiciones para y métodos para prevenir el cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico en individuos que se sospecha son susceptibles al cáncer estomacal o del esófago. Aquellos individuos incluyen aquellas personas que su historial médico familiar indica una incidencia que supera al promedio de cáncer estomacal o del esófago entre los miembros familiares y/o aquellas personas que ya han desarrollado cáncer estomacal o del esófago y se les ha tratado efectivamente y por lo tanto enfrentan un riesgo de relapso y de reincidencia. Aquellos individuos incluyen personas que han sido diagnosticadas o que tienen cáncer estomacal o del esófago incluyendo cáncer estomacal o del esófago localizado solamente o localizado y con metástasis que ha sido extirpado o tratado de otra forma. Las vacunas pueden ser administradas a individuos en una forma profiláctica para prevenir y combatir cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico.

45

50

[0228] La presentación se relaciona a composiciones las cuales son los componentes activos de aquellas vacunas o son requeridas para hacer los componentes activos, a los métodos para hacer aquellas composiciones incluyendo los componentes activos, y a los métodos para hacer y utilizar las vacunas.

55

[0229] Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos del GCC están establecidas como la IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1.

60

[0230] También se presentan vectores recombinantes, incluyendo vectores de expresión, que comprenden a la transcripción genética de GCC o a uno de sus fragmentos. También se presentan vectores recombinantes, incluyendo vectores de expresión que comprenden a las secuencias de nucleótidos que codifican a una proteína de GCC o uno de sus fragmentos funcionales.

65

[0231] También se presentan células anfitrionas que comprenden aquellos vectores y métodos para hacer a la proteína de GCC utilizando células recombinantes.

[0232] También se presenta la transcripción genética aislada de GCC y las proteínas aisladas de GCC y anticuerpos aislados específicos para aquellas proteínas e hibridomas que producen aquellos anticuerpos.

5 **[0233]** También se presentan a GCC aislados y sus fragmentos funcionales. Asimismo, algunos aspectos de la presentación se relaciona a proteínas aisladas que comprenden por lo menos un epítotope de una GCC.

10 **[0234]** Algunos aspectos de la presentación se relacionan a las proteínas aisladas que se acaba de describir las cuales son haptenizadas para que sean más inmunogénicas. Eso es, algunos aspectos de la presentación se relaciona a proteínas haptenizadas que comprenden por lo menos un epítotope de GCC.

[0235] Asimismo, algunos aspectos de la presentación se relacionan a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican proteínas que comprenden por lo menos un epítotope de GCC.

15 **[0236]** Vacunas puras de ADN son descritas en PCT/US90/01515. Otros enseñan el uso de transferencias de ADN mediadas por liposomas, entrega de ADN utilizando micro - proyectiles (patente de Estados Unidos número 4,945,050 emitida el 31 de julio de 1990 por Sanford et al.), y la entrega de ADN utilizando electroporación. En cada caso, el ADN puede ser un ADN de plásmidos que es producido en bacterias, aislado y administrado al animal que va a ser tratado. Las moléculas de ADN de plásmidos son absorbidas por las células del animal donde las secuencias que codifican a la proteína de interés son expresadas. La proteína producida, por lo tanto, suministra un efecto terapéutico o profiláctico en el animal.

20 **[0237]** El uso de vectores incluyendo vectores virales y otros medios de entrega de moléculas de ácidos nucleicos a células de un individuo para producir un efecto inmunológico terapéutico y/o profiláctico en el individuo es una práctica muy conocida.

25 **[0238]** Las vacunas recombinantes que utilizan vectores de vaccinia son, por ejemplo, presentadas en la patente de Estados Unidos número 5,017,487 emitida el 21 de mayo de 1991 a Stunnenberg et al.

30 **[0239]** En algunos casos, las células tumorales del paciente son eliminadas o desactivadas y se las administra como un producto de vacuna. Berd et al. May 1986 Cancer Research (Investigación del Cáncer) 46:2572-2577 y Berd et al. May 1991 Cancer Research (Investigación del Cáncer) 51:2731-2734, describe la preparación y utilización de productos de vacunas que se basan en células tumorales.

35 **[0240]** De acuerdo a algunos aspectos de esta presentación, los métodos y técnicas descritos en Berd et al. son adaptados al utilizar células cancerígenas estomacales o del esófago en vez de células de la melanoma.

40 **[0241]** La fabricación y la utilización de productos de traducción aislados y sus fragmentos útiles para ejemplos como reactivos de laboratorios o componentes de vacunas tipo subunidades es una práctica muy conocida en la industria. Una persona con conocimiento normal en la industria puede aislar la transcripción genética de GCC o su porción específica que codifica a la GCC o a uno de sus fragmentos. Una vez aislada, la molécula de ácido nucleico puede ser insertada en un vector de expresión utilizando técnicas estándar y materiales iniciales que se pueden encontrar fácilmente.

45 **[0242]** El vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica a la molécula de ácidos nucleicos que codifica a la GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que comprende a la GCC o a uno de sus fragmentos. Los vectores de expresión recombinantes del invento son útiles para transformar a los anfitriones para preparar sistemas de expresión recombinantes para preparar las proteínas aisladas.

50 **[0243]** Esta presentación se relaciona a una célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica a la proteína GCC o a uno de sus fragmentos o a una GCC o a uno de sus fragmentos. Las células anfitrionas para su uso en sistemas de expresión recombinantes bien conocidos para la producción de proteínas son bien conocidas y fáciles de conseguir. Ejemplos de células anfitrionas incluyen a células bacterianas tales como el E. coli, células de la levadura tal como la S. cerevisiae, células de insectos tales como la S. frugiperda, células de cultivos de tejidos de mamíferos no humanas tales como las células de ovarios de hámster (CHO - chinese hamster ovary) y células de cultivos de tejidos humanos tales como las células HeLa.

55 **[0244]** Esta presentación se relaciona a un mamífero no humano transgénico que comprende el vector de expresión recombinante que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas del invento. Los mamíferos no humanos transgénicos útiles para producir las proteínas recombinantes son bien conocidos así como los vectores de expresión necesarios y las técnicas para generar animales transgénicos. Generalmente, el animal transgénico comprende un vector de expresión recombinante en el cual la secuencia de nucleótidos que codifica al GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que comprende la GCC o uno de sus fragmentos vinculados operativamente a un promotor específico de células de mamíferos donde la secuencia codificadora sólo es expresada en células de mamíferos y la proteína recombinante expresada de esa forma es recuperada de la leche del animal.

60 **[0244]** Esta presentación se relaciona a un mamífero no humano transgénico que comprende el vector de expresión recombinante que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas del invento. Los mamíferos no humanos transgénicos útiles para producir las proteínas recombinantes son bien conocidos así como los vectores de expresión necesarios y las técnicas para generar animales transgénicos. Generalmente, el animal transgénico comprende un vector de expresión recombinante en el cual la secuencia de nucleótidos que codifica al GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que comprende la GCC o uno de sus fragmentos vinculados operativamente a un promotor específico de células de mamíferos donde la secuencia codificadora sólo es expresada en células de mamíferos y la proteína recombinante expresada de esa forma es recuperada de la leche del animal.

65 **[0244]** Esta presentación se relaciona a un mamífero no humano transgénico que comprende el vector de expresión recombinante que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas del invento. Los mamíferos no humanos transgénicos útiles para producir las proteínas recombinantes son bien conocidos así como los vectores de expresión necesarios y las técnicas para generar animales transgénicos. Generalmente, el animal transgénico comprende un vector de expresión recombinante en el cual la secuencia de nucleótidos que codifica al GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que comprende la GCC o uno de sus fragmentos vinculados operativamente a un promotor específico de células de mamíferos donde la secuencia codificadora sólo es expresada en células de mamíferos y la proteína recombinante expresada de esa forma es recuperada de la leche del animal.

[0245] En algunas secciones, por ejemplo, una persona con conocimiento normal en la industria puede, utilizando técnicas muy conocidas, insertar aquellas moléculas de ADN en un vector de expresión que es comercialmente disponible para su uso en sistemas de expresión muy conocidos tales como aquellos aquí descritos.

5 **[0246]** El vector de expresión que incluye al ADN que codifica a la GCC o uno de sus fragmentos funcionales o una proteína que comprende una GCC o uno de sus fragmentos funcionales es utilizado para transformar al anfitrión compatible que es cultivado y mantenido bajo condiciones donde la expresión del ADN foráneo ocurre. La proteína, por lo tanto, producida es recuperada del cultivo, ya sea al lisar las células o del medio de cultivo de acuerdo a como sea apropiado y conocido para aquellas personas con conocimiento en la industria. Los métodos para purificar la GCC o uno de sus fragmentos o una proteína que contiene los mismos anticuerpos a utilizarse que se enlazan específicamente a la proteína son conocimientos comunes en la industria. Anticuerpos que se enlazan específicamente de a una proteína en particular pueden ser utilizados para purificar la proteína de las fuentes naturales utilizando técnicas muy conocidas y materiales de inicio que pueden encontrarse fácilmente. Aquellos anticuerpos también puede ser utilizados para purificar la proteína de materiales presentes cuando se produce la proteína por medio de la metodología de ADN recombinante. Esta presentación se relaciona a anticuerpos que se enlazan a un epítipo que está presente en uno o más productos de traducción de la GCC-1 o uno de sus fragmentos o una proteína que posee el mismo contenido. Los anticuerpos que se enlazan a un epítipo que está presente en la GCC son útiles para aislar y purificar a la proteína de fuentes naturales o de sistemas de expresión recombinantes utilizando técnicas muy conocidas tales como la cromatografía de afinidad. Las técnicas de afinidad generalmente son descritas en Waldman et al. 1991 *Methods of Enzymol* (Métodos de Enzimología). 195:391-396. Los anticuerpos son útiles para detectar la presencia de aquella proteína en una muestra y para determinar si las células están expresando a la proteína. La producción de anticuerpos y las estructuras proteínicas para completar, anticuerpos intactos, fragmentos Fab y fragmentos F(ab)₂ y la organización de secuencias genéticas que codifican a aquellas moléculas son métodos conocidos y son descritos, por ejemplo, en Harlow, E. y D. Lane (1988) *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* (ANTICUERPOS: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

30 **[0247]** En algunas secciones animales no humanos transgénicos son generados. Los animales transgénicos contienen nucleótidos que codifican a la GCC o a uno de sus fragmentos o una proteína que posee el mismo contenido bajo el control regulatorio de un promotor específico mamífero. Una persona con conocimiento normal en la industria utilizando técnicas estándar, tales como aquellas enseñadas en la patente de Estados Unidos número 4,873,191 emitido el 10 de octubre de 1989 para Wagner y la patente de Estados Unidos número 4,736,866 emitida el 12 de abril de 1988 para Leder, puede producir animales transgénicos que producen GCC o uno de sus fragmentos o una proteína que tiene el mismo contenido. Los animales preferidos son cabras y roedores, particularmente ratas y ratones.

40 **[0248]** Adicionalmente a producir estas proteínas por técnicas recombinantes, sintetizadores de péptidos automatizados también pueden ser utilizados para producir GCC o uno de sus fragmentos o una proteína que tiene el mismo contenido. Aquellas técnicas son muy conocidas para aquellas personas con conocimiento normal en la industria y son útiles si derivados que tienen sustituciones no son provistas en la producción proteínica codificada por ADN.

45 **[0249]** En algunas secciones, la proteína que compone una vacuna tipo subunidad o las células o partículas de una vacuna desactivada pueden ser hapnetizadas para incrementar la inmunogenicidad. En algunos casos, la hapnetización es la conjugación de una estructura molecular más grande para la GCC o uno de sus fragmentos o una proteína que tiene el mismo contenido. En algunos casos, las células tumorales del paciente son eliminadas y hapnetizadas como un medio para hacer un producto de vacuna efectivo. En casos donde otras células, tales como células bacterianas o eucariotas que son provistas con la información genética para hacer y mostrar una GCC o uno de sus fragmentos o una proteína con el mismo contenido, es eliminada y utilizada como el componente de vacuna activo, aquellas células son hapnetizadas para incrementar la inmunogenicidad. La hapnetización es bien conocida y puede realizarse fácilmente.

55 **[0250]** Métodos para hapnetizar células en forma general y células tumorales en particular se describen en Berd et al. May 1986 *Cancer Research* (Investigación del Cáncer) 46:2572-2577 y Berd et al. May 1991 *Cancer Research* (Investigación del Cáncer) 51:2731-2734. Protocolos adicionales de haptización son presentados en Miller et al. 1976 *J. Immunol.* 117(5:1):1591-1526.

60 **[0251]** Las composiciones y métodos de haptización que pueden ser adaptados para ser utilizados para preparar inmunógenos de GCC hapnetizados incluyen aquellos descritos en las siguientes patentes de Estados Unidos: patente de Estados Unidos número 5,037,645 emitida el 6 de agosto de 1991 a Strahilevitz; la patente de Estados Unidos número 5,112,606 emitida el 12 de mayo de 1992 a Shiosaka et al.; la patente de Estados Unidos número 4,526,716 emitida el 2 de julio de 1985 a Stevens; la patente de Estados Unidos número 4,329,281 emitida el 11 de mayo de 1982 a Christenson et al.; y la patente de Estados Unidos número 4,022,878 emitida el 10 de mayo de 1977 a Gross. Las vacunas de péptidos y métodos para mejorar la inmunogenicidad de péptidos que pueden adaptarse para modificar los inmunógenos de GCC también se describen en Francis et al. 1989 *Methods of Enzymol* (Métodos de Enzimología). 178:659-676. Sad et al. 1992 *Immunology* (Inmunología) 76:599-603, enseña métodos para

elaborar vacunas inmuno-terapéuticas al conjugar la hormona que libera a la gonadotropina al toxoide de la difteria. Los inmunógenos de GCC pueden conjugarse similarmente para producir una vacuna inmuno-terapéutica. MacLean et al. 1993 Cancer Immunol. Immunother (Inmunología del Cáncer. Otras Inmunologías). 36:215-222, describe metodologías de conjugación para producir vacunas inmuno-terapéuticas que pueden ser adaptadas para producir una vacuna inmuno-terapéutica de este invento. El hapteno es la hemocianina de lapa de ojo de cerradura que puede conjugarse al inmunógeno de GCC.

[0252] Las vacunas como se las presenten este documento comprenden un portador farmacéuticamente aceptable en combinación con un inmunógeno de GCC.

[0253] Las formulaciones farmacéuticas son bien conocidas y composiciones farmacéuticas que contienen a aquellas proteínas pueden ser formuladas rutinariamente por una persona con conocimiento normal en la industria. Los portadores farmacéuticos apropiados son descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas de Remington), A. Osol, un texto referencial estándar en este campo. Esta presentación se relaciona a una composición farmacéutica inyectable que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un inmunógeno GCC. El inmunógeno de GCC es preferiblemente estéril y combinado con un portador farmacéuticamente estéril.

[0254] En algunos ejemplos, la GCC o uno de sus fragmentos o una proteína con el mismo contenido puede formularse en forma de una solución, una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de aquellos vehículos son agua, soluciones salinas, la solución de Ringer, la solución de dextrosa, y un 5 por ciento de albúmina sérica humana. Los liposomas y los vehículos no acuosos tales como aceites fijos también podrían ser utilizados. El vehículo o el polvo liofilizado pueden contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, amortiguadores y conservantes). La formulación es esterilizada por medio de técnicas usadas comúnmente.

[0255] Una composición inyectable podría comprender el inmunógeno de GCC en un agente diluyente tal como, por ejemplo, agua estéril, electrolitos/dextrosa, aceites grasos de receptores vegetales con alta afinidad y especificidad que no están relacionados con el ligando natural de aquel receptor. Por lo tanto, es una tarea relativamente fácil para una persona con conocimiento normal en la industria para identificar grupos de aminoácidos que ocurren naturalmente, aminoácidos naturales o compuestos orgánicos que pueden enlazarse específicamente y en una forma segura a la GCC, que porta una relación estructural aún anticuerpo anti-GCC.

[0256] Para identificar ligandos de GCC que son péptidos, aquellas personas con un conocimiento normal en la industria pueden utilizar cualquiera de las metodologías muy conocidas para examinar bibliotecas de péptidos aleatorias para identificar a péptidos que se enlazan a la GCC. En las metodologías más básicas, los péptidos que se enlazan al objetivo son aislados y secuenciados. En algunas metodologías, cada péptido aleatorio es vinculado a una molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia codificadora para aquel péptido aleatorio particular. Los péptidos aleatorios, cada uno con una secuencia codificadora adherida, son contactados con una GCC y los péptidos que no están enlazados a la GCC son removidos. La molécula de ácido nucleico que incluye la secuencia codificadora del péptido que se enlaza a la GCC puede entonces ser usada para determinar la secuencia de aminoácidos del péptido así como para producir grandes cantidades del péptido. También es posible producir bibliotecas de péptidos en soportes sólidos donde la ubicación espacial en el soporte corresponde a una síntesis específica y por lo tanto a un péptido específico. Aquellos métodos a menudo usan pasos similares a la fotolitografía para crear diversas bibliotecas de péptidos en soportes sólidos en los cuales la dirección espacial en el soporte permite la determinación de la secuencia.

[0257] La producción de bibliotecas de compuestos orgánicos en soportes sólidos también puede ser utilizada para producir bibliotecas combinatorias de compuestos no péptidos tales como oligonucleótidos y azúcares, por ejemplo. Como en el caso de las bibliotecas de péptidos en soportes sólidos, la ubicación espacial en el soporte corresponde a una síntesis específica y, por lo tanto, a un compuesto específico. Aquellos métodos a menudo usan pasos como la fotolitografía para crear bibliotecas diversas de compuestos en soportes sólidos en los cuales la dirección espacial en el soporte permite la determinación del esquema de síntesis que produjo al compuesto. Una vez que el esquema sintético es identificado, la estructura del compuesto se vuelve conocida.

[0258] Gallop et al. 1994 J. Medicinal Chemistry (química medicinal) 37:1233, suministra una revisión de varias metodologías para examinar a bibliotecas aleatorias de péptidos e identificar péptidos de aquellas bibliotecas que se enlazan a proteínas objetivo. Siguiendo estas enseñanzas, los ligandos específicos de GCC y que son péptidos y que son útiles como porciones enlazadoras específicas de GCC pueden ser identificadas por aquellos con un conocimiento normal en la industria.

[0259] Los péptidos y las proteínas mostrados en las partículas de fagos son descritas en Gallop et al., mencionado anteriormente. Grupos aleatorios de ácidos nucleicos pueden ser insertados en genes que codifican a proteínas superficiales del bacteriófago que son utilizadas para infectar a las bacterias, produciendo que los fagos que expresan en los péptidos codificados por el grupo aleatorio de nucleótidos en su superficie. Éstos fagos que muestran al péptido pueden ser utilizados para determinar si es que aquellos péptidos se enlazan a proteínas,

- receptores, anticuerpos específicos, etcétera. La identidad del péptido puede determinarse al secuenciar el ADN recombinante proveniente del fago que expresa al péptido. Este método tiene el potencial para producir muchas agrupaciones de péptidos en una biblioteca (hasta 10^9 péptidos únicos). Esta técnica ha sido utilizada para identificar péptidos enlazadores nuevos al receptor fibrinógeno en plaquetas, que no portan ninguna homología secuencial a los ligandos que ocurren naturalmente de este receptor (Smith et al., 1993 Gene (Gen) 128:37). Asimismo, esta técnica ha sido aplicada para identificar a péptidos que se enlazan al receptor de clase II MHC (Hammer et al., 1993 Cell (Célula) 74:197) y al receptor de chaperonina (Blond-Elguindi et al., 1993 Cell (Célula) 75:717).
- 5
- [0260]** Los péptidos mostrados en plásmidos son descritos en Gallop et al., mencionado anteriormente. En este método, los oligonucleótidos aleatorios que codifican a la biblioteca de péptidos pueden ser expresados en un plásmido específico cuya expresión está bajo el control de un promotor específico, tal como el operón lac. Los péptidos son expresados como proteínas de fusión acopladas a la proteína Lac I, bajo el control del operón lac. La proteína de fusión se enlaza específicamente al operador lac en el plásmido y de esa forma el péptido aleatorio es asociado con el elemento de ADN específico que lo codifica. De esta forma, la secuencia del péptido puede ser deducida, por medio del PCR del ADN asociado con la proteína de fusión. Estas proteínas pueden ser examinadas en la fase de solución para determinar si ellas enlazan a receptores específicos. Utilizando este método, sustratos nuevos han sido identificados para enzimas específicas (Schatz 1993).
- 10
- [0261]** Una variación de la técnica que se acaba de mencionar, también descrita en Gallop *et al.*, mencionado anteriormente, puede utilizarse en la cual los oligonucleótidos aleatorios que codifican a las bibliotecas de péptidos en los plásmidos pueden expresarse en sistemas libres de células. En este método, una biblioteca de ADN molecular puede construirse la cual contenga el grupo aleatorio de oligonucleótidos, los cuales son expresados entonces en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*. La identidad del ligando es determinada al purificar el complejo de péptidos /polisomas de cadenas nacientes que contienen al ARNm de interés en resinas de afinidad compuestas del receptor y después de eso secuenciando después de la amplificación con RT-PCR. Utilizando esta técnica permite la generación de grandes bibliotecas (hasta 10^{11} recombinantes). Péptidos que reconocen: anticuerpos dirigidos específicamente a dinorfinas han sido identificados utilizando esta técnica (Cull et al., 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89:1865).
- 15
- [0262]** Bibliotecas de péptidos puede ser generadas al examinarse en contra de un receptor por medio de síntesis química. Por ejemplo, la preparación simultánea de grandes números de péptidos diversos se ha generado utilizando el método de síntesis múltiple de péptidos tal como se describió en Gallop et al., mencionado anteriormente. En una aplicación, los péptidos aleatorios son generados por medio de síntesis estándar de Merrifield en fase sólida en placas de micro titulación de poliacrilamida (síntesis de varios pines) la cual es subsiguientemente examinada para determinar su habilidad para completar con el enlazamiento al receptor en un ensayo estándar de enlazamiento competitivo (Wang et al., 1993 Bioorg. Med. Chem. Lett. 3:447). En efecto, este método ha sido utilizado para identificar péptidos enlazadores nuevos al receptor de la sustancia P (Wang et al. mencionado anteriormente). Asimismo, las bibliotecas de péptidos pueden ser construidas por medio de síntesis múltiples de péptidos utilizando el método "bolsa de té" en el cual bolsas de resina del soporte sólido son incubadas subsiguientemente con varios aminoácidos para generar grupos de diferentes péptidos (Gallop *et al.* mencionado anteriormente). Utilizando este método, péptidos que se enlazan al receptor de integrina (Ruggeri et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 83:5708) y el receptor del neuropéptido Y (Beck-Sickinger et al., 1990 Int. J. Peptide Protein Res. (Res. Proteína de Péptido) 36:522) fueron identificados.
- 20
- [0263]** En general, la generación y la utilidad de bibliotecas combinatorias depende de (1) un método para generar grupos diversos de bloques de construcción, (2) un método para identificar miembros del grupo que producen la función deseada, y (3) un método para la deducción de la estructura de aquel miembro. Varios métodos para estas limitaciones han sido definidos.
- 25
- [0264]** La siguiente es una descripción de los métodos de generación de bibliotecas que pueden ser utilizados en los procedimientos para identificar ligandos de GCC de acuerdo al invento.
- 30
- [0265]** Las modificaciones de los métodos que se acaban de mencionar pueden ser utilizadas para generar bibliotecas de diversidad molecular vasta al conectar y juntar a los miembros de un conjunto de bloques de construcción químicos, tales como aminoácidos, en todas las combinaciones posibles (Gallop et al. mencionado anteriormente). En un método, las mezclas de monómero activados son emparejadas a una cadena creciente de aminoácidos en un soporte sólido en cada ciclo. Este es un sistema sintético multivalente.
- 35
- [0266]** Además, una síntesis dividida involucra el incubar la cadena creciente en reacciones individuales de contienen solamente un solo bloque de construcción (Gallop et al. mencionado anteriormente). Después de la adherencia, la resina de todas las reacciones es mezclada y puesta en porciones en reacciones individuales para el próximo paso del emparejamiento. Estos métodos producen una colección estocástica de n^x péptidos diferentes para su examinación, donde n es el número de bloques de construcción y x es el número de ciclos de reacción.
- 40
- [0267]** Alternamente, grupos de moléculas pueden ser generados en los cuales una o más posiciones contengan aminoácidos conocidos, mientras el resto son aleatorios (Gallop et al. mencionado anteriormente). Estos producen
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

una biblioteca limitada que es examinada en búsqueda de miembros con la actividad deseada. Estos miembros son identificados, su estructura es determinada, y la estructura es regenerada con otra posición que contiene aminoácidos definidos y examinados. Este método iterativo produce finalmente péptidos que son óptimos para el reconocimiento del bolsillo enlazador de conformación de un receptor.

5 [0268] Adicionalmente, los grupos no son limitados a aminoácidos que forman péptidos, pero pueden ser extendidos a agrupaciones lineales y no lineales de moléculas orgánicas (Gordon et al., 1994 J. Medicinal Chemistry (Química Médica) 37:1385). En efecto, con la implementación de este método para generar bibliotecas de bloques de construcción inorgánicos agrupados aleatoriamente, se identificaron ligandos que se enlazan a receptores de la

10 transmembrana 7 (Zuckermann et al., 1994 J. Med. Chem. 37:2678).

15 [0269] Se están elaborando bibliotecas en la actualidad que pueden ser modificadas después de la síntesis para alterar los grupos y enlaces laterales químicos, para dar grupos “diseñadores” para probar su interacción con receptores (Osteresh et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91:11138). Esta técnica, generadora de “bibliotecas a partir de bibliotecas”, fue aplicada para la permitación de una biblioteca de péptidos que produjo compuestos con una actividad antimicrobiana selectiva en contra de bacterias gram positivas.

20 [0270] Las bibliotecas también están siendo construidas para expresar grupos de motivos farmacológicos, en vez de grupos estructurales específicos de aminoácidos (Sepetov et al., 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 92:5426). Esta técnica busca el identificar motivos estructurales que tienen afinidades específicas para receptores, que pueden ser modificados en refinamientos más detallados utilizando las bibliotecas para definir las relaciones estructura-actividad. Implementando este método de búsqueda de bibliotecas de motivos, la generación de “bibliotecas de bibliotecas”, reduce el número de miembros componentes requeridos para examinar en una fase temprana de la examinación de la biblioteca.

25 [0271] La siguiente es una descripción de los métodos para identificar ligandos de GCC de acuerdo al invento a partir de bibliotecas de moléculas generadas aleatoriamente.

30 [0272] Componentes en la biblioteca que interactúan con los receptores pueden ser identificados por sus enlaces a los receptores inmovilizados en un soporte sólido (Gordon et al. mencionado anteriormente).

[0273] También podrían ser identificados por su habilidad para competir con ligandos naturales para enlazarse a receptores afines en la fase de solución (Gordon et al. mencionado anteriormente).

35 [0274] Los componentes pueden ser identificados por sus enlaces a receptores solubles cuando estos componentes están inmovilizados en soportes sólidos (Gordon et al. mencionado anteriormente).

40 [0275] Una vez que un miembro de una biblioteca que se enlaza a receptores ha sido identificada, la estructura de aquel miembro debe ser deducida para identificar la estructura y generar grandes cantidades para trabajar con, o desarrollar, más análogos para estudiar las relaciones estructura-actividad. La siguiente es una descripción de los métodos de deducción de la estructura de las moléculas identificadas como ligandos de GCC potenciales de acuerdo al invento.

45 [0276] Las bibliotecas de péptidos pueden expresarse en la superficie de partículas bacteriófagas (Gallop et al. mencionado anteriormente). Una vez que el péptido que interactúa con el receptor ha sido identificado, su estructura puede ser deducida al aislar al ADN del fago y determinar secuencia por medio de PCR.

50 [0277] Las bibliotecas expresadas en plásmidos, bajo el control del operón Lac pueden ser reducidas puesto que estos péptidos están fusionados con la proteína Lac I que interactúa específicamente con el operón lac en el plásmido que codifica al péptido (Gallop et al. mencionado anteriormente). La estructura puede ser deducida al aislar a aquel plásmido adherido a la proteína de lac I y deducir la secuencia de nucleótidos y de péptidos por medio de PCR.

55 [0278] Las bibliotecas expresadas en plásmidos también pueden ser expresadas en sistemas libres de células utilizando sistemas de transcripción/traducción (Gallop *et al. mencionado anteriormente*). En este paradigma, la secuencia del péptido es deducida por medio de RT-PCR del ARNm asociado.

60 [0279] La construcción de la biblioteca puede ser acoplada con fotolitografía, de tal forma que la estructura de cualquier miembro de la biblioteca puede ser deducido al determinar su posición dentro del grupo de sustratos (Gallop *et al. mencionado anteriormente*). Esta técnica es denominada direcciones posicionales, puesto que la información estructural puede ser deducida por medio de la posición exacta del miembro.

65 [0280] Los miembros de una biblioteca también pueden ser identificados al marcar a la biblioteca con agrupaciones identificables de otras moléculas (Ohlmeyer et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90:10922, y Gallop et al., mencionado anteriormente). Esta técnica es una modificación de la asociación del péptido con el plásmido del fago que codifica a la secuencia, descrita anteriormente. Algunos métodos utilizan agrupaciones de nucleótidos para

- codificar al historial sintético secuencial del péptido. Por lo tanto, los nucleótidos son adheridos al péptido que está creciendo secuencialmente, y pueden ser descodificados por medio de PCR para producir la estructura del péptido asociado. Alternamente, agrupaciones de moléculas orgánicas pequeñas pueden ser utilizadas como marcadores secuenciales que codifican al historial sintético secuencial del péptido. Por lo tanto, los nucleótidos son adheridos al péptido que está creciendo secuencialmente, y pueden ser descodificados por medio de PCR para producir la estructura del péptido asociado. Alternamente, los grupos de moléculas orgánicas pequeñas pueden ser utilizados como marcadores secuenciales que codifican al historial sintético secuencial del miembro de la biblioteca.
- 5
- 10 **[0281]** Finalmente, la estructura de un miembro de la biblioteca puede determinarse directamente por medio de un análisis secuencial de aminoácidos.
- 15 **[0282]** Las siguientes patentes, describen métodos para elaborar bibliotecas de péptidos y de no péptidos aleatorias y examinar tales bibliotecas para identificar compuestos que se enlacen a proteínas objetivos. Tal como se utiliza en este invento, GCC pueden ser los objetivos utilizados para identificar a los ligandos de péptidos y de no péptidos generados y examinados tal como se presenta en las patentes.
- 20 **[0283]** La patente de Estados Unidos número 5,270,170 emitida a Schatz et al. el 14 de diciembre de 1993 y la patente de Estados Unidos número 5,338,665 emitida a Schatz et al. el 16 de agosto de 1994, se refieren a bibliotecas de péptidos y métodos de examinación que pueden ser utilizados para identificar a ligandos de GCC.
- 25 **[0284]** La patente de Estados Unidos número 5,395,750 emitida a Dillon et al. el 7 de marzo de 1995, se refiere a métodos para producir proteínas que se enlaza a antígenos predeterminados. Aquellos métodos pueden ser utilizados para producir ligandos de GCC.
- 30 **[0285]** La patente de Estados Unidos número 5,223,409 emitida a Ladner et al. el 29 de junio de 1993, se refiere a la evolución dirigida de proteínas enlazadoras nuevas. Aquellas proteínas pueden ser producidas y examinadas tal como se presenta y para identificar ligandos de GCC.
- 35 **[0286]** La patente de Estados Unidos número 5,366,862 emitida a Venton et al. el 22 de noviembre de 1994, se refiere a métodos para generar y examinar péptidos útiles. Los métodos ahí descritos pueden ser utilizados para identificar ligandos de GCC.
- 40 **[0287]** La patente de Estados Unidos número 5,340,474 emitida a Kauvar el 23 de agosto de 1994, así como, la patente de Estados Unidos número 5,133,866, la patente de Estados Unidos número 4,963,263 y la patente de Estados Unidos número 5,217,869, pueden ser utilizadas para identificar a los ligandos de GCC.
- 45 **[0288]** La patente de Estados Unidos número 5,405,783 emitida para Pirrung et al. el 11 de abril de 1995, se refiere a síntesis en fases sólidas fotolitográficas a larga escala de un grupo de polímeros. Las enseñanzas de ese documento pueden ser utilizadas para identificar a ligandos de GCC.
- 50 **[0289]** La patente de Estados Unidos número 5,143,854 emitida a Pirrung et al. el primero de septiembre de 1992, se refiere a una síntesis de fases sólidas fotolitográficas a larga escala de polipéptidos y receptores incluyendo sus enlaces y examinaciones.
- 55 **[0290]** La patente de Estados Unidos número 5,384,261 emitida a Winkler et al. el 24 de enero de 1995, se refiere a la síntesis de polímeros inmovilizados a muy larga escala utilizando patrones de flujo dirigidos mecánicamente. Aquellos métodos son útiles para identificar a ligandos de GCC.
- 60 **[0291]** La patente de Estados Unidos número 5,221,736 emitida para Coolidge et al. el 22 de junio de 1993, se refiere a la síntesis de péptidos y oligonucleótidos secuencial utilizando técnicas de inmuno-afinidad. Aquellas técnicas pueden ser utilizadas para identificar a los ligandos de GCC.
- [0292]** La patente de Estados Unidos número 5,412,087 emitida para McGall et al. el 2 de mayo de 1995, se refiere a la inmovilización espacial de direcciones de oligonucleótidos y otros polímeros biológicos en las superficies. Aquellos métodos pueden ser utilizados para identificar a los ligandos de GCC.
- [0293]** La patente de Estados Unidos número 5,324,483 emitida para Cody et al. el 28 de junio de 1994, se refiere a un aparato para síntesis simultáneas múltiples. El aparato y el método ahí descritos pueden ser utilizados para producir varios compuestos que pueden ser examinados para identificar a los ligandos de GCC.
- [0294]** La patente de Estados Unidos número 5,252,743 emitida para Barrett et al. el 12 de octubre de 1993, se refiere a la inmovilización espacial de direcciones de anti-ligandos en las superficies. Los métodos y composiciones allí descritos pueden ser utilizados para identificar los ligandos de GCC.

[0295] La patente de Estados Unidos número 5,424,186 emitida para Foder et al. el 13 de junio de 1995, se refiere a una síntesis de polímeros inmovilizada a larga escala. El método para sintetizar oligonucleótidos aquí descrito puede ser utilizado para identificar a los ligandos de GCC.

5 **[0296]** La patente de Estados Unidos número 5,420,328 emitida para Campbell el 30 de mayo de 1995, se refiere a métodos para la síntesis de ésteres de fosfonato. Los ésteres de fosfonato allí producidos pueden ser examinados para identificar compuestos que sean ligandos de GCC.

10 **[0297]** La patente de Estados Unidos número 5,288,514 emitida para Ellman el 22 de febrero de 1994, se refiere a la síntesis combinatoria y en fase sólida de los compuestos de benzodiazepina en un soporte sólido. Aquellos métodos y compuestos pueden ser utilizados para identificar a ligandos de GCC.

15 **[0298]** Tal como se menciona anteriormente, los ligandos de GCC también pueden ser anticuerpos y sus fragmentos. En efecto, los anticuerpos generados para determinantes únicos de estos receptores reconocerán a aquella proteína, y solo a aquella proteína y, consecuentemente, pueden servir como una molécula de dirección específica que puede ser utilizada para dirigir diagnósticos y terapias nuevas a este marcador único. Adicionalmente, estos anticuerpos pueden ser utilizados para identificar la presencia de GCC o sus fragmentos en muestras biológicas.

20 LISTA DE SECUENCIAS

[0299]

<110> Thomas Jefferson University Waldman, Scott A. Park, Jason Schulz, Stephanie

25 <120> Composiciones Y Métodos Para Identificar Y Usar Como Objetivo A Células Cancerígenas Originadas En El Canal Alimentario

<130> TJU2469

30 <150> 60/192,229 <151> 2000-03-27

<160> 2

35 <170> Versión de la patente 3.0

<210> 1

<211> 3787

<212> ADN

40 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (118)..(3336)

45 <400> 1

50

55

60

65

ES 2 548 381 T3

	tggagtgggc tgagggactc cactagaggc tgtccatctg gattccctgc ctccttagga	60
5	gccaacaga gcaaagcaag tgggcacaag gagtatggtt ctaacgtgat tggggtc	117
	atg aag acg ttg ctg ttg gac ttg gct ttg tgg tca ctg ctc ttc cag Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln 1 5 10 15	165
10	ccc ggg tgg ctg tcc ttt agt tcc cag gtg agt cag aac tgc cac aat Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn 20 25 30	213
15	ggc agc tat gaa atc agc gtc ctg atg atg ggc aac tca gcc ttt gca Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala 35 40 45	261
20	gag ccc ctg aaa aac ttg gaa gat gcg gtg aat gag ggg ctg gaa ata Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile 50 55 60	309
25	gtg aga gga cgt ctg caa aat gct ggc cta aat gtg act gtg aac gct Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala 65 70 75 80	357
30	act ttc atg tat tcg gat ggt ctg att cat aac tca ggc gac tgc cgg Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg 85 90 95	405
35	agt agc acc tgt gaa ggc ctc gac cta ctc agg aaa att tca aat gca Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala 100 105 110	453
40	caa cgg atg ggc tgt gtc ctc ata ggg ccc tca tgt aca tac tcc acc Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr 115 120 125	501
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 548 381 T3

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

ES 2 548 381 T3

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

ES 2 548 381 T3

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

65

ES 2 548 381 T3

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

ES 2 548 381 T3

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 5
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 10
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 15
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 20
 Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Val Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 25
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 30
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 35
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 40
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 45
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 50
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
 435 440 445
 55
 Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
 450 455 460
 60
 Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
 485 490 495
 65
 Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Val Lys Lys Arg
 500 505 510

ES 2 548 381 T3

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

ES 2 548 381 T3

	770					775						780				
5	Leu 785	Tyr	Lys	Ala	Glu	Arg 790	Asp	Arg	Ala	Asp	Arg 795	Leu	Asn	Phe	Met	Leu 800
10	Leu	Pro	Arg	Leu	Val 805	Val	Lys	Ser	Leu	Lys 810	Glu	Lys	Gly	Phe	Val 815	Glu
15	Pro	Glu	Leu	Tyr 820	Glu	Glu	Val	Thr	Ile 825	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ile 830	Val	Gly
20	Phe	Thr	Thr 835	Ile	Cys	Lys	Tyr	Ser 840	Thr	Pro	Met	Glu	Val 845	Val	Asp	Met
25	Leu	Asn 850	Asp	Ile	Tyr	Lys	Ser 855	Phe	Asp	His	Ile	Val 860	Asp	His	His	Asp
30	Val 865	Tyr	Lys	Val	Glu	Thr 870	Ile	Gly	Asp	Ala	Tyr 875	Met	Val	Ala	Ser	Gly 880
35	Leu	Pro	Lys	Arg	Asn 885	Gly	Asn	Arg	His	Ala 890	Ile	Asp	Ile	Ala	Lys 895	Met
40	Ala	Leu	Glu	Ile 900	Leu	Ser	Phe	Met	Gly 905	Thr	Phe	Glu	Leu	Glu 910	His	Leu
45	Pro	Gly	Leu 915	Pro	Ile	Trp	Ile	Arg 920	Ile	Gly	Val	His	Ser 925	Gly	Pro	Cys
50	Ala	Ala 930	Gly	Val	Val	Gly	Ile 935	Lys	Met	Pro	Arg	Tyr 940	Cys	Leu	Phe	Gly
55	Asp 945	Thr	Val	Asn	Thr	Ala 950	Ser	Arg	Met	Glu	Ser 955	Thr	Gly	Leu	Pro	Leu 960
60	Arg	Ile	His	Val	Ser 965	Gly	Ser	Thr	Ile	Ala 970	Ile	Leu	Lys	Arg	Thr 975	Glu
65	Cys	Gln	Phe	Leu 980	Tyr	Glu	Val	Arg	Gly 985	Glu	Thr	Tyr	Leu	Lys 990	Gly	Arg
70	Gly	Asn	Glu	Thr 995	Thr	Tyr	Trp	Leu 1000	Thr	Gly	Met	Lys	Asp 1005	Gln	Lys	Phe
75	Asn	Leu 1010	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr 1015	Val	Glu	Asn	Gln	Gln 1020	Arg	Leu	Gln	
80	Ala	Glu	Phe	Ser	Asp	Met	Ile 1030	Ala	Asn	Ser	Leu	Gln	Lys	Arg	Gln	
85																

ES 2 548 381 T3

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

5

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

10

Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un ligando de GCC conjugado a un reactivo para su uso en el tratamiento de cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico, donde el ligando de GCC es un péptido que tiene menos de 25 aminoácidos de largo, y donde el reactivo es seleccionado de un grupo que consiste de: una enzima activa, un elemento quimioterapéutico, una toxina, un elemento radioterapéutico y un reactivo radio - sensibilizador.
- 10 2. El ligando de GCC para tratar cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico de la reivindicación uno, donde el ligando de GCC es un ligando con menos de 20 aminoácidos de largo.
- 15 3. El ligando de GCC para tratar un cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico de la reivindicación uno, donde aquel reactivo es seleccionado de un grupo que consiste de: metotrexato, doxorubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, etopósido, 5-4 fluorouracilo, melfalán, clorambucilo, cisplatino, vindesina, mitomicina, bleomicina, purotioina, macromomicina, derivados de 1,4-benzoquinona, trenimón, ricina, cadena A de ricina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de la difteria, fosfolipasa C de Clostridium perfringens, ribonucleasa pancreática bovina, proteína antiviral de fitolaca, abrina, cadena A de abrina, factor de veneno de cobra, gelonina, saporina, modicina, viscumina, volkensina, fosfatasa alcalina, nitroimidazol, metronidazol, misonidazol, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹⁰⁹Pd, ¹²³I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²¹¹At, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ³²P, ³³P, ⁷¹Ge, ⁷⁷As, ¹⁰³Pb, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹⁹Sb, ¹²¹Sn, ¹³¹Cs, ¹⁴³Pr, ¹⁶¹Tb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁹¹Os, ¹⁹³MPt, ¹⁹⁷Hg, y ¹²⁵I.
- 20 4. El ligando de GCC para tratar cáncer estomacal o del esófago primario y/o metastásico de las reivindicaciones 1 a la 3, donde el reactivo es una agente quimioterapéutico que causa la muerte celular, inhibe la división celular o induce diferenciación.
- 25 5. Un ligando de GCC vinculado a un agente detectable para su uso en un método in vivo para la toma de imágenes de radio de las células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas, donde el ligando de GCC es un péptido de menos de 20 aminoácidos de largo.
- 30 6. El ligando de GCC vinculado a un reactivo detectable para su uso en un método in vivo para la toma de imágenes de radio de células cancerígenas estomacales o del esófago primarias y/o metastásicas de la reivindicación 5, donde el reactivo detectable es seleccionado el grupo que consiste de ⁴³K, ⁵²Fe, ⁵⁷Co, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷⁷Br, ⁸¹Rb, ⁸¹MKr, ⁸MSr, ⁹⁹MTc, ¹¹¹In, ¹¹³MIn, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹²⁷Cs, ¹²⁹Cs, ¹³¹I, ¹³²I, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Pb y ²⁰⁶Bi.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65