

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 588**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2010** **PCT/CA2010/000971**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010** **WO10148501**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2010** **E 10791109 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 2445932**

54 Título: **Péptidos derivados de soricidina y métodos para la detección de cánceres TRPV-6 y administración de fármacos**

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220833 P
22.09.2009 US 244634 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2018

73 Titular/es:

SORICIMED BIOPHARMA INC. (100.0%)
95C Queens Road
Sackville, New Brunswick E4L 4H2, CA

72 Inventor/es:

STEWART, JOHN M.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 670 588 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de soricidina y métodos para la detección de cánceres TRPV-6 y administración de fármacos

5 Campo

La presente invención se refiere a la detección y al diagnóstico de cánceres que expresan vainilloide 6 de potencial receptor transitorio (TRPV6, *transient receptor potential vanilloid 6*). Ciertas realizaciones de la invención también se refieren a compuestos de unión a TRPV-6 que se dirigen a células que expresan TRPV6 para su uso en diagnóstico

10 o administración de fármacos.

Antecedentes

La soricidina (número de acceso del NCBI P0C2C6) es un péptido paralizante de cincuenta y cuatro aminoácidos aislado de la glándula salival submaxilar de la musaraña colicorta septentrional (*Blarina brevicauda*). La patente de Estados Unidos N° 7.119.168 describe la soricidina, su actividad paralizante y la utilidad del péptido, para afecciones tales como tratamiento del dolor y enfermedad neuromuscular. La patente de Estados Unidos N° 7.273.850 describe que la soricidina tiene actividad paralizante y, entre otras cosas, proporciona datos de que inhibe la absorción de calcio en dos líneas celulares de cáncer de ovario.

Un grupo de canales de iones de calcio implicado en el cáncer es el de los canales de potencial receptor transitorio (TRP, *transient receptor potential*) que se encuentra en animales invertebrados y vertebrados. Los miembros vainilloides de potencial receptor transitorio (TRPV) de la superfamilia TRP fueron nombrados después de descubrir que se activaban en presencia de vainilloides (por ejemplo, capsaicina del pimiento picante). Los primeros cuatro receptores que se comprobó que eran de este tipo (TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4) respondían a la capsaicina y también eran responsables de detectar cambios de temperatura y de otras señales ambientales. Los otros dos receptores de la subfamilia de TRPV, TRPV5 y TRPV6, se encontraron predominantemente en tejidos de tipo epitelial o derivados y eran responsables de la entrada de iones de calcio en la célula. La patente de Estados Unidos N° 7.7205.108 describe genes que codifican los TRPV 8, 9 y 10 y su uso como biomarcadores de cáncer y en métodos de diagnóstico y terapéuticos asociados.

El TRPV6 se identificó como responsable de la importación de calcio a los tejidos epiteliales del intestino y, por lo tanto, de la absorción del calcio de la dieta. También se ha demostrado que estos canales están presentes en diversos otros tejidos en cantidades variables, pero más notablemente en las células epiteliales intestinales, el riñón, la placenta y el páncreas. La expresión de TRPV6 se midió como muy elevada en algunos tejidos cancerosos y en algunas líneas celulares conocidas de cáncer de ovario, mama, próstata y leucemia. (Peng y otros, 2000; Zhuang et al. 2002). Se demostró que el TRPV6 tenía un papel en la carcinogénesis del cáncer de mama (Bolan et al. 2008 Molecular Cancer Therapeutics 7, 271-279). También se demostró que el TRPV6 estaba regulado por hormonas calciotróficas y Ca^{2+} (den Dekker et al. 2003. Cell Calcium 33, 497-507). El documento WO 2004/046178 desvela un péptido de unión a TRPV6 y su uso en terapia de enfermedades neuromusculares, así como su uso en cosmética. El documento US 7273850 desvela la inhibición de la captación de calcio por una célula cancerosa utilizando un péptido de unión a TRPV6 que puede reducir la proliferación celular

Por consiguiente, se necesitan compuestos y métodos asociados para detectar células que expresan TRPV6. También se necesitan composiciones y métodos capaces de dirigirse a las células que expresan TRPV6 para la administración de agentes útiles para el diagnóstico o tratamiento del cáncer.

Sumario

En la presente memoria se desvelan compuestos que se unen a canales de iones calcio TRPV6. Estos compuestos tienen al menos una parte que tiene identidad de secuencia con una cadena continua de aminoácidos de los péptidos C-terminales de soricidina. En ciertos casos, el componente peptídico representa la totalidad del compuesto, mientras que en otros casos el péptido es un componente del compuesto, por ejemplo, si el compuesto comprende un péptido conjugado con un fármaco o un marcador detectable.

Anteriormente se desconocía que la estructura de la soricidina, que proporcionaba actividad de inhibición del canal de calcio, estaba separada de la estructura que causaba la actividad paralizante. Los conjugados fluorescentes de los compuestos descritos en la presente memoria se unen a células que expresan la proteína TRPV6 en experimentos de colocalización con anticuerpos de TRPV6. Se ha demostrado que TRPV6 se sobreexpresa en diversas muestras de tejido canceroso y líneas celulares. Los compuestos que se unen a TRPV6 son útiles para la identificación del cáncer, así como para dirigir la actividad anticancerosa del fármaco a células que expresan TRPV. También se desvela el uso de anticuerpos contra TRPV6 en la identificación y el diagnóstico de cáncer, así como para dirigir la actividad anticancerosa del fármaco a células que expresan TRPV. Además, los compuestos que se unen a TRPV6 marcados con fluorescencia han demostrado ser útiles para obtener imágenes e identificar tumores *in vivo*. También se ha demostrado que los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria son útiles para dirigir biomoléculas a células que expresan TRPV6, tales como células tumorales.

- Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un compuesto que comprende un péptido de unión al vainilloide 6 de potencial receptor transitorio (TRPV6) conjugado con una biomolécula, en el que el péptido de unión a TRPV6 no presenta actividad paralizante y comprende de 9 a 27 aminoácidos contiguos de la secuencia C-terminal de SEQ ID NO:1 o al menos un 70 %, al menos un 80 %, o al menos un 90 % de identidad con uno de HPSKVDLPR, KEFLHPSKVDLPR o EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR (SEQ ID NO: 1). En una realización, el compuesto comprende al menos 9 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1, al menos 10 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1 o más de 10 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el péptido de unión a TRPV6 comprende la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR o KEFLHPSKVDLPR.
- En la presente memoria también se desvela un compuesto que comprende un anticuerpo contra TRPV6 conjugado con una biomolécula.
- En una realización, el compuesto comprende una biomolécula con un marcador detectable. En algunas realizaciones, la biomolécula está marcada por fluorescencia, radioactividad o inmunológicamente. En una realización, el marcador detectable comprende un agente de contraste para obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI, *magnetic resonance imaging*). En una realización, el marcador detectable es óxido de hierro superparamagnético (SPIO, *super-paramagnetic iron oxide*).
- En una realización, la biomolécula es un agente terapéutico. Opcionalmente, el agente terapéutico es un agente anticanceroso, por ejemplo, un fármaco basado en taxano, un fármaco de tipo antraciclina o un fármaco basado en platino.
- En algunas realizaciones, la biomolécula es una pequeña molécula de fármaco, un oligosacárido, un anticuerpo, un epítipo de anticuerpo, un grupo nanometálico, una molécula marcada radiactivamente, un fármaco basado en taxano, un fármaco de tipo antraciclina, un fármaco basado en platino, un antibiótico, un fármaco contra el cáncer, un antifúngico, un antivírico o antirretrovírico, o un complejo de boro, un epítipo para un anticuerpo endógeno o administrado terapéuticamente, un péptido u oligosacárido de señalización que recluta células inmunitarias, por ejemplo, linfocitos T citolíticos.
- En una realización, el péptido de unión a TRPV6 y la biomolécula se unen a través de un espaciador. En una realización, el péptido de unión a TRPV6 está conjugado con más de una biomolécula o con más de un tipo de biomolécula.
- También se incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En la presente memoria se describe un método para detectar la proteína TRPV6 en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un péptido de unión a TRPV6 que comprende todo o parte de un péptido que comprende EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR (SEQ ID NO: 1) y detectar el péptido de unión a TRPV6. En una realización, el péptido de unión a TRPV6 se detecta utilizando un anticuerpo que se une selectivamente al péptido de unión a TRPV6.
- Otra realización incluye un método para detectar la proteína TRPV6 en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con un compuesto de la invención y después detectar la biomolécula. Por ejemplo, en una realización, la biomolécula es un fluoróforo y el compuesto que comprende el péptido de unión a TRPV6 se detecta detectando el fluoróforo.
- También se desvela el uso de los compuestos descritos en la presente memoria para detectar TRPV6 en una muestra. En una realización, la muestra es un líquido corporal tal como sangre, saliva u orina.
- Algunas realizaciones se refieren a métodos para identificar cáncer en una muestra de un sujeto que comprenden detectar la proteína TRPV6 en la muestra, comprendiendo la detección de la proteína TRPV6 en la muestra, la puesta en contacto de la muestra con un compuesto de la invención y comparar la cantidad de proteína TRPV6 en la muestra con una cantidad de proteína TRPV6 en una muestra de control, donde un aumento en la cantidad de proteína TRPV6 en la muestra en comparación con el control es indicativo de cáncer. En una realización, la muestra es un líquido corporal. En algunas realizaciones, la proteína TRPV6 se detecta *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, dicho cáncer es un cáncer en estadio temprano tal como cáncer de estadio I o II.
- En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano. La muestra puede comprender una muestra de líquido corporal, excremento, tejido, tumor o microvesículas. En una realización, el líquido corporal es sangre, orina, saliva, plasma, líquido cefalorraquídeo, mucosidad, secreciones vaginales, linfa o líquido pleural.
- En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan para identificar cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de sangre, cáncer de cerebro, cáncer de retina, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células gliales, leucemia o cáncer de endometrio. En una realización, el cáncer es cáncer metastásico o cáncer metastásico de ganglio linfático.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para estadificar el cáncer, por ejemplo, comparando la cantidad de proteína TRPV6 en una muestra con una muestra de control o muestras que tienen cáncer en estadio I, II, III o IV.

- 5 Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para clasificar células cancerosas o tumores cancerosos, por ejemplo, cáncer de ovario, para identificar, por ejemplo, sujetos con cáncer de ovario de grado I.

10 En la presente memoria también se describe un método de fabricación de uno de los compuestos desvelados en la presente memoria que comprende conjugar una biomolécula con un péptido de unión a TRPV6 o con un anticuerpo contra TRPV6. El péptido de unión a TRPV6 puede conjugarse por enlace covalente a una biomolécula. Por ejemplo, el péptido de unión a TRPV6 puede comprender toda o parte de SEQ ID NO: 1 y la biomolécula puede unirse a través del tiol de cisteína correspondiente a la posición 14 en SEQ ID NO: 1. La biomolécula puede conjugarse con el péptido a través de una maleimida activada.

15 En otra realización adicional se incluye un compuesto de la invención para su uso en el tratamiento o la detección de cáncer en un paciente, en el que la biomolécula se administra a una célula que expresa TRPV6. En una realización, la biomolécula comprende un marcador detectable o un agente terapéutico. La etapa de poner en contacto la célula con el compuesto puede realizarse *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, la célula que expresa TRPV6 comprende un tejido, un tumor o una microvesícula.

20 En la presente memoria también se describen kits para detectar TRPV6 en una muestra que comprende reactivos para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria e instrucciones de uso. Otros kits pueden ser para diagnosticar cáncer, reactivos para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria e instrucciones de uso.

25 En otro aspecto, se proporciona un compuesto de la invención para su uso en un método para identificar un tumor canceroso en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto un compuesto de la invención, detectar el péptido de unión a TRPV6 en el sujeto, detectando así la presencia de TRPV6; e identificar regiones del sujeto con niveles aumentados de TRPV6 con respecto a un nivel de control, en donde los niveles aumentados de TRPV6 son indicativos de un tumor. Los niveles de control pueden ser como los observados en un tejido no canceroso, un nivel de control predeterminado o un nivel promedio tomado a lo largo del sujeto. En una realización, la presencia de TRPV6 se detecta, por ejemplo, detectando un marcador fluorescente conjugado con el péptido de unión a TRPV6 o con un anticuerpo contra TRPV6. En una realización, la presencia de TRPV6 se detecta utilizando imágenes de resonancia magnética (MRI) y un agente de contraste MRI conjugado con un péptido de unión a TRPV6. En algunas realizaciones, el tumor canceroso es un tumor de próstata, un tumor de mama o un tumor de ovario.

35 Otras características y ventajas de la presente invención resultarán obvias a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos que se indican en las realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solo a modo ilustrativo, ya que a partir de la descripción detallada diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones resultarán ser obvios para los expertos en la materia.

Breve descripción de los dibujos

45 Las realizaciones de la invención se describirán ahora en relación con los dibujos en los que:

La Figura 1 es un dibujo lineal que muestra la ubicación de los ganglios linfáticos en el ratón. Se observó una acumulación significativa de compuesto SorC13-Cy5.5 y compuesto SorC27-Cy5.5 cuatro horas después de la inyección iv de 100 µg de cada uno de los péptidos marcados en ratones CD1 en los siguientes ganglios marcados en la Figura 1: 1. Ganglios cervicales superficiales; 4. Ganglios axilares; 5. Ganglios branquiales; 8. Ganglios mesentéricos; 9. Ganglios inguinales.

La Figura 2 muestra la distribución del compuesto SorC13-Cy5.5 en ratones CD1 4 horas después de la inyección iv. El eje Y es el porcentaje de fluorescencia total medido en todos los tejidos.

La Figura 3 muestra la distribución del compuesto SorC27-Cy5.5 en ratones CD1 4 horas después de la inyección iv. El eje Y es la fluorescencia total medida en cada tejido.

La Figura 4 muestra la distribución del compuesto SorC13-Cy5.5 en ratones CD1 después de una inyección iv a lo largo del tiempo después de la perfusión para eliminar por lavado los líquidos. El eje Y es el porcentaje de fluorescencia total medido en todos los tejidos. El mayor porcentaje de captación (de fluorescencia total) del compuesto SorC13-Cy5.5 se observó en hígado, pulmón y riñón. El ganglio linfático no se muestra porque la perfusión elimina por lavado la linfa. El panel A muestra la distribución 4 horas después de la inyección iv y el panel B 24 horas después de la inyección intravenosa.

La Figura 5 muestra la inmunolocalización de TRPV6 en células de cáncer de ovario (SKOV-3). Las células SKOV-3 se transfectaron con una proteína de fusión TRPV6-GFP. Tanto la proteína TRPV6 endógena como la proteína de fusión TRPV6-GFP, se detectaron con una combinación de un anticuerpo primario contra la región N-terminal de TRPV6 y un anticuerpo secundario contra IgG marcado con FITC (un marcador fluorescente verde). Una célula en el campo muestra la colocalización de la proteína TRPV6-GFP transfectada brillante fluorescente y el anticuerpo contra TRPV6. Las otras células (no transfectadas) en el campo muestran la fluorescencia roja de la aglutinina de germen de trigo que marca la membrana celular y la fluorescencia verde de inmunolocalización que indica el anticuerpo secundario marcado con FITC utilizado para detectar el anticuerpo primario anti-TRPV6.

La Figura 6 muestra la colocalización de la proteína TRPV6 expresada en células HEK-293 con anticuerpo contra TRPV6 y con SorC27-cy5.5. Las células HEK293 no transfectadas con el vector de expresión TRPV6 no muestran fluorescencia cuando se incuban con SorC27-cy5.5 (Figura 6A, control negativo). La Figura 6B muestra imágenes de células formadas con el anticuerpo contra TRPV verde, mientras que la Figura 6C muestra el mismo campo de imágenes de células con SorC27-cy5.5 rojo. La Figura 6D muestra ambas imágenes superpuestas y la colocalización de TRPV6 y SorC27-cy5.5 en células transfectadas con el vector TRPV6.

La Figura 7 muestra la colocalización de SorC27-cy5.5 y anticuerpos contra TRPV6 marcados con fluorescencia en la línea celular de cáncer de próstata PC-3. La serie A de imágenes muestra A1: inmunofluorescencia del anticuerpo contra TRPV6, A2: marcaje con SorC27-cy5.5 y A3: superposición de A1 y A2. La serie B de imágenes muestra células PC-3 en la misma secuencia que la serie A, pero ahora transfectadas con un vector de expresión TRPV6 para aumentar el nivel de TRPV6 expresado por las células. Ambas series de imágenes muestran la colocalización de SorC27-cy5.5 y TRPV6. Tanto el nivel de inmunofluorescencia de TRPV6 como el de la fluorescencia de SorC27-cy5.5 se incrementan en las células transfectadas con una expresión de TRPV6 aumentada mostrada en la serie 7B de Figuras en comparación con las células en la serie 7A de Figuras.

La Figura 8 muestra la colocalización de SorC27-cy5.5 y de los anticuerpos contra TRPV6 marcados con fluorescencia en la línea celular de cáncer de mama T 47D. La serie A de imágenes muestra A1: inmunofluorescencia, A2: marcaje con SorC27-cy5.5 y A3: superposición de A1 y A2. La serie B de imágenes muestra células PC-3 en la misma secuencia que la serie A, pero ahora transfectadas con un vector de expresión TRPV6 para aumentar el nivel de TRPV6 expresado por las células. Ambas series de imágenes muestran la colocalización de SorC27-cy5.5 y TRPV6. Tanto el nivel de inmunofluorescencia de TRPV6 como el de la fluorescencia de SorC27-cy5.5 se incrementa en las células transfectadas con una mayor expresión de TRPV6 mostrada en la serie 8B de Figuras en comparación con las células en la serie 8A de Figuras.

La Figura 9 muestra la colocalización de SorC27-cy5.5 y de los anticuerpos contra TRPV6 marcados con fluorescencia en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3. La serie A de imágenes muestra A1: inmunofluorescencia, A2: marcaje con SorC27-cy5.5 y A3: superposición de A1 y A2. La serie B de imágenes muestra células PC-3 en la misma secuencia que la serie A, pero ahora transfectadas con un vector de expresión TRPV6 para aumentar el nivel de TRPV6 expresado por las células. Ambas series de imágenes muestran la colocalización de SorC27-cy5.5 y TRPV6. Tanto el nivel de inmunofluorescencia de TRPV6 como el de la fluorescencia de SorC27-cy5.5 se incrementa en las células transfectadas con una mayor expresión de TRPV6 mostrada en la serie 9B de Figuras en comparación con las células en la serie 9A de Figuras.

La Figura 10 muestra la detección por PCR de ADNc de TRPV6 presente en bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de ARN total extraído de diversas biopsias de tumores de ovario humano. Carril 1: blanco; 2: LTL320 TRPV6; 3: LTL320 β -actina; 4: LTL317 TRPV6; 5: LTL317 β -actina; 6: LTL269 TRPV6; 7: LTL269 β -actina; 8: escalera de 100 pares de bases; 9: control negativo de TRPV6; 10: control negativo de β -actina. La clasificación de las densidades de banda de los 3 amplicones de TRPV6 de los que se informa en la Tabla 1 es: LTL320 (+); LTL317 (+++); LTL269 (++++). El amplicón de TRPV6 tiene aproximadamente 370 pares de bases y el amplicón de β -actina 50 pares de bases.

La Figura 11 muestra la detección por PCR de ADNc de TRPV6 presente en bibliotecas de ADNc producidas a partir de ARN total extraído de diversas líneas celulares de cáncer de ovario humano. Carriles: 1 - blanco; 2 - escalera de 100 pares de bases; 3 - control positivo; 4- OVCAR3; 5- SKOV3; 6A- OVC13 mal degradado; 6B- repetición de OVC13 mostrando alguna señal de TRPV6; 7- HEYC2; 8- OV2008; 9- control negativo; 10 - escalera de 100 pb. El amplicón de TRPV6 tiene aproximadamente 370 pares de bases. Los carriles 7 y 8 se aislaron de tamaños de muestra muy pequeños (bajo recuento de células) y, por lo tanto, muestran señales débiles.

La Figura 12A muestra la detección por PCR de ADNc de TRPV6 presente en bibliotecas de ADNc producidas a partir de ARN total extraído de diversas líneas celulares de cáncer de mama humano. Carriles: 1 - HCC1954 β -actina; 2 - T47D β -actina; 3 - MCF10A β -actina; 4 - escalera de 100 pares de bases; 5 - HCC1954 TRPV6; 6 - T47D TRPV6; 7 - muestra contaminada; 8 - control positivo de TRPV6 de un vector de expresión que contiene TRPV6 (pcAGGS-TRPV6). La Figura 12B muestra la detección por PCR de ADNc de TRPV6 presente en bibliotecas de ADNc producidas a partir de ARN total extraído de la línea celular de cáncer de mama humano MB423 (a la derecha de la escalera de 100 pb). El amplicón de TRPV6 tiene aproximadamente 370 pares de bases.

La Figura 13 muestra la detección por PCR de ADNc de TRPV6 presente en bibliotecas de ADNc producidas a partir de ARN total extraído de una línea celular de cáncer de próstata humano (PC-3). El amplicón de TRPV6 tiene aproximadamente 370 pares de bases. La escalera de peso molecular es una escalera de 100 pb. Carril 1: blanco; Carril 2: PCR de la biblioteca de ADNc de células PC-3; Carril 3: blanco; Carril 4: escalera de PM; Carril 5: blanco.

La Figura 14 es una transferencia Western que muestra la detección de la sobreexpresión de la proteína TRPV6 en extractos de líneas celulares de cáncer de ovario, mama y próstata de ser humano. Carriles 1: estándar de peso molecular; 2: blanco; 3: HEP G2 (control positivo); 4: línea celular de cáncer de mama T 47D; 5: línea celular de cáncer de ovario SKOV-3; 6: línea celular de cáncer de próstata PC-3. En el carril 3, el lisado de HEP G2 (hepatoblastoma) muestra dos bandas: la banda superior es TRPV6 sin glicosilar mientras que en la segunda banda se muestra el TRPV6 completamente glicosilado. El TRPV6 desglicosilado se produce en gran medida en los tres tipos de células de cáncer. Se ha demostrado que la desglicosilación de TRPV6 unido a la membrana atrapa el canal iónico en la membrana y aumenta la actividad del canal (Lu et al., 2008).

Las Figuras 15A, 15B, 15C y 15D son transferencias Western que muestran la detección de la proteína TRPV6 en extractos de 18 muestras de tumores de ovario humano. Cada paciente/tumor por separado se cita como un código alfanumérico. En todas las secciones, la flecha superior a la derecha de la imagen indica la posición de la forma glicosilada de TRPV6, mientras que la flecha inferior indica la posición de la forma desglicosilada de la proteína TRPV6. Figura 15A: Carril 1: estándar de peso molecular; 2: LTL-175; 3: LTL-205; 4: LTL-234; 5: LTL-237; 6: LTL-246; 7: HEP G2 (control positivo); 8: estándar de peso molecular. Figura 15B: Carril 1: estándar de peso molecular; 2: LTL-247; 3: LTL-258; 4: LTL-259; 5: LTL-260; 6: LTL-269; 7: HEP G2 (control positivo); 8: estándar de peso molecular. Figura 15C: Carril 1: estándar de peso molecular; 2: LTL-273; 3: LTL-284; 4: LTL-290; 5: LTL-300; 6: PC-3; 7: blanco; 8: estándar de peso molecular. Figura 15D: Carril 1: estándar de peso molecular; 2: LTL-305; 3: LTL-315; 4: LTL-317; 5: LTL-320; 6: PC-3; 7: blanco; 8: estándar de peso molecular. PC-3 era una carga de proteína pequeña (50 µg) que corresponde con la carga de proteína de biopsia de tumor ovárico (50 µg) y muestra una señal muy débil, apenas visible en 15D (por ejemplo, véase la Fig. 14, carril 3 para HEP G2 y el carril 6 para PC-3). La proteína TRPV6 desglicosilada y atrapada es la forma predominante observada en cada muestra de tumor ovárico analizada. Las bandas en el control HEP-G2 son muy débiles con esta cantidad de proteína cargada e indican además la sobreexpresión de TRPV6 en las biopsias analizadas.

La Figura 16 es una transferencia Western que muestra la detección de la proteína TRPV6 sobreexpresada en extractos de células de glioblastoma humano (U87MG), colon humano (CaCo-2) y de carcinoma pancreático (Panc1). Carril 1: Marcadores de peso molecular con la banda delgada clara a 75 kDa; 2: células U87MG; 3: células CaCo-2; 4: células Panc1 a 2 pases de cultivo; 5: células Panc1 a 5 pases de cultivo; 6: células Panc1 a 7 pases de cultivo. En los últimos tres carriles, el aumento del número de pases parece aumentar la cantidad de TRPV6 desglicosilado. La banda superior es la forma glucosilada del canal iónico y la banda inferior es la forma desglicosilada de TRPV6.

La figura 17 muestra la calibración de la graduación de las puntuaciones de inmunohistoquímica (IHQ) de micromatrices tisulares con imágenes de muestras representativas correspondientes.

La Figura 18 muestra el porcentaje de portaobjetos de micromatrices tisulares que dio negativo a la tinción con el anticuerpo contra TRPV6 o que tenían una puntuación de intensidad de tinción de ≥ 1 para muestras de tejido de ovario normales en comparación con muestras de tejido de adenocarcinoma papilar seroso con cáncer de grado I, grado II o grado III. El 100 % de las muestras de tejido de adenocarcinoma papilar seroso tenían una puntuación de intensidad de tinción de ≥ 1 , en comparación con solo aproximadamente el 24 % de los tejidos de ovario normales.

La Figura 19 muestra la detección inmunohistoquímica de TRPV6 en muestras de micromatrices de tejidos de ovario normales, así como en muestras de carcinoma papilar seroso de Grados I, II y III. También se proporcionan las puntuaciones de intensidad de tinción del anticuerpo contra TRPV6 (-, - / +, +, ++, +++ o +++) de cada muestra.

La Figura 20 muestra la colocalización de anticuerpos contra TRPV6 y SorC27-cy5.5 marcados con fluorescencia en una muestra de micromatriz tisular de grado II de adenocarcinoma papilar seroso. El panel A muestra una biopsia de tumor de ovario teñida con un anticuerpo contra TRPV6, mientras que el panel B muestra la misma muestra teñida con el péptido fluorescente etiquetado SOR-C27-cy5.5.

La figura 21 muestra la localización dependiente del tiempo de SorC27-cy5.5 en modelos de ratón de xenoinjerto de tumores de cáncer de ovario (figura 21A) y de próstata (figura 21 B). La figura 21 C muestra: imagen tridimensional de un ratón que indica el plano de observación (izquierda), una imagen de un corte de 2 mm de los ratones en el centro (mitad) y una imagen que muestra un 'corte' perpendicular en el centro de los tumores (derecha) de los tumores de ovario (SKOV-3; superior) y próstata (DU 145; inferior).

La Figura 22 muestra la expresión de ARNm de TRPV6 en relación con controles sanos en muestras de cáncer de ovario (A), próstata (B) y mama (C).

La Figura 23 muestra la localización de un agente potenciador de MRI conjugado con el péptido de unión a TRPV6 SorC27 (SPIO-SorC27) en tumores de ovario derivados de SKOV-3 xenoinjertados en ratones lampiños CD-1. El panel A muestra el tumor, indicado con la flecha blanca, antes y 24 horas después de la inyección, con perlas de control SPIO. El panel B muestra el tumor antes (flecha blanca) y 24 horas después de la inyección con SPIO-SorC27 y la localización del agente de contraste en el sitio del tumor (flecha blanca discontinua).

Las figuras 24 muestran análisis por RT-PCR de la cantidad de ARNm de TRPV6 aislada de muestras de sangre de controles sanos y de pacientes con cáncer de próstata (figura 24A), mama (figura 24B) y ovario (24C) a diferentes estadios de cáncer. La RT-PCR del ARNm de TRPV6 diferencia fácilmente a los sujetos con cáncer en estadio I de los controles sanos.

La figura 25 muestra la cantidad de ARNm de TRPV6 determinada por RT-PCR en plasma sanguíneo de mujeres sanas en comparación con mujeres con cáncer de ovario en estadio I o estadio II. Los datos representan las lecturas de densidad de banda integradas de los amplicones procedentes de las muestras. Las muestras se determinaron por triplicado para cada muestra. Desde un punto de vista estadístico, los niveles de TRPV6 tanto en estadio I ($p < 0,0001$) como en estadio II ($p = 0,047$) fueron significativamente más altos en comparación con los observados en el plasma de mujeres sanas.

La Figura 26A muestra datos de transferencia Western de niveles de la proteína TRPV6 en muestras de plasma sanguíneo de mujeres sanas en comparación con mujeres con cáncer de ovario en estadio I y II. La figura muestra la densidad de banda cuantificada de la tinción con el anticuerpo contra TRPV6. Los niveles de TRPV6 tanto en estadio I ($p = 0,0001$) como en estadio II ($p = 0,0210$) fueron significativamente más altos que los observados en el plasma de mujeres sanas. La Figura 26B compara los datos de densidad de banda de transferencias Western de plasma sano y de estadio I y II (cáncer de ovario en estadio temprano) combinados. Desde un punto de vista estadístico, el plasma de las pacientes con cáncer en estadio I y II combinado, contenía cantidades significativamente más altas de proteína TRPV6 que el de las mujeres sanas ($p = 0,0006$).

Descripción detallada

El inventor ha determinado que la expresión de los canales de calcio de TRPV6 está regulada positivamente en ciertas células, tales como las células de cáncer de ovario, y que esta sobreexpresión es indicativa de cáncer. La presente descripción proporciona nuevos métodos para detectar la sobreexpresión de TRPV6 para identificar y/o diagnosticar cáncer. La solicitud también proporciona nuevos compuestos y métodos que se dirigen a la proteína TRPV6 o a las células que expresan TRPV6, tales como las células cancerosas.

En una realización, el inventor sintetizó compuestos que se unen a canales de calcio y, en particular, a canales de calcio de TRPV6. Los compuestos de la invención que se unen a TRPV6 tienen identidad de secuencia con parte de soricidina pero no muestran actividad paralizante. Es sorprendente que los compuestos conservan la actividad de unión de TRPV-6 en ausencia de actividad paralizante. Anteriormente se desconocía que, en su estructura, la soricidina tiene dos dominios funcionales, una parte que se une a los canales de calcio y otra que se une a los canales de sodio. También se desconocía que podrían prepararse péptidos que separaran la actividad de detección/unión del canal de calcio de la actividad paralizante de unión a canales de sodio.

El inventor ha determinado que el dominio que tiene la función paralizante es el dominio N-terminal de la soricidina y el que tiene la función inhibidora del canal de calcio es el dominio C-terminal, y más específicamente, la actividad de unión a TRPV6. El truncamiento de la soricidina en el N-terminal produjo satisfactoriamente péptidos que conservan la actividad de unión/detección del canal de calcio sin mostrar actividad paralizante. Por lo tanto, los compuestos son probablemente más propensos a unirse a TRPV6 *in vivo* porque los canales de sodio no pueden unirse a los compuestos y eliminarlos de la circulación. Además, la actividad de unión a los canales de calcio se obtiene ahora sin el efecto secundario no deseado de la unión a los canales de sodio, que impide la parálisis y otros posibles efectos secundarios. La naturaleza sorprendente de las realizaciones descritas en la presente memoria se enfatiza al considerar que, mientras que las proteínas y enzimas grandes bifuncionales son comunes en los sistemas biológicos, la bifuncionalidad intrínseca es un fenómeno muy raro en péptidos pequeños, particularmente cuando un extremo del péptido se une a los canales de calcio y el otro extremo del péptido se une a los canales de sodio. En la bibliografía, los informes sobre bifuncionalidad han sido, generalmente, como resultado de la producción artificial, por ejemplo, cuando se han fusionado químicamente dos péptidos diferentes (Anes et al., 2006; Yamamoto et al., 2008).

Los compuestos descritos en la presente memoria tienen generalmente un componente peptídico que es la mitad de la longitud de la soricidina o una longitud más corta. El péptido conserva la actividad de unión a TRPV6. El componente peptídico es un componente del compuesto, es decir, el compuesto comprende un péptido conjugado con una biomolécula. En una realización, el péptido de unión a TRPV6 comprende la totalidad o parte de un péptido que comprende EGKSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR (denominado "SorC27", SEQ ID NO: 1). El péptido de unión a TRPV6 comprende opcionalmente una parte contigua de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el péptido de unión a TRPV6 comprende una parte contigua de la secuencia C-terminal de SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, el péptido de unión a TRPV6 comprende al menos: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de SEQ

ID NO: 1. En algunas realizaciones, el compuesto comprende un péptido de unión a TRPV6 que tiene al menos un 50 % de identidad en toda su longitud con una parte de SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el compuesto comprende un péptido de unión a TRPV6 que tiene al menos un 70 %, 80 % o 90 % de identidad en toda su longitud con una parte de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el péptido de unión a TRPV6 comprende opcionalmente, consiste esencialmente en, o consiste en, la secuencia de aminoácidos: HPSKVDLPR (denominada "SorC9", aminoácidos n.º 19-27 de SEQ ID NO: 1), KEFLHPSKVDLPR (denominada "SorC13"; aminoácidos n.º 15-27 de SEQ ID NO: 1) o EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR ("SorC27", SEQ ID NO: 1). La secuencia de aminoácidos SorC9 9, HPSKVDLPR, contiene tres cargas positivas a pH fisiológico que se espera que interactúen con los cuatro ácidos aspárticos cargados negativamente que están presentes en la entrada al canal de calcio del tetrámero TRPV6 (den Dekker et al., 2003).

En algunas realizaciones, los péptidos de unión a TRPV6 tienen generalmente una longitud de 35 o 30 aminoácidos, o menor, opcionalmente una longitud menor de 27, 25, 20, 15 o 13 aminoácidos, aunque opcionalmente tienen una longitud de al menos 9 aminoácidos. El péptido de unión a TRPV6 comprende opcionalmente al menos 9-13, 10-15, 15-20, 20-25 o 20-27 aminoácidos. En algunas realizaciones, se pueden añadir aminoácidos a los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria. Se pueden preparar fácilmente péptidos más largos añadiendo una variedad de aminoácidos adicionales a la secuencia de SorC27 para producir un péptido de unión a TRPV6 que podría tener, por ejemplo, una longitud de hasta 30, 35, 40 o 45 aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos adicionales correspondientes a la secuencia de aminoácidos de soricidina tal como uno o más de los aminoácidos que están inmediatamente hacia el segmento N-terminal de SorC27 en la soricidina (SILARPAELNTETCILEC SEQ ID NO: 2), una secuencia de direccionamiento u otros aminoácidos) o mayor longitud.

En algunas realizaciones, los compuestos comprenden péptido de unión a TRPV6 conjugado con una biomolécula, que es opcionalmente una segunda proteína o péptido, directamente o a través de un espaciador. En algunas realizaciones, la molécula espaciadora puede ser una sustancia que contiene carbono. Por ejemplo, el espaciador puede ser un péptido corto, tal como de 3 aminoácidos (Gly-Gly-Gly) o más, o una cadena de carbono, por ejemplo, (CH₂)_n en la que n es opcionalmente igual a de 1 a 5, de 1 a 10, o mayor que 10. En otras realizaciones, el espaciador es opcionalmente un polímero, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un azúcar, un lípido o similar.

Como se indicó anteriormente, un péptido de unión a TRPV6 de la invención tendrá actividad de unión al canal de calcio. Los péptidos que tienen dicha actividad se identifican fácilmente con cualquier ensayo conocido adecuado para medir la unión de los péptidos con TRPV6. Por ejemplo, en una realización, un péptido que tiene actividad inhibidora del canal de calcio se identifica opcionalmente determinando que el péptido reduce la actividad del canal de calcio reduciendo (es decir, inhibiendo parcial o totalmente) el flujo de calcio a través de los canales de calcio. La actividad de unión a TRPV6 también puede medirse utilizando métodos tales como: fármacos de calciflúor internalizados (tales como FURA-2am); pinzamiento zonal de células enteras para medir la inhibición de las corrientes de calcio electrofisiológicas; ensayos de unión en equilibrio utilizando péptidos marcados con etiquetas detectables tales como etiquetas radiactivas o fluorescentes; y/o determinación de RMN de péptidos "unidos" y "no unidos". En algunas realizaciones, los péptidos de unión a TRPV6 también tienen i) bloqueo del canal de calcio y ii) ausencia de actividad paralizante.

La actividad de unión al canal de calcio se identifica opcionalmente utilizando una línea celular fácilmente disponible (por ejemplo, la línea celular de riñón embrionario humano - HEK293) transfectada con un vector de expresión para TRPV6. Dichas células transfectadas se dividen fácilmente en alícuotas y se conservan (generalmente a -80 °C) hasta que se requiera. Esto proporciona una preparación de células transfectadas estándar para examinar la detección de los canales de iones de calcio en las células y para examinar la inhibición de estas actividades de los canales de iones. Opcionalmente, los péptidos tienen una constante de inhibición en equilibrio menor de: 1000 nM, 150 nM o 100 nM en los modelos de células LNCaP, HEK293 o SKOV-3. Por ejemplo, la constante de disociación en equilibrio (K_d) para SorC27 es de 140 nM y para SorC13 es de 100 nM en un modelo LNCaP. En función de una relación lineal con el número de aminoácidos, se espera que la K_d de SorC9 sea de aproximadamente 90 nM.

Los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria incluyen opcionalmente análogos de los péptidos mencionados anteriormente. Los análogos de la proteína de la invención incluyen opcionalmente, pero no se limitan a, una secuencia de aminoácidos que contiene una o más sustituciones, inserciones, deleciones y/o mutaciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser de naturaleza conservada o no conservada. Las sustituciones de aminoácidos conservadas implican reemplazar uno o más aminoácidos de los péptidos de la invención con aminoácidos de características de carga, tamaño y/o hidrofobicidad similares. Cuando solo se realizan sustituciones conservadas, el análogo resultante debe ser funcionalmente equivalente. Las sustituciones no conservadas implican reemplazar uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos que poseen características de carga, tamaño y/o hidrofobicidad diferentes. El análogo es opcionalmente un peptido, que es una poliglicina N-sustituida con grupos R de aminoácido unidos al átomo de N. Otro análogo es opcionalmente un péptido sintetizado a partir de D-aminoácidos en lugar de los L-aminoácidos naturales.

Opcionalmente, en las secuencias peptídicas de unión a TRPV6 de la invención se introducen una o más inserciones de aminoácidos. Las inserciones de aminoácidos consisten en restos de aminoácidos únicos o aminoácidos secuenciales que varían, por ejemplo, de 2 a 15 aminoácidos de longitud.

- 5 Las delecciones consisten en la eliminación de uno o más aminoácidos, o partes distintas de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los aminoácidos delecionados pueden ser, o no, contiguos.

10 Los análogos de un péptido de unión a TRPV6 de la invención se preparan opcionalmente introduciendo mutaciones en una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. Las mutaciones en las secuencias de nucleótidos construidas para la expresión de análogos de una proteína de la invención conservan el marco de lectura de las secuencias codificantes. Además, preferentemente, las mutaciones no crearán regiones complementarias que puedan hibridarse para producir estructuras secundarias de ARNm tales como bucles u horquillas, que podrían afectar negativamente a la traducción del ARNm.

15 Las mutaciones se introducen opcionalmente en locus particulares, sintetizando oligonucleótidos que contengan una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permitan el ligamiento con fragmentos de la secuencia nativa. Después del ligamento, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácidos deseada.

20 Como alternativa, para proporcionar un gen alterado que tiene codones particulares, alterados de acuerdo con la sustitución, delección o inserción requerida, se emplean procedimientos de mutagénesis específicos de sitio dirigidos por oligonucleótidos. La delección o el truncamiento de un péptido de la invención también se realizan fácilmente utilizando sitios convenientes de endonucleasas de restricción, adyacentes a la delección deseada. Después de la restricción, se pueden rellenar salientes y se puede volver a ligar el ADN. Sambrook et al. (Sambrook J et al. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press) describen métodos ejemplares para realizar las alteraciones expuestas anteriormente.

Además, los análogos de un péptido de unión a TRPV6 de la invención, se preparan fácilmente mediante síntesis química utilizando técnicas muy conocidas en la química de proteínas, tales como síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149 - 2154) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart). Los péptidos de unión a TRPV6 de la invención también incluyen péptidos que tienen identidad de secuencia con un péptido de la invención, péptidos mutados y/o truncamientos de los mismos, como se describe en la presente memoria. Dichos péptidos tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a secuencias de ácido nucleico que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas (véase el análisis de las condiciones de hibridación rigurosas en la presente memoria) con una sonda utilizada para obtener un péptido de la invención. Los péptidos que tienen identidad de secuencia a menudo tienen las regiones que son características de la proteína.

Otros péptidos útiles de la invención comprenden opcionalmente, consisten esencialmente en o consisten en una 40 secuencia de aminoácidos con al menos: 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con toda o parte de la SEQ ID NO: 1 descrita en la presente memoria, en la que el péptido tiene actividad de unión a TRPV6. La identidad de secuencia se evalúa generalmente mediante el programa BLAST (por las siglas *Basic local alignment search tool*) versión 2.1 de búsqueda avanzada (parámetros como los anteriores; Altschul, SF, Gish, W., Miller, W., Myers, EW y Lipman, DJ. (1990) "Basic local alignment search tool". J. Mol. Biol. 215: 403-410). BLAST es una serie de programas que están disponibles en línea a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EE. UU. (Edificio de la Biblioteca Nacional de Medicina 38A Bethesda, MD 20894). La 45 búsqueda avanzada de Blast está configurada en parámetros predeterminados. Las referencias para los Programas Blast incluyen: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." Nature Genet. 3:266-272.; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." Genome Res. 7:649-656). En 50 una realización adicional, se proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo contra TRPV6 conjugado a una biomolécula.

Preparación de anticuerpos

60 En la presente memoria se describen anticuerpos contra TRPV6. Los anticuerpos contra los péptidos de unión a TRPV6, o los anticuerpos contra los compuestos que comprenden los péptidos de unión a TRPV6, son útiles para identificar la presencia del péptido en una muestra de ensayo. Sería útil cualquier método de marcaje del anticuerpo que informe sobre la densidad/ubicación del péptido (por ejemplo, péptido marcado radiactivamente o péptido marcado con fluorescencia). Por lo general, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. 65 Los anticuerpos también son valiosos para la inmunopurificación de péptidos. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto con el anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo

inmunológico entre el anticuerpo y un péptido reconocido por el anticuerpo y detectar la presencia o ausencia del complejo inmunológico por lo que se detecta la presencia del péptido de la invención en la muestra. En la presente memoria, para determinar la presencia de TRPV6, de los péptidos de unión a TRPV6 o de péptidos similares, se desvelan composiciones que incluyen el anticuerpo, un medio adecuado para la formación de un complejo

5 inmunológico entre el anticuerpo y un péptido reconocido por el anticuerpo y un reactivo capaz de detectar el complejo inmunológico.

Para reconocer los péptidos de unión a TRPV6 de la invención, se pueden generar anticuerpos contra una serie de epítomos únicos en todos os péptidos. Opcionalmente, para reconocer los compuestos que comprenden los péptidos

10 de unión a TRPV6, se pueden generar anticuerpos contra una serie de epítomos únicos en todo el compuesto.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales se preparan de acuerdo con la descripción de esta solicitud y con técnicas conocidas en la materia. Para ejemplos de métodos de preparación y usos de anticuerpos monoclonales, véanse las patentes de Estados Unidos. Nos. 5.688.681, 5.688.657, 5.683.693, 5.667.781, 5.665.356, 5.591, 628,

15 5.510.241, 5.503.987, 5.501, 988, 5.500.345 y 5.496.705. En las patentes de Estados Unidos Nos. 5.512.282, 4.828.985, 5.225.331 y 5.124.147 se desvelan ejemplos de preparación y usos de anticuerpos policlonales.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye fragmentos del mismo que también reaccionan específicamente con TRPV6 o con un péptido de unión a TRPV6 de la invención. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales y los fragmentos puede seleccionarse para utilizarlos de la misma

20 manera en la que se describió anteriormente. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'.

En una muestra, una proteína TRPV6 puede detectarse poniendo en contacto la muestra con péptidos de unión a TRPV6 y después detectando el péptido de unión a TRPV6 con un anticuerpo que se une selectivamente al péptido de unión a TRPV6. El anticuerpo puede unirse selectivamente a un péptido o compuesto de unión a TRPV6 de la invención, pero no a la soricidina.

25 En una muestra, una proteína TRPV6 puede detectarse poniendo en contacto la muestra con péptidos de unión a TRPV6 y después detectando el péptido de unión a TRPV6 con un anticuerpo que se une selectivamente al péptido de unión a TRPV6. El anticuerpo puede unirse selectivamente a un péptido o compuesto de unión a TRPV6 de la invención, pero no a la soricidina.

30 Compuestos de péptido de unión a TRPV6 conjugado con una biomolécula

Las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen nuevos compuestos que comprenden un péptido de unión a TRPV6 conjugado con una biomolécula. Como se usa en la presente memoria, una "biomolécula" incluye cualquier átomo o molécula que sea detectable a través de medios químicos, biológicos o físicos o que muestre actividad química o biológica. En algunas realizaciones, la "biomolécula" comprende una molécula inorgánica tal como grupos de boro y nanoestructuras de hierro, oro, plata y níquel. En una realización, la biomolécula comprende un marcador detectable o un agente terapéutico. En una realización, la biomolécula es una fracción del compuesto que se puede diferenciarse del componente de unión al TRPV6 del compuesto.

35 actividad química o biológica. En algunas realizaciones, la "biomolécula" comprende una molécula inorgánica tal como grupos de boro y nanoestructuras de hierro, oro, plata y níquel. En una realización, la biomolécula comprende un marcador detectable o un agente terapéutico. En una realización, la biomolécula es una fracción del compuesto que se puede diferenciarse del componente de unión al TRPV6 del compuesto.

Como se usa en la presente memoria, "conjugado con una biomolécula" se refiere a unir el péptido de unión a TRPV6 con una biomolécula. En algunas realizaciones, la unión es el resultado de un enlace químico entre un péptido de unión a TRPV6 y una biomolécula. En una realización, la unión es un enlace covalente. El péptido de unión a TRPV6 también puede conjugarse con una biomolécula utilizando tecnologías genéticas recombinantes en las que una secuencia de ácido nucleico codifica tanto al péptido de unión a TRPV6 como a una biomolécula de proteína. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TRPV6 está directamente unida a una biomolécula. En otras realizaciones, se usa un espaciador para unir el péptido de unión a TRPV6 con la biomolécula. En algunas realizaciones, una molécula de unión a TRPV6 también puede modificarse químicamente de tal manera que comprenda una biomolécula, tal como marcando radiactivamente el péptido de unión a TRPV6. En una realización, la biomolécula se conjuga con el péptido de unión a TRPV6 a través de un enlace que puede hidrolizarse mediante enzimas hidrolíticas generales.

40 Como se usa en la presente memoria, "conjugado con una biomolécula" se refiere a unir el péptido de unión a TRPV6 con una biomolécula. En algunas realizaciones, la unión es el resultado de un enlace químico entre un péptido de unión a TRPV6 y una biomolécula. En una realización, la unión es un enlace covalente. El péptido de unión a TRPV6 también puede conjugarse con una biomolécula utilizando tecnologías genéticas recombinantes en las que una secuencia de ácido nucleico codifica tanto al péptido de unión a TRPV6 como a una biomolécula de proteína. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TRPV6 está directamente unida a una biomolécula. En otras realizaciones, se usa un espaciador para unir el péptido de unión a TRPV6 con la biomolécula. En algunas realizaciones, una molécula de unión a TRPV6 también puede modificarse químicamente de tal manera que comprenda una biomolécula, tal como marcando radiactivamente el péptido de unión a TRPV6. En una realización, la biomolécula se conjuga con el péptido de unión a TRPV6 a través de un enlace que puede hidrolizarse mediante enzimas hidrolíticas generales.

Los compuestos y composiciones que se describen en la presente memoria pueden utilizarse para detectar o unir la proteína TRPV6 *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, los compuestos incluyen una biomolécula que comprende un marcador detectable. Para marcar de manera detectable los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria puede utilizarse cualquier sistema de marcaje biomolecular adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico y una enzima. En algunas realizaciones, la biomolécula puede comprender un marcador fluorescente, radioactivo o inmunológico. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "marcador fluorescente" o "fluoróforo" se refieren a una molécula o fracción que puede absorber energía de una longitud de onda específica y reenviar energía a una longitud de onda específica diferente. Por ejemplo, los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, Cy2, Flúor, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rojo Texas o rodamina. En algunas realizaciones, el compuesto incluye más de una biomolécula conjugada con péptidos de unión a TRPV6.

55 Los compuestos y composiciones que se describen en la presente memoria pueden utilizarse para detectar o unir la proteína TRPV6 *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, los compuestos incluyen una biomolécula que comprende un marcador detectable. Para marcar de manera detectable los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria puede utilizarse cualquier sistema de marcaje biomolecular adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico y una enzima. En algunas realizaciones, la biomolécula puede comprender un marcador fluorescente, radioactivo o inmunológico. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "marcador fluorescente" o "fluoróforo" se refieren a una molécula o fracción que puede absorber energía de una longitud de onda específica y reenviar energía a una longitud de onda específica diferente. Por ejemplo, los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, Cy2, Flúor, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rojo Texas o rodamina. En algunas realizaciones, el compuesto incluye más de una biomolécula conjugada con péptidos de unión a TRPV6.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para administrar biomoléculas útiles desde un punto de vista diagnóstico o terapéutico a tumores, tejidos o células que producen TRPV6. En algunas realizaciones,

65 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para administrar biomoléculas útiles desde un punto de vista diagnóstico o terapéutico a tumores, tejidos o células que producen TRPV6. En algunas realizaciones,

el compuesto incluye una biomolécula que es detectable por Tomografía de Emisión de Positrones (PET), detección radiométrica o por Imágenes de Resonancia Magnética (MRI).

En una realización, las biomoléculas conjugadas con los péptidos de unión a TRPV6 incluyen nanogrupos metálicos. En algunas realizaciones, los grupos metálicos tales como SPIO (óxido de hierro superparamagnético) proporcionan una detección muy sensible utilizando MRI (imágenes por resonancia magnética) que podría utilizarse para la detección primaria de tumores, tejidos y células ricos en TRPV6. Como se muestra en el Ejemplo 28 y en la Figura 23, el péptido SorC27 de unión a TRPV6 conjugado con SPIO se dirige a tumores y puede utilizarse para identificar tumores cancerosos *in vivo*.

Los compuestos y métodos descritos en la presente memoria permiten calcular el volumen del tumor o supervisar el cambio del volumen del tumor durante el ciclo de tratamiento del cáncer. Las microvesículas desprendidas de tumores ricos en TRPV6 y presentes en un líquido corporal también se detectan fácilmente mediante conjugados peptídicos de unión a metalo-TRPV6.

En otra realización, los péptidos de unión a TRPV6 se conjugan con biomoléculas que son radiomoléculas tales como biomoléculas que contienen ^{18}F . Estos compuestos se dirigen a tumores, células o tejidos que expresan TRPV6 y permiten la detección *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* utilizando exploración PET (tomografía por emisión de positrones) de tumores, células o tejidos que expresan TRPV6 (Cheng y col., J. Nucl. Med. 48: 987-994, 2007). De forma similar, las microvesículas desprendidas de tumores ricos en TRPV6 y presentes en la sangre, en otros líquidos corporales y en excrementos, pueden detectarse mediante derivados de los péptidos de unión a TRPV6 que contienen ^{18}F .

En una realización adicional, los péptidos de unión a TRPV6 conjugados con biomoléculas que contienen ^{125}I dirigen dichos compuestos a tumores, células o tejidos que expresan TRPV6 *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* para permitir la detección utilizando métodos radiométricos de estos tumores, células o tejidos (Bolton y col., Biochem. J., 133, 529-539, 1973). De forma similar, las microvesículas desprendidas de tumores ricos en TRPV6 y presentes en la sangre, en otros líquidos corporales y en excrementos, pueden detectarse utilizando los compuestos descritos en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los compuestos desvelados en la presente memoria incluyen una biomolécula que es un agente terapéutico. Como se usa en la presente memoria, un "agente terapéutico" es una sustancia utilizada en el tratamiento, cura, prevención o supresión de una enfermedad, trastorno o problema de salud. Un agente terapéutico también puede utilizarse en el tratamiento, cura, prevención o supresión de cualquier síntoma asociado a una enfermedad, trastorno o problema de salud.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente contra el cáncer. Los ejemplos de agentes contra el cáncer incluyen, pero no están limitados a, fármacos basados en taxano, fármacos basados en platino, antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina, ciclofosfamida), inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido), agentes alquilantes (por ejemplo, ifosfamida), alcaloides vegetales (p. ej. vinorelbina) y antimetabolitos (por ejemplo, fluorouracilo).

En algunas realizaciones, la biomolécula es una pequeña molécula de fármaco, un oligosacárido, un anticuerpo, un epítopo de anticuerpo, un grupo nanometálico, una molécula marcada radiactivamente, un fármaco basado en taxano, un fármaco de tipo antraciclina, un fármaco basado en platino, un antibiótico, un fármaco contra el cáncer, un antifúngico, antivírico o antirretrovírico, o un complejo de boro.

En algunas realizaciones, el compuesto comprende un péptido de unión a TRPV6 unido a una biomolécula a través de un espaciador. En una realización, la biomolécula es una proteína o un péptido y el compuesto es una proteína de fusión del péptido de unión a TRPV6 y la biomolécula. Opcionalmente, la proteína de fusión incluye un espaciador peptídico entre el péptido de unión a TRPV6 y la biomolécula.

También se desvela un ácido nucleico aislado que codifica un péptido de unión a TRPV6 de la invención, tal como un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 1 o uno de sus fragmentos descritos en la presente memoria. También se desvelan anticuerpos aislados contra un péptido de la invención, incluyendo un anticuerpo que se une selectivamente a un péptido de la invención, pero que no se une a soricidina.

Compuestos de anticuerpos contra TRPV6 conjugados con una biomolécula

Se desvela un anticuerpo contra TRPV6 conjugado con una biomolécula. Estos compuestos pueden generarse y utilizarse como se describe en la presente memoria para compuestos que comprenden péptidos de unión a TRPV6 conjugados con una biomolécula. Por ejemplo, los anticuerpos contra TRPV6 pueden conjugarse con una biomolécula, tal como una etiqueta detectable o agente contra el cáncer, bien directamente o a través de un espaciador.

Como se muestra en los Ejemplos 3 y 25, los anticuerpos contra TRPV6 y el péptido de unión a TRPV6, SorC27-cy5.5, marcado con fluorescencia, se colocan en células HEK293 que expresan TRPV6 recombinante, así como en muestras de adenocarcinoma papilar seroso de Grado II.

5 Detección de TRPV6

Los compuestos de la invención se unen a los canales de calcio de TRPV6 y, en algunas realizaciones, son útiles para identificar canales de calcio en células, tejidos, tumores o microvesículas. Los péptidos pueden ser útiles para identificar células, tumores, tejidos o microvesículas que no expresan TRPV6. Como alternativa, los péptidos son
10 útiles para identificar o marcar células, tejidos, tumores o microvesículas que expresan grandes cantidades de canales de calcio. Los compuestos de la invención son útiles para cuantificar la cantidad de TRPV6 en una muestra.

Por consiguiente, algunas realizaciones descritas en la presente memoria incluyen un método para detectar la proteína TRPV6 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un compuesto de unión a TRPV6 y detectar el compuesto de unión a TRPV6, detectando así la proteína TRPV6. En una realización, el
15 compuesto de unión a TRPV6 puede detectarse utilizando un anticuerpo que se une selectivamente al péptido de unión a TRPV6.

Los compuestos descritos en la presente memoria, que incluyen un marcador detectable, también son útiles para detectar la proteína TRPV6 o células, tejidos, tumores o microvesículas que expresan la proteína TRPV6. Por consiguiente, las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen métodos para detectar la proteína TRPV6 en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con uno cualquiera de los compuestos que comprende una biomolécula detectable descrita en la presente memoria y detectar la biomolécula conjugada con el
20 péptido de unión a TRPV6.

Como se usa en la presente memoria, "muestra" se refiere a una muestra biológica representativa de un organismo o parte de un organismo. Los ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras de líquidos biológicos, sangre, tejidos, biopsias de tejidos, muestras tomadas de cultivos tisulares, líquidos biológicos, extractos tisulares, células recientes recogidas, microvesículas y lisados de células que se han incubado en cultivos celulares. Una
25 "muestra" también puede referirse a un área o volumen definido de un organismo, *in vivo* o *ex vivo*, tal como un volumen o área de muestra para la formación de imágenes por resonancia magnética. En una realización, la muestra es una muestra *in vitro* de un sujeto, tal como una muestra de sangre extraída del sujeto.

Como se usa en la presente memoria la frase "poner en contacto la muestra" incluye generalmente, pero no se limita a, mezclar o incubar la muestra con un compuesto como se describe en la presente memoria, y la muestra puede incluir componentes adicionales tales como un tampón, una solución o un reactivo de ensayo. "Poner en contacto la muestra" también puede incluir inyectar o administrar a un organismo un compuesto descrito en la presente
35 memoria.

40 Identificación y diagnóstico de cáncer

Se ha demostrado que el TRPV6 está sobreexpresado en diversas líneas celulares de cáncer. Por lo tanto, los compuestos de unión a TRPV6 desvelados en la presente memoria son útiles para detectar células que han sobreexpresado TRPV6 y, por consiguiente, para identificar o diagnosticar tumores o cáncer *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.
45

Se ha demostrado que los compuestos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria se unen a, y se colocan con, TRPV6 *in vitro*. Como se muestra en la Figura 6 y en el Ejemplo 3, un compuesto que comprende SorC27 conjugado con una etiqueta fluorescente infrarroja se une a TRPV6 expresado en células HEK293 por transfección de las células con un vector de expresión, pero no en células HEK293 sin un vector transfectado que expresa TRPV6. La Figura 6 también muestra que el compuesto de unión a TRPV6 se coloca con un anticuerpo marcado con fluorescencia contra TRPV6. Las Figuras 7-9 muestran además que SorC27 se coloca con TRPV6 en la línea celular de cáncer de próstata PC-3, la línea celular de cáncer de mama T 47D y la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3.
50

TRPV6 se expresa en muestras extraídas de biopsias de tumores de ovario humano. Como se muestra en la Figura 10 y en el Ejemplo 4, se identificaron transcritos de TRPV6 en bibliotecas de ADNc de biopsias de tumores de tejido de ovario humano. La cantidad de TRPV6 en cada muestra se calculó y también se midieron cuantitativamente por densitometría los niveles del gen constitutivo de la β -actina. La Tabla 1 proporciona el tipo de tumor, la relación entre TRPV6 / β -actina y el nivel cualitativo de TRPV6 de 18 pacientes con tumores de ovario.
60

Código de paciente	Tipo de tumor de ovario	Relación entre TRPV6/ β -actina	Nivel cualitativo de TRPV6
LTL-175	carcinoma de células claras	1,1	++++
LTL-205	adenocarcinoma seroso	0,2	++
LTL-234	carcinoma mucinoso	0,8	+++
LTL-237	adenocarcinoma seroso	0,4	++
LTL-246	adenocarcinoma seroso	1,8	++++
LTL-247	adenocarcinoma seroso	0,3	+++
LTL-258	adenocarcinoma seroso	0,5	+++
LTL-259	adenocarcinoma seroso	0,4	++
LTL-260	carcinoma in diferenciado	0,5	+++
LTL-269	adenocarcinoma seroso	1,8	+++++
LTL-273	adenocarcinoma endometriode	0,6	+++
LTL-284	limítrofe seroso	0,5	++
LTL-290	carcinoma seroso	2,9	+++
LTL-300	adenocarcinoma endometriode	1,1	+++
LTL-305	carcinoma de células claras	0,3	+
LTL-315	carcinoma seroso	0,5	++
LTL-317	carcinoma de células claras	0,4	++
LTL-320	hasta ahora desconocido	0,4	+

Tabla 1: cantidades relativas de transcritos de TRPV6 en 18 biopsias de tumores de ovario humano, detectadas mediante PCR, de bibliotecas de ADNc producidas a partir de los tumores, y relación de la densidad de banda integrada del amplicón de TRPV6 con respecto a la del gen constitutivo de la β -actina.

El ADNc de TRPV6 también se identificó en diversas bibliotecas de ADNc preparadas a partir de extractos de ARN total de líneas celulares de cáncer de ovario humano entre las que se incluyen OVCAR3, SKOV3, OVC13, HEYC2 y OV2008 como se muestra en la Figura 11.

También se determinó la expresión de TRPV6 en relación con la expresión del gen constitutivo de la β -actina en una serie de líneas de cáncer de mama entre las que se incluyen T47D, HCC1954 y MB468 como se muestra en la Figura 12A y 12B. En la Tabla 2 se muestra el resultado del estado del ARNm de TRPV6 con respecto a diversas líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer de ovario.

Líneas celulares de cáncer de mama	Estado del ARNm de TRPV6
MB 231	Positivo
MB468	Positivo
T 47D	Positivo
H CC1954	Positivo
MCF 7	Positivo
Líneas celulares de cáncer de ovario	Estado del ARNm de TRPV6
OVCAR-3	Positivo
SKOV-3	Positivo
OV 90	Positivo
HeyC2	Positivo
OV 2008	Positivo
OV C13	Positivo

Tabla 2: estado del ARNm de TRPV6 de líneas celulares de cáncer de mama y de ovario humano.

5 El ADNc de TRPV6 también se detectó en una biblioteca de ADNc preparada a partir de una línea celular de cáncer de próstata humano como se muestra en la Figura 13.

Además, se demostró que los niveles de la proteína TRPV6 estaban sobreexpresados en diversas líneas celulares de cáncer diferentes y en muestras de tumores de ovario como se muestra en las Figuras 14-16 y en el Ejemplo 5.

10 Por consiguiente, las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen un método para identificar o diagnosticar cáncer en una muestra de ensayo de un sujeto que comprende detectar la proteína TRPV6 en la muestra de ensayo y comparar la cantidad de proteína TRPV6 en la muestra de ensayo con una muestra de control. En una realización, una cantidad aumentada de ARNm o de proteína TRPV6 en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control es indicativa de cáncer. En una realización, un aumento mínimo de al menos 10 % es indicativo de cáncer. En otra realización, una cantidad aumentada de al menos: 20 %, 50 % o 100 % de ARNm o proteína en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control es indicativa de cáncer. En algunas realizaciones, un aumento de 3 veces la cantidad de ARNm o proteína de TRPV6 en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control es indicativo de cáncer. Los ejemplos de tejidos en los que en el control estaría presente la proteína TRPV6 son colon, riñón, próstata y mama. En otros tejidos, tales como cualquier tejido derivado de endotelio, TRPV6 no se expresa en absoluto, por lo que la detección de la presencia de ARNm o proteína de TRPV6 en la muestra de ensayo es indicativa de la presencia de cáncer. Por lo tanto, en dichos tejidos pueden realizarse métodos detectando TRPV6 en la muestra de ensayo, sin utilizar también una comparación de muestra de control.

25 Los tumores ricos en TRPV6 son casi exclusivamente de origen epitelial, aunque algunas líneas celulares de cáncer de próstata, tales como DU145, no expresan TRPV6. Los tipos de cáncer que son ricos en TRPV6 incluyen, pero no se limitan a, cánceres de ovario, mama, próstata, hígado, endometrio, glía, colon, páncreas y leucemia.

30 En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, tal como un ser humano. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se utilizan *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra de control" incluye cualquier muestra que pueda utilizarse para establecer un nivel base o normal, y puede incluir muestras extraídas de personas o tejidos sanos. En algunas realizaciones, la "muestra de control" es un control estandarizado predeterminado. En algunas realizaciones, la "muestra de control" es un valor, umbral o intervalo predeterminado.

40 Como se usa en la presente memoria, la frase "identificar cáncer" incluye la detección de células en una muestra de un sujeto que ha perdido mecanismos de control normales y que tiene un crecimiento proliferativo no regulado. Opcionalmente, "identificar cáncer" en una muestra de un sujeto puede referirse a diagnosticar cáncer en el sujeto.

45 Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para proporcionar información adicional con respecto a un tumor o cáncer. La determinación del estadio o tipo de cáncer generalmente incluye la determinación de información con respecto al estadio del cáncer (por ejemplo, estadio del tumor) o tipo de cáncer. El estadio del cáncer puede determinarse, como se sabe en la técnica, utilizando el sistema Tumor, Ganglio, Metástasis (TNM). La T (de Tumor) refleja el tamaño del tumor primario y dónde se localiza; la N (de ganglio, *Node* en inglés) refleja si el tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos; y la M (de metástasis) refleja si el cáncer ha hecho metástasis (véase, por ejemplo, AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) publicado por Springer-Verlag New York,

incorporado aquí como referencia). Por ejemplo, en una realización, el cáncer es cáncer de ovario y pueden utilizarse las siguientes pautas de estadificación:

Estadio I (en ovarios): T1, N0, M0 con subestadios IA, B, C (donde G y M continúan siendo "0")

Estadio II (en uno o ambos ovarios, invasión pélvica): T2, N0, M0 con subestadios II A, B, C (donde N y M continúan siendo "0")

Estadio III (en ovarios, región pélvica y propagación en la zona peritoneal > 2 cm: T3 N0, M0 con subestadios III A, B, C (donde N y M continúan siendo "0"); estadio IIIC (en ganglios linfáticos): T, N1, M0

Estadio IV (propagación a órganos distantes): cualquier T, cualquier N, M1

Opcionalmente, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para caracterizar adicionalmente un tumor proporcionando una estimación del volumen del tumor, la ubicación del tumor o el tipo de tumor. El diagnóstico de cáncer incluye obtener información de respuesta a terapia tal como para determinar el resultado de un ciclo de terapia contra el cáncer sobre el tamaño del tumor generalmente medido como volumen del tumor.

Como se muestra en el Ejemplo 24, los niveles de TRPV6 son mayores en muestras tisulares de sujetos con cáncer en comparación con muestras de tejido normal. Más específicamente, la Figura 18 y la Tabla 3 muestran que las muestras de micromatriz tisular del adenocarcinoma papilar seroso de Grado I, II y III presentaron más expresión de TRPV6 en comparación con muestras de tejido de ovario normal. Los niveles de TRPV6 son útiles para diferenciar entre cánceres de grado I en estadio temprano en comparación con muestras normales. Por consiguiente, la detección de TRPV6 utilizando anticuerpos o los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria, es útil para identificar o diagnosticar sujetos con cáncer o con una mayor probabilidad de desarrollar cáncer. Opcionalmente, los niveles de expresión de TRPV6 son útiles para clasificar cánceres o identificar formas más agresivas de cáncer.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para identificar o diagnosticar cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de sangre, cáncer de cerebro, cáncer de retina, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células gliales o de endometrio.

La medición de la expresión del gen *trpv6*, a través de la medición de la cantidad de ARNm de TRPV6 o transcritos de ADNc correspondientes producidos en una muestra o célula de línea celular, proporciona una herramienta de diagnóstico para identificar cáncer en una muestra. La presencia o cantidad de ARNm o transcritos de TRPV6 en una muestra de un sujeto puede utilizarse para diagnosticar o indicar el estadio del cáncer en el sujeto. Por ejemplo, la Figura 24 muestra que los niveles relativos de ARNm de TRPV6 en sangre son significativamente mayores en sujetos con cáncer en comparación con los niveles en controles sanos. Por consiguiente, la presencia o cantidad de ARNm o transcritos de TRPV6 en una muestra de un sujeto puede ser útil para identificar cáncer en un sujeto. La presencia o cantidad de ARNm o transcritos de TRPV6 en una muestra puede ser útil para identificar cáncer de ovario, mama o próstata en un sujeto.

Como se muestra en la Figura 25, la cantidad relativa de proteína TRPV6 también es mayor en muestras de plasma de sujetos con cáncer de ovario en estadio I o II en comparación con controles sanos. Por consiguiente, la detección de la proteína TRPV6 es útil para identificar cáncer en un sujeto. Por ejemplo, los niveles de proteína TRPV6 en una muestra de ensayo de un sujeto pueden compararse con niveles de proteína TRPV6 en una muestra correspondiente de un control sano, en donde niveles más altos de TRPV6 en la muestra de ensayo son indicativos de cáncer. La muestra de ensayo puede ser una muestra de sangre o plasma y un nivel de TRPV6 que es dos veces más alto que el nivel en una muestra correspondiente de un control sano puede ser indicativo de cáncer.

Como se expone en el Ejemplo 1 y en las Figuras 1 a 3, los péptidos de unión a TRPV6 se localizan predominantemente en los ganglios linfáticos, pero también en el pulmón, el hígado y el riñón, que son sitios habituales donde se localiza el cáncer metastásico. Por consiguiente, los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria son útiles para detectar y unirse a cáncer metastásico, que incluyen glioblastomas y cánceres que se han propagado al pulmón, hígado, riñón, bazo, páncreas y médula ósea.

Los péptidos y compuestos descritos en la presente memoria son particularmente útiles para detectar y unirse a metástasis de ganglios linfáticos. Las "metástasis de ganglios linfáticos" incluyen opcionalmente cáncer de pulmón (Mujoomdar et al, 2007), cáncer gástrico, carcinoma de cuello uterino (Lyshchik et al., 2007), carcinoma vulvar (Vernooij et al, 2007), cáncer endometrial (Aalders et al, 2007), carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Veness et al., 2007), cáncer de esófago y garganta, carcinoma nasofaríngeo (Ma et al., 2007), cáncer gastrointestinal (Wind et al., 2006), cáncer de vejiga, cáncer cerebral (Mujoomdar et al., 2007), cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de células gliales y cáncer colorrectal. Los péptidos de la invención son por lo tanto útiles para detectar cáncer en un mamífero en cualquiera de los estadios I, II, III o IV del cáncer.

Los péptidos y composiciones de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria también son útiles para detectar canales de TRPV6 intactos presentes en microvesículas desprendidas de tumores, que circulan en la sangre o células cancerosas que circulan en la sangre. En algunas realizaciones, las microvesículas desprendidas de tumores que expresan TRPV6, o células cancerosas que circulan en líquidos corporales o excrementos, pueden detectarse

por métodos basados en PCR (por ejemplo, RT-PCR o Q-RT-PCR) o basados en anticuerpos (por ejemplo, transferencia de Western, detección de inmunofluorescencia en biopsias o cuerpos tales como células o microvesículas en líquidos corporales o excrementos). Por ejemplo, las microvesículas intactas derivadas de células tumorales y presentes en un líquido corporal o excrementos mostrarían una población de canales de TRPV6 cuando se tratan con anticuerpos contra TRPV6 o péptidos de unión a TRPV6 conjugados con una biomolécula detectable. Por ejemplo, las Figuras 24 a 26 muestran que las muestras de sangre y plasma extraídas de sujetos con cáncer, incluido cáncer en estadio I, tienen niveles significativamente más altos de ARNm o proteína de TRPV6 en comparación con controles sanos. Por lo tanto, el análisis de líquidos corporales, tales como sangre o plasma, para determinar la presencia de ARNm o proteína de TRPV6, proporciona un análisis relativamente sencillo para la detección de cáncer en estadio temprano, en comparación, por ejemplo, con la detección de tumores y análisis de biopsias tumorales para determinar la presencia de células cancerosas.

Los anticuerpos desarrollados contra los péptidos de unión a TRPV6 son útiles para detectar *in vitro* o *ex vivo* el complejo péptido de unión a TRPV6 / TRPV en tumores, tejidos o células, etiquetando los anticuerpos contra el péptido de unión a TRPV6, con una entidad detectable (etiqueta fluorescente, etiqueta radiactiva, etc.). De forma similar, las microvesículas desprendidas de tumores ricos en TRPV6 y presentes en líquidos corporales o excrementos, se detectan fácilmente por dichos anticuerpos o conjugados de los péptidos de unión a TRPV6.

Administración de fármacos y método de fabricación

Los compuestos de la invención son útiles para administrar biomoléculas a tumores, células o tejidos que expresan TRPV6. Como se muestra en los Ejemplos 26 y 28, los péptidos de unión a TRPV6 son capaces de dirigirse a células que expresan TRPV6 y administrar compuestos a sitios tumorales *in vivo*.

Por consiguiente, en la presente memoria se desvela un método de fabricación de un compuesto farmacéutico conjugando una biomolécula con un péptido de unión a TRPV6. Las biomoléculas se conjugan fácilmente con los péptidos de unión a TRPV6 o anticuerpos contra péptidos de unión a TRPV6, mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los expuestos en los Ejemplos 1, 11-13, 16, 19-23, 26 y 28.

Las biomoléculas pueden conjugarse con el péptido de unión a TRPV6 uniendo directa o indirectamente el péptido de unión a TRPV6 con la biomolécula. El péptido de unión a TRPV6 puede conjugarse con Cy5.5 en el único tior de cisteína a través de una reacción activada con maleimida. Como alternativa, la biomolécula puede ligarse al extremo C o N del péptido. La biomolécula puede ligarse, de manera alternativa, a través de cualquier otro sitio molecular adecuado, tal como un grupo funcional de la cadena lateral del péptido.

La biomolécula también puede conjugarse con un péptido de unión a TRPV6 mediante modificación química tal como mediante un enlace éster o un enlace amida. Por ejemplo, en Peng Li et al., *Biopolymers* 87: 225-230, 2007; en la patente de Estados Unidos No. 6.348.317 y en las solicitudes de Estados Unidos No. 20070218502 y 20070020264, se describen diversos métodos para conjugar péptidos con una biomolécula.

También se proporciona un método para fabricar un compuesto farmacéutico que comprende conjugar una biomolécula con un anticuerpo contra TRPV6.

En la presente memoria también se desvela un método para administrar una composición farmacéutica a una célula que expresa TRPV6, que comprende poner en contacto la célula con un compuesto que comprende i) un péptido de unión a TRPV6 conjugado con una biomolécula y ii) un vehículo. Los métodos para administrar una composición farmacéutica incluyen métodos para administrar las composiciones que comprenden los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria.

Los compuestos pueden comprender opcionalmente un péptido de unión a TRPV6 químicamente alterado para administrar grupos nanometálicos a tumores, tejidos o células (por ejemplo, nanopartículas de oro, nanoesferas, nanotubos u otras nanoconstrucciones) que, cuando se irradian con radiación electromagnética, calientan las células y las destruyen en las proximidades del grupo metálico.

El compuesto puede comprender péptidos de unión a TRPV6 que están químicamente alterados para administrar grupos de boro (por ejemplo, un grupo cloro-boro que contiene 12 átomos de boro) que, cuando se irradian con neutrones térmicos lentos, producen partículas alfa energéticas que destruyen células cercanas.

Otros compuestos pueden comprender péptidos de unión a TRPV6 de la invención que están químicamente alterados para administrar, a tumores, células o tejidos que producen TRPV6, antígenos que sirven para reclutar anticuerpos preexistentes contra los tumores, tejidos o células ricos en TRPV6. Esto, a su vez, marcaría los cánceres para su destrucción por el sistema de células inmunitarias.

Los compuestos descritos en la presente memoria también son útiles para administrar a tumores, células o tejidos que producen TRPV6, nuevos antígenos hacia los cuales se desarrollan y administran específicamente anticuerpos

monoclonales, siendo el resultado etiquetar con anticuerpos los cánceres ricos en TRPV6. Esto marcaría los cánceres para su destrucción por el sistema de células inmunitarias.

Los compuestos descritos en la presente memoria también son útiles para administrar moléculas marcadas radiactivamente unidas por enlace covalente a las que administran una dosis de radiación terapéutica a tumores, tejidos o células ricos en canales de TRPV6.

Opcionalmente, los compuestos descritos se administran a tumores, células o tejidos que producen TRPV6, a agentes terapéuticos unidos por enlace covalente, tales como fármacos basados en taxano, fármacos de tipo antraciclina, fármacos basados en platino o cualquier otra molécula terapéutica. Los métodos y compuestos descritos en la presente memoria también son útiles para administrar antibióticos, antifúngicos, antivíricos y antirretrovíricos o cualquier otro fármaco terapéutico a células que expresan TRPV6 o a ganglios linfáticos, pulmón, hígado y/o riñón.

Detección de tumores cancerosos en un sujeto

Como se muestra en los Ejemplos 26 y 28 y en las Figuras 21 y 23 correspondientes, la detección de TRPV puede utilizarse para identificar un tumor canceroso en un sujeto *in vivo*. Tal como se usa en la presente memoria, "identificar un tumor canceroso" se refiere a localizar o detectar una región en una muestra o en un sujeto que tiene un tumor canceroso. Como se usa en la presente memoria, "tumor canceroso" se refiere a una neoplasia o a una lesión sólida formada por el crecimiento anómalo de células que han perdido el mecanismo de control normal y tienen un crecimiento proliferativo no regulado. Se ha demostrado que diversos cánceres sobreexpresan TRPV6 y, por lo tanto, generan tumores ricos en TRPV6 (véanse los Ejemplos 4 y 5). Por consiguiente, los compuestos de la invención pueden utilizarse en un método para detectar un tumor canceroso en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto un compuesto de la invención, y detectar el péptido de unión a TRPV6 en el sujeto, detectando de ese modo TRPV6. Preferentemente, los compuestos también incluyen un marcador detectable que facilita la detección de TRPV6 en el sujeto. Por ejemplo, en una realización, el péptido de unión a TRPV6 es SorC27, y el marcador detectable es Cy5.5. En otra realización, el péptido de unión a TRPV6 se conjuga con un agente de contraste de formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) tal como óxido de hierro superparamagnético y la MRI se utiliza para detectar regiones en una muestra o en un sujeto con niveles aumentados de TRPV6. Las regiones del sujeto que presentan niveles aumentados de TRPV6 en relación con un nivel de control, son indicativas de un tumor rico en TRPV6 en esa región. Los modelos matemáticos que comparan la distribución de TRPV6 en el sujeto se aplican fácilmente para identificar regiones específicas del sujeto que tiene niveles aumentados de TRPV6 que son indicativos de un tumor rico en TRPV6. En algunas realizaciones, se utiliza un nivel promedio de TRPV6 observado en un sujeto para normalizar los niveles de TRPV6 e identificar regiones específicas con expresión aumentada de TRPV6. En otras realizaciones, los niveles de TRPV6 se comparan con un nivel de control preestandarizado o con niveles observados en regiones correspondientes en sujetos que se sabe que no contienen tumores cancerosos ricos en TRPV6.

Un experto en la técnica apreciará diversas de técnicas de formación de imágenes y marcadores detectables correspondientes que son adecuadas para detectar tumores ricos en TRPV6 de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, opcionalmente, los péptidos de unión a TRPV6 se marcan radiactivamente y se detectan con un contador de centelleo. Como alternativa, los péptidos de unión a TRPV6 se marcan con fluorescencia y se detectan utilizando un sistema de detección óptica. En una realización, los péptidos de unión a TRPV6 se conjugan con un agente de contraste. Como se usa en la presente memoria, un "agente de contraste" es una sustancia utilizada para mejorar el contraste de estructuras o células dentro de una muestra de sujeto en imágenes médicas. En una realización, el agente de contraste es un agente de contraste MRI, tal como un agente que altera el tiempo de relajación T1 o T2 de los protones localizados cerca. Como ejemplos de agentes de contraste de MRI se incluyen gadolinio paramagnético, manganeso paramagnético u óxido de hierro superparamagnético (SPIO).

Propiedades adicionales de los péptidos

Los péptidos de unión a TRPV6 de los compuestos descritos en la presente memoria, tales como SorC13 y SorC27, son generalmente estables en solución acuosa a 4 °C durante al menos 3 semanas sin ningún cambio en la pureza tal y como se mide por HPLC. Como sólidos secos, los péptidos son generalmente estables a -80 °C durante al menos 1,5 años.

Los péptidos de unión a TRPV6 también impiden que se produzcan efectos adversos importantes de los productos farmacéuticos relacionados con la capacidad de una sustancia para atravesar la barrera protectora del sistema nervioso central, la barrera hematoencefálica. La incapacidad de los péptidos de la invención para atravesar esta barrera protectora evita la posible toxicidad para el sistema nervioso central.

Los péptidos de la invención, particularmente los péptidos más cortos, tales como SorC13, son generalmente menos antigénicos. Los péptidos que tienen un número de aminoácidos igual o inferior al límite empírico de antigenicidad (generalmente se considera que son 13 aminoácidos para los péptidos en general) no poseen antigenicidad.

Se proporcionan kits preenvasados que comprenden algunos o todos los reactivos necesarios para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. Opcionalmente, los kits pueden incluir una o más muestras de control. Puede conocerse que la muestra de control expresa o contiene TRPV6 (un control positivo), o puede ser un control negativo que se sabe que no expresa o contiene TRPV6. Puede conocerse que la muestra de control expresa o contiene un cierto nivel de TRPV6 o corresponde a un tipo o estadio específico de cáncer. Los kits pueden incluir al menos un compuesto que comprende un péptido de unión a TRPV6 como se describe en la presente memoria, y una solución tampón. Los kits pueden incluir cebadores de ácido nucleico para amplificar o detectar ARNm de TRPV6 en una reacción en cadena de la polimerasa. Los kits también pueden incluir nucleótidos, enzimas y tampones útiles en el método de la invención, así como marcadores electroforéticos, tales como una escalera de pb. Los kits pueden incluir instrucciones detalladas para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la invención y no limitan el alcance de la misma.

EJEMPLO 1: Distribución tisular de SorC13 y SorC27

Se marcaron SorC13 y SorC27 con la sonda de infrarrojo cercano, Cy5.5. SorC13 se marcó en lisina-1 y lisina-8 con la sonda fluorescente infrarroja cy5.5 mediante una reacción con el proceso activado por NHS éster de Cy5.5. SorC27 se marcó en el único tiol de cisteína con la reacción activada con maleimida de Cy5.5. Los péptidos marcados se purificaron con una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño y HPLC. El marcador, Cy5.5, emite fluorescencia en la región infrarroja después de su excitación con un láser de barrido. El láser de baja energía es capaz de penetrar en el animal a aproximadamente 1 cm y, por lo tanto, al explorar las posiciones decúbito prono y supino, la presencia de los péptidos etiquetados se puede cuantificarse en tres dimensiones.

Los péptidos marcados con Cy5.5 se inyectaron por vía intravenosa en ratones CD1 (4 para cada compuesto) a 100 ug por animal en 100 ul, y utilizando un sistema de imagen óptica, Optix eXplorer (GE Healthcare Systems) a diferentes momentos (30 min, 90 min, 4 h), se obtuvieron imágenes de los animales vivos. Algunos animales se observaron 24 horas después de la perfusión para extraer la sangre (y la linfa). La biodistribución de los péptidos marcados en diferentes órganos y tejidos se visualizó y cuantificó relativamente mediante análisis de imágenes ópticas. Este protocolo permite la visualización de la ubicación de los péptidos marcados y cómo cambia la ubicación con el tiempo. La Figura 1 muestra la ubicación de los ganglios linfáticos en el ratón. Los ganglios que acumularon los péptidos marcados están indicados con la línea 1 (ganglios cervicales superficiales), línea 4 (ganglios axilares), línea 5 (ganglios humerales), línea 8 (ganglios mesentéricos) y línea 9 (ganglios inguinales). Las Figuras 2, 3 y 4 muestran las cantidades de péptidos marcados en diversos órganos *ex vivo*. Combinados, estos experimentos muestran que:

- Ninguno de los péptidos C atravesó la barrera hematoencefálica.
- SorC13 y SorC27 etiquetados se localizan predominantemente en los ganglios linfáticos, pulmón, hígado y riñón.
- SorC13 y SorC27 etiquetados eran aun detectables en estos tejidos después de la perfusión a las 24 horas.
- La medición del tiempo de vida de la fluorescencia en varios órganos mostró que el metabolismo de los péptidos marcados parece estar en el hígado y el riñón, ya que Cy5.5 tiene un tiempo de vida corto en comparación con los aductos de péptido / Cy5.5.
- Los péptidos de unión a TRPV6 son capaces de dirigir TRPV6 con un "cargamento" ligado a los péptidos que pueden administrarse a estos tejidos

EJEMPLO 2: Colocalización de anticuerpos contra TRPV6 y TRPV6 marcados con fluorescencia expresados en células de cáncer humano

Como se muestra en la Figura 5, el TRPV6 expresado en una línea celular de cáncer (SKOV-3) o en muestras *ex vivo*, se detecta opcionalmente utilizando un anticuerpo primario contra la proteína TRPV6, seguido de un anticuerpo secundario que es, en sí mismo, detectable. Adicionalmente, los cánceres se detectan fácilmente utilizando los péptidos de unión a TRPV6 conjugados o etiquetados con una molécula detectable. Como alternativa, un anticuerpo desarrollado contra los péptidos de unión a TRPV6 se etiqueta fácilmente con una entidad detectable, tal como una etiqueta fluorescente o etiqueta radioactiva.

Además, un anticuerpo contra los péptidos de unión a TRPV6 se desarrolla fácilmente y se utiliza de manera inmunoquímica tradicional para tejidos (*in vitro*), tumores, células o microvesículas.

EJEMPLO 3: Colocalización de péptidos de unión a TRPV6 marcados con fluorescencia y anticuerpos contra TRPV6 en células HEK269

Con un vector de expresión de TRPV6 se transfectaron células HEK-293 y se incubaron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra los péptidos N-terminales de TRPV6, así como con SorC27 marcado con fluorescencia (SorC27-cy5.5). Las células HEK-293 que no se transfectaron con un vector de expresión de TRPV6, también se incubaron con anticuerpos contra TRPV6 marcados con fluorescencia y SorC27-cy5.5 como control negativo (Figura 6A).

Como se muestra en las Figuras 6B a 6D, SorC27-cy5.5 se unió a TRPV6 como se indica por la colocación de SorC27-cy5.5 y anti-TRPV6. Este experimento muestra que los compuestos descritos en la presente memoria se dirigen y se unen a TRPV6 y además que los compuestos que comprenden un péptido de unión a TRPV6 conjugado con una biomolécula, se localizan efectivamente en células que expresan TRPV6.

EJEMPLO 4: Expresión del ARNm de TRPV6 en líneas celulares de cáncer y biopsias tumorales como diagnóstico de cáncer y estadificación de cánceres

Como se muestra en las Figuras 10-13, la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores dirigidos hacia transcritos de TRPV6, detecta la regulación positiva del ARNm de TRPV6 en bibliotecas de ADNc producidas a partir de extractos de ARN total de células cancerosas o biopsias de tumores cancerosos humanos.

Para cuantificar la cantidad relativa de transcritos de TRPV6 en una muestra, los transcritos también se amplificaron y se detectaron para el gen constitutivo de β -actina y se registró la relación observada entre la β -actina y TRPV6.

De hecho, en todos los tipos de cáncer a los que se hace referencia en la presente memoria, hay un mecanismo común ya que todos proceden de tejidos epiteliales. Peng et al. mostraron, en cáncer de próstata, que las cantidades normalizadas del ARNm de TRPV6 fueron aproximadamente 2 veces mayores en muestras de sujetos con puntuaciones de Gleason de 5 a 7 en comparación con muestras con hiperplasia benigna, y aproximadamente 3 veces mayores en muestras con puntuaciones de Gleason de 8 - 9.

Las figuras 10-13 muestran un aumento significativo en la expresión de TRPV6 en muestras de líneas de cáncer tales como cáncer de ovario. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria, que detectan niveles de ARNm o de proteína de TRPV6 son útiles para la estadificación de cánceres, tales como el cáncer de ovario.

EJEMPLO 5: Análisis de la proteína TRPV6 en células cancerosas

Para detectar la expresión de la proteína TRPV6 en diversas células cancerosas se utilizó transferencia de Western utilizando anticuerpos desarrollados contra TRPV6.

Como se muestra en la Figura 14, la proteína TRPV6 se sobreexpresó en extractos de líneas celulares de ovario (SKOV-3), de mama (T47D) y de cáncer de próstata (PC-3), en comparación con extractos de una línea celular de control de hepatoblastoma HEP G2 que sabía que expresaba TRPV6.

Las figuras 15A a 15D muestran que los extractos de tumores de ovario humano también sobreexpresan la proteína TRPV6 y que dicha TRPV6 está regulada positivamente en tumores de ovario.

La Figura 16 muestra que TRPV6 se sobreexpresa en extractos de células de glioblastoma humano (U87MG), colon humano (CaCo-2) y carcinoma pancreático (Panc1). Además, el grado de desglucosilación en Panc1 aumenta con el aumento del número de pases del cultivo.

En conjunto, los datos de las Figuras 14 a 16 muestran que la proteína TRPV6 está sobreexpresada en diversas muestras de células de cáncer y de tumores de ovario.

EJEMPLO 6: Uso de anticuerpos contra TRPV6 para determinar estadios del cáncer

Para determinar el estadio de un tumor (por ejemplo, tumores de ovario) se utilizan anticuerpos contra TRPV6 utilizando métodos de inmunolocalización. Micromatrices tisulares estadificadas de tumores de ovario se exploran con anticuerpos contra TRPV6 marcados con fluorescencia.

Resultados

Los experimentos muestran que, a medida que el estadio del tumor avanza desde el estadio I al IV, hay un aumento en la densidad de la señal de inmunofluorescencia, lo que indica un aumento en la población de canales de TRPV6 en los tejidos.

EJEMPLO 7: Uso de péptidos de unión a TRPV6 etiquetados con fluorescencia para determinar los estadios del cáncer

Los péptidos de unión a TRPV6 etiquetados con fluorescencia son útiles para determinar el estadio de un tumor incubando directamente micromatrices tisulares (TMA, *Tissue Micro-Arrays*) con el reactivo peptídico. El compuesto SorC27-cy5.5 se incubó con células de un sujeto y los niveles de fluorescencia se comparan con los niveles de muestras tumorales en estadios de control.

Resultados

Los experimentos muestran que, a medida que el estadio del tumor avanza desde el estadio I al IV, hay un aumento en la intensidad de la señal fluorescente debido a la unión del compuesto etiquetado que comprende SorC27 etiquetado con cy5.5 en relación con el aumento de la población de canales TRPV6.

EJEMPLO 8: Uso de anticuerpos etiquetados con fluorescencia contra compuestos que comprenden péptidos de unión a TRPV6 para determinar los estadios del cáncer

Para detectar péptidos de unión a TRPV6 unidos a canales de TRPV6 de una micromatriz tisular homologada de cáncer de ovario, se utilizan anticuerpos etiquetados con fluorescencia contra péptidos de unión a TRPV6

Resultados

Después de incubar la TMA con uno de los péptidos de unión a TRPV6, y después movilizar un anticuerpo etiquetado con fluorescencia desarrollado contra los péptidos de unión a TRPV6, hay una correlación positiva entre la intensidad de la señal fluorescente y el estadio del cáncer desde el estadio I al IV.

EJEMPLO 9: péptidos de unión a TRPV6 marcados con fluorescencia se unen a tumores ricos en TRPV6 xenoinjertados en ratones

Ratones xenoinjertados con un tumor de ovario rico en TRPV6 (células SKOV-3) reciben inyección con el péptido de unión a TRPV6 marcado con fluorescencia SorC27-cy5.5.

Resultados

Los tumores de ovario que sobreexpresan el canal TRPV6 se detectan *in vivo* mediante el compuesto SorC27-cy5.5 después de la administración a ratones en los que los tumores TRPV6 están xenoinjertados (por ejemplo, tumores de ovario). La masa tumoral xenoinjertada, rica en TRPV6, procedente de células SKOV-3, se diferencia claramente del tejido de fondo por ser muy fluorescente en el infrarrojo lejano.

EJEMPLO 10: Uso de péptidos de unión a TRPV6 marcados con óxido de hierro superparamagnético (SPIO) para detectar células productoras de TRPV6

Un compuesto que comprende el péptido de unión a TRPV6 conjugado con óxido de hierro superparamagnético, tal como SPIO-SorC27, se incubó con células SKOV-3 (positivas a TRPV6) y células HEK293 (negativas a TRPV6). Después, utilizando imágenes de Resonancia Magnética se obtienen imágenes de las células.

Resultados

Las células SKOV-3 que sobreexpresan el canal TRPV6, se detectan *in vitro* mediante agentes potenciadores de MRI, tales como SPIO-SorC27. Las células SKOV-3 ricas en TRPV6 se diferencian claramente de las células HEK293, negativas a TRPV6, por señales de resonancia magnética e imágenes muy potenciadas.

EJEMPLO 11: Los péptidos de unión a TRPV6 marcados con SPIO se unen a tumores que expresan TRPV6 pero no a tumores negativos a TRPV6.

A ratones xenoinjertados con un tumor de ovario rico en TRPV6 (células SKOV-3) se les administra SPIO-SorC27 y se obtienen imágenes utilizando imágenes de Resonancia Magnética.

Resultados

Los resultados muestran que los péptidos de unión a TRPV6 conjugados con SPIO se unen a tumores ricos en TRPV6 de la línea celular de cáncer de ovario humano SKOV-3, y se pueden formar imágenes utilizando imágenes de resonancia magnética. Los experimentos muestran que los tumores de ovario que sobreexpresan el canal TRPV6, se detectan *in vivo* mediante agentes potenciadores de MRI, tales como SPIO-SorC27, después de la administración al ratón. La masa tumoral xenoinjertada rica en TRPV6 se diferencia claramente del tejido de fondo por señales de resonancia magnética e imágenes muy potenciadas.

EJEMPLO 12: Uso de péptidos de unión a TRPV6 conjugados con radiomoléculas que contienen ¹⁸F

Los compuestos que comprenden péptidos de unión a TRPV6 marcados por enlace covalente con radiomoléculas que contienen ^{18}F , dirigen dichas moléculas a tumores, células o tejidos que expresan TRPV6 y permiten la detección utilizando exploración PET (tomografía por emisión de positrones) y la detección de estos tumores, células o tejidos (Cheng et al. J. Nucl. Med. 48: 987-994, 2007). SorC27 conjugado con una radiomolécula que contiene ^{18}F se incubaba con células SKOV-3 y células HEK293. Después, se obtienen imágenes de las células mediante exploración PET.

Resultados

El conjugado ^{18}F -SorC27 muestra claramente la identificación de las células SKOV-3 ricas en TRPV6 en comparación con células negativas a TRPV6 (HEK293).

EJEMPLO 13: Uso de péptidos de unión a TRPV6 conjugados con radiomoléculas que contienen ^{125}I

Los compuestos que comprenden péptidos de unión a TRPV6 marcados por enlace covalente con radiomoléculas que contienen ^{125}I dirigen dichas moléculas a tumores, células o tejidos que expresan TRPV6 y permiten la detección utilizando detección radiométrica de estos tumores, células o tejidos (Bolton et al. Biochem. J., 133, 529 - 539, 1973). SorC27 conjugado con una radiomolécula que contiene ^{125}I se incubaba con células SKOV-3 y células HEK293. Después, se obtienen imágenes de las células mediante exploración PET.

Resultados

El conjugado ^{125}I -C-péptido muestra claramente la identificación de las células SKOV-3 ricas en TRPV6 en comparación con células negativas a TRPV6 (HEK293).

EJEMPLO 14: Detección del ARNm de TRPV6 en microvesículas aisladas de muestras de sangre, otros líquidos corporales o excrementos

El ARNm de TRPV6 se detecta en microvesículas aisladas de muestras de sangre, otros líquidos corporales o excrementos de pacientes con cánceres ricos en TRPV6 (por ejemplo, tumores de ovario). La fracción de sangre que contiene microvesículas desprendidas de tumores mediante un proceso endocitótico se aísla de una muestra obtenida de un sujeto. A continuación, se extrae el ARN de estas microvesículas, con análisis posterior mediante técnicas basadas en PCR.

Resultados

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR) muestra la presencia en exceso de ARNm de TRPV6 en muestras de sangre de pacientes con cáncer en comparación con personas que no padecen un cáncer rico en TRPV6. Por tanto, la detección de cantidades relativas de expresión de TRPV6 es útil para diagnosticar cánceres ricos en TRPV6, tales como cáncer de ovario.

EJEMPLO 15: Detección de la proteína TRPV6 en microvesículas aisladas de líquidos corporales o excrementos

La proteína TRPV6 se detecta en microvesículas aisladas de líquidos corporales tales como muestras de sangre, linfa o excrementos de pacientes con cánceres ricos en TRPV6 (por ejemplo, tumores de ovario). La fracción de la muestra que contiene microvesículas desprendidas de tumores mediante un proceso endocitótico se aísla. Después, para detectar la proteína TRPV6, se extrae la proteína de estas microvesículas, con análisis posterior mediante transferencia de Western y técnicas basadas en anticuerpos. Como alternativa, las microvesículas aisladas pueden tratarse con anticuerpos anti-TRPV6 o péptidos de unión a TRPV6 y detectarse.

Resultados

La transferencia de Western muestra la presencia de proteína TRPV6 en exceso en muestras de sangre de pacientes con cáncer en comparación con personas que no padecen un cáncer rico en TRPV6, tal como cáncer de ovario. Las microvesículas enteras muestran TRPV6 por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra TRPV6 y péptidos de unión a TRPV6 marcados apropiadamente.

EJEMPLO 16: Uso *in vivo* de péptidos de unión a TRPV6 conjugados con taxanos

A partir de los estudios de biodistribución expuestos en el Ejemplo 1, queda claro que los compuestos que comprenden péptidos de unión a TRPV6, son útiles para administrar a los tejidos y a las células que expresan TRPV6, el fluoróforo unido de la clase de cianidina (cy5.5) (véanse las Figuras 6 a 9). Por tanto, los compuestos que comprenden los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria pueden utilizarse para administrar otras moléculas a células o tejidos que expresan TRPV6.

Los compuestos se preparan por unión covalente de fármacos oncológicos, tales como taxanos, a los péptidos de unión a TRPV6, con el fin de utilizar la función de direccionamiento a TRPV6 de los péptidos para administrar el fármaco directamente a un tumor rico en TRPV6 o a una célula cancerosa. La química para unir dichos fármacos a compuestos se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Peng Li y col., Biopolymers 87: 225-230, 2007).

El paclitaxel se une a través de una molécula espaciadora de cuatro carbonos al péptido SorC27 en una amina primaria o en un grupo tiol libre. El taxano conjugado con SorC27 se administra después a ratones xenoinjertados con un tumor rico en TRPV6. A los ratones de control se les administra solución salina.

Resultados

Los experimentos *in vivo* en ratones muestran que un compuesto que comprende un péptido de unión a TRPV6 conjugado con paclitaxel, da como resultado la administración adecuada de paclitaxel al sitio del tumor, el retroceso del tumor y la muerte de células cancerosas cuando se compara con ratones de control a los que se administra solución salina.

EJEMPLO 17: administración de fármacos antivíricos conjugados con péptidos de unión a TRPV6

Los fármacos antivíricos o antirretrovíricos se unen fácilmente por enlace covalente a péptidos de unión a TRPV6 para el tratamiento de reservorios de VIH. Un reservorio primario de VIH en seres humanos son los ganglios linfáticos mesentéricos (Cumont et al., Cell Death and Differentiation, 14, 1747-1758, 2007; Estaquier y Hurtrel. Medical Science (Paris) 24 (12): 1055-1060, 2008). Los compuestos que comprenden los péptidos de unión a TRPV6 que llevan una etiqueta fluorescente, se acumulan en los ganglios linfáticos mesentéricos como se muestra por la presencia de fluorescencia en estos ganglios después de inyección iv del péptido etiquetado (véase la Figura 1).

Los antivíricos o antirretrovíricos se unen por enlace covalente a los péptidos de unión a TRPV6 descritos en la presente memoria. A continuación, a los ratones se les administra un compuesto que comprende un conjugado SorC27-antivirico siguiendo el protocolo expuesto en el Ejemplo 1.

Resultados

Los resultados muestran que el conjugado antivirico se detecta en tejido de ganglio linfático. Se obtiene actividad antivirico, bloqueando la reproducción del VIH y, por lo tanto, tratando el VIH.

EJEMPLO 18: Péptidos de unión a TRPV6 conjugados con fármacos antimicrobianos

La unión covalente de fármacos antimicrobianos con los péptidos de unión a TRPV6 es útil para el tratamiento de reservorios de infección bacteriana. Los compuestos que comprenden el péptido de unión a TRPV6 conjugado con una etiqueta fluorescente se acumulan en los ganglios linfáticos como se indica por la presencia de fluorescencia en estos ganglios después de inyección iv del péptido etiquetado (véase la Figura 1). De manera similar, los fármacos antimicrobianos se unen opcionalmente por enlace covalente a los péptidos de unión a TRPV6 mediante métodos conocidos en la técnica, y se utilizan para dirigirse a los ganglios linfáticos.

Resultados

Los resultados muestran que los fármacos se detectan en tejidos de ganglios linfáticos aislados de ratones tratados con los conjugados de péptidos de unión a TRPV6 - fármacos antimicrobianos y destruirán microbios.

EJEMPLO 19: péptidos de unión a TRPV6 conjugados con complejos de boro

Los compuestos que comprenden un complejo de boro unido por enlace covalente a un péptido de unión a TRPV6 son útiles para la terapia del cáncer. Los péptidos de unión a TRPV6 se dirigen y se ponen en contacto con células y tumores ricos en TRPV6, haciendo que en su interior se concentren complejos de boro (cada uno con múltiples átomos de boro, por ejemplo, el complejo cloro-boro que contiene 12 átomos de boro). La irradiación con neutrones térmicos da como resultado la captura de neutrones por 10 átomos de boro y la transferencia de partículas alfa de alta energía al tejido destruyendo las células tumorales. Este aspecto de la invención proporciona grandes cantidades de grupos de boro dirigidas a tumores. Se ha establecido que el umbral es de aproximadamente 20 µg B/g de tumor (Barth et al. Clinical Cancer Research, 11 (11) 3987-4002, 2005). La química para unir compuestos de boro a complejos proteicos está bien establecida (Guan y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95 13206-13210, 1998).

El boro conjugado con péptidos de unión a TRPV6 se administra a ratones xenoinjertados con un tumor rico en TRPV6. Después, el tumor se irradia con neutrones térmicos.

Resultados

La concentración de boro aumenta mucho en tumores ricos en TRPV6 tales como tumores de ovario. La irradiación del tumor con neutrones térmicos destruye las células tumorales. Los compuestos de péptido - boro son útiles para destruir células tumorales.

EJEMPLO 20: Péptidos de unión a TRPV6 conjugados con epítomos

La unión covalente de epítomos conocidos y/o reconocidos de anticuerpos globales con los péptidos de unión a TRPV6 recluta estos anticuerpos preexistentes en tumores y en células cancerosas que expresan TRPV6. Este complejo (anticuerpo-epítomo-péptido de unión a TRPV6) da como resultado la detección y destrucción de células que expresan TRPV6 por las células inmunitarias, como se muestra en experimentos de xenoinjerto donde los tumores (por ejemplo, de ovario) tenían tasas de crecimiento más bajas.

EJEMPLO 21: Péptidos de unión a TRPV6 conjugados con antígenos o epítomos

La unión covalente de un nuevo antígeno o epítomo con los péptidos de unión a TRPV6 y la administración del compuesto a ratones, dirige el complejo epítomo / péptido de unión a TRPV6 a los tumores portadores de TRPV6. La administración posterior de un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra el epítomo específico da como resultado cualquier tipo de anticuerpo que se une a la célula, tejido o tumor rico en TRPV6. El reclutamiento posterior de células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T citolíticos) da como resultado la muerte de estas células dirigidas por péptidos y la reducción de los tumores.

EJEMPLO 22: péptidos de unión a TRPV6 conjugados con inmunoactivadores

La unión covalente de péptidos de unión a TRPV6 y una molécula que es reconocida y unida por receptores en células del sistema inmunitario, particularmente linfocitos T citolíticos, dirige dichas células a tumores o a células cancerosas ricos en TRPV6. El reclutamiento de dichas células, tales como linfocitos T citolíticos, destruye la célula cancerosa o el tumor. Los experimentos indican que el péptido de unión a TRPV6 se dirige al canal TRPV6 mientras que la 'molécula bate' unida al otro extremo de los péptidos de unión a TRPV6, recluta la célula inmunitaria; la administración de este producto causa la reducción de tumores (p. ej., tumores de ovario xenoinjertados).

EJEMPLO 23: péptidos de unión a TRPV6 conjugados con nanoestructuras metálicas

La unión covalente de nanoestructuras metálicas (por ejemplo, nanopartículas de oro) con los péptidos de unión a TRPV6 dirige a las nanopartículas metálicas u otras construcciones (esferas, varillas, etc.) a través de la función de unión de los péptidos a TRPV6, a células cancerosas y tumores. Debido a las propiedades únicas, por ejemplo, de las nanopartículas de oro, la irradiación con radiofrecuencias o radiación infrarroja hace que las partículas se calienten. El calentamiento posterior de la célula cancerosa o tumoral causa la muerte de las células o tumor. La química para unir nanopartículas metálicas con moléculas tales como péptidos está bien establecida. Los experimentos indican que el direccionamiento del conjugado nanopartícula de oro a tumores xenoinjertados ricos en TRPV6 (por ejemplo, tumores de ovario), con irradiación posterior provoca la reducción de la masa tumoral.

EJEMPLO 24: Uso de anticuerpos contra TRPV6 para detectar y clasificar el cáncer

Se analizaron muestras que comprendían secciones tisulares de 146 biopsias independientes sobre 4 micromatrices tisulares (TMA) (OV483, OV802, T112, BCN721 obtenidas en US Biomax, Inc. Rockville, MD 20850, EE. UU.) para la tinción inmunohistoquímica de TRPV6 utilizando un anticuerpo contra TRPV6, un anticuerpo secundario y detección colorimétrica con peroxidasa de rábano picante (HRP). Las muestras incluyeron 18 tipos diferentes de cáncer de ovario que representaban todos los tipos de cáncer de ovario principales, así como 21 muestras de tejidos de ovario normales. Muchas de las muestras representaban cánceres que fueron calificados previamente. La Figura 17 muestra la calibración y clasificación representativa de muestras de TMA en una escala de seis puntos de (-) a (++++), utilizada para evaluar la intensidad de la tinción de TRPV6. Como se muestra en la Tabla 3, cada una de las 146 muestras se ordenó de acuerdo con esta escala de seis puntos.

La Figura 18 muestra que un porcentaje mucho menor de muestras de tejido de ovario normal tenía una puntuación de intensidad de tinción de TRPV6 $\geq 1+$ en comparación con muestras de tejido de adenocarcinoma papilar seroso con cáncer de estadio I, II o III. Por ejemplo, el 100 % de las muestras de tejido de adenocarcinoma papilar seroso tenía una puntuación de intensidad de tinción ≥ 1 , en comparación con solo aproximadamente el 24 % de los tejidos de ovario normales. Por consiguiente, la detección de TRPV6, tal como mediante tinción con anticuerpos, es útil para predecir o diagnosticar la probabilidad de cáncer en una muestra. Además, la detección de TRPV6 es útil para identificar muestras con cáncer de grado I (estadio temprano) en comparación con muestras de tejido de ovario normal.

La Figura 19 muestra ejemplos de la detección inmunohistoquímica de TRPV6 utilizando anticuerpos contra TRPV6 en muestras de micromatrices de tejidos de ovario normales, así como muestras de carcinoma papilar seroso de

Grado I, II y III. La Figura 19 muestra una tendencia observada de aumento de tinción de TRPV6 en muestras con grados más altos de cáncer.

- 5 También se disponía de datos de estadificación del cáncer para diversas muestras de matriz tisular. Los cánceres se clasificaron de acuerdo con el sistema de Tumor, Ganglio, Metástasis (TNM) como se conoce en la técnica. En la Tabla 4 se ofrece la intensidad de tinción inmunohistoquímica de TRPV6 para cada muestra evaluada en una escala de cinco puntos de (-) a (++++), utilizando un anticuerpo contra TRPV6, un anticuerpo secundario y detección colorimétrica con peroxidasa de rábano picante (HRP).
- 10 Como se muestra en la Tabla 4, solo el 23,8 % (5/21) de las muestras de tejido de ovario normal tenía una puntuación de intensidad de tinción de TRPV6 mayor que o igual a +1. Por el contrario, el 95,7 % (44/46) de las muestras con cáncer en estadio I-IV tenían una puntuación de intensidad de TRPV6 mayor que o igual a +1. Los cánceres en estadio temprano (estadio I y II) se detectaron fácilmente, teniendo un 92,9 % (26/28) de cánceres en estadio temprano una puntuación de intensidad de tinción de TRPV6 mayor que o igual a +1. Por tanto, la detección de TRPV6, tal como, por ejemplo, mediante métodos inmunohistoquímicos, puede utilizarse para detectar cáncer y, en particular, cánceres en estadio temprano.
- 15

Diagnóstico de Patología	Número total de casos	Resultados IHQ de TRPV6 (intensidad de tinción)					
		-	-/+	+	++	+++	++++
Tejido de ovario normal	21	8	8	3	2	0	0
Adenocarcinoma papilar mucinoso							
Total	12	1	0	3	0	4	4
Grado I	2	0	0	0	0	1	1
Grado II	7	1	0	1	0	2	3
Grado III	3	0	0	2	0	1	0
Cistoadenocarcinoma papilar mucinoso							
Total	14	2	0	2	4	4	2
Grado I	11	2	0	2	3	4	0
Grado II	3	0	0	0	1	0	2
Adenocarcinoma papilar seroso							
Total	58	0	0	7	13	18	20
Grado I	8	0	0	2	2	0	4
Grado II	22	0	0	1	6	8	7
Grado III	28	0	0	4	5	10	9
Cistoadenocarcinoma papilar seroso							
Total (Grado III)	3	0	0	0	1	2	0
Carcinoma de células claras	9	0	0	1	6	2	0
Adenocarcinoma endometrioide	4	0	0	0	0	3	1
Carcinoma de células transicionales	1	0	0	0	0	1	0
Tumor de células granulares	3	0	1	2	0	0	0
Carcinoma sinusal endodérmico	2	0	0	0	0	0	2
Carcinoma epidermoide	1	0	0	0	0	1	0
Carcinoma metastásico de células en anillo de sello	3	0	0	1	1	1	0
Adenocarcinoma metastásico	6	0	0	0	0	2	4
Tumor mixto de células germinales	1	0	0	0	0	1	0
Tecacitoma folicular maligno	1	0	0	0	1	0	0
Tumor maligno (disperso)	2	0	0	0	2	0	0
Disgerminoma	3	0	0	0	2	1	0
Teratoma inmaduro	1	0	0	1	0	0	0
Tejido fibroso hiperplásico	1	0	0	1	0	0	0

Tabla 3: carcinoma de ovario y tinción de TRPV6 de matriz tisular normal en 146 muestras.

Diagnóstico de Patología	Número total de casos	Resultados IHQ de TRPV6 (intensidad de tinción)				
		-	+	++	+++	++++
Tejido de ovario normal	21	16	3	2	0	0
Adenocarcinoma papilar mucinoso						
Total	11	1	3	0	3	4
Estadio I	5	0	0	0	2	3
Estadio II	1	1	0	0	0	0
Estadio III	3	0	1	0	1	1
Estadio IV	2	0	2	0	0	0
Cistoadenocarcinoma papilar mucinoso						
Total	12	1	2	4	4	1
Estadio I	9	1	1	3	3	1
Estadio II	1	0	0	0	1	0
Estadio III	1	0	1	0	0	0
Estadio IV	1	0	0	1	0	0
Adenocarcinoma papilar seroso						
Total	15	0	2	5	3	5
Estadio I	7	0	1	3	0	3
Estadio II	2	0	0	0	1	1
Estadio III	6	0	1	2	2	1
Estadio IV	0	0	0	0	0	0
Carcinoma de células claras (Estadio I)	3	0	2	1	0	0
Adenocarcinoma endometrioide	4	0	0	0	3	1
Carcinoma de células transicionales	1	0	0	0	1	0

Tabla 4: Matrices tisulares de carcinoma de ovario y normal agrupadas por estadio de cáncer. Número total de casos = 67; número total de muestras tumorales = 46.

5 EJEMPLO 25: Colocalización de TRPV6 y SorC27 marcado con fluorescencia en adenocarcinoma papilar seroso de Grado II

Para analizar la eficacia del péptido SorC27 etiquetado para detectar su diana de unión a TRPV6, se aplicaron protocolos convencionales de unión inmunohistoquímica y SorC27-cy5.5 a micromatrices tisulares de diversas secciones de tumores de cáncer de ovario. La detección de canal TRPV6 por ambos métodos se observó a través de diferentes muestras de micromatrices de cáncer de ovario.

Resultados

La Figura 20 muestra la detección del anticuerpo contra TRPV6 y la detección fluorescente de una muestra de micromatriz tisular de adenocarcinoma papilar seroso de Grado II teñida con anticuerpos contra TRPV6 así como con SorC27 marcado con fluorescencia con cy5.5 (SorC27-cy5.5). Por tanto, el uso de péptidos de unión a TRPV6 marcados con fluorescencia corresponde a la detección convencional inmunohistoquímica de los canales iónicos TRPV6 y los péptidos de unión a TRPV6 son útiles para detectar con seguridad TRPV6 o células o tejidos que expresan TRPV6.

EJEMPLO 26: Localización de SorC27 en tumores de cáncer xenoinjertados *in vivo*

Ratones xenoinjertados con tumores de ovario (células SKOV-3) y próstata (células DU 145), ricos en TRPV6, recibieron inyección (por vía intraperitoneal) con el péptido de unión a TRPV6 marcado con fluorescencia, SorC27-cy5.5. SorC27 se marcó con la sonda infrarroja cercana Cy5.5 en el único tiol de cisteína utilizando una reacción activada por maleimida de Cy5.5. Los péptidos marcados se purificaron con una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño y HPLC. Cy5.5, emite fluorescencia en la región infrarroja después de su excitación con un láser de barrido. El láser de baja energía es capaz de penetrar en el animal a aproximadamente 1 cm y, por lo tanto, mediante exploración, la presencia de los péptidos etiquetados se puede cuantificar en tres dimensiones. Los péptidos marcados con Cy5.5 se inyectaron por vía intravenosa en ratones CD1 lampiños a 100 ug por animal y

utilizando un sistema de imagen óptica, Optix eXplorer (GE Healthcare Systems) a diferentes momentos (30 min, 90 min, 4 h), se obtuvieron imágenes de los animales vivos.

Resultados

Los tumores de ovario y próstata que sobreexpresan el canal TRPV6 se detectan claramente *in vivo* durante al menos 24 horas después de la inyección. Las masas tumorales xenoinjertadas ricas en TRPV6 se diferencian claramente del tejido de fondo por ser muy fluorescentes en el infrarrojo lejano. La Figura 21A muestra la localización dependiente del tiempo de SorC27-cy5.5 en tumor de ovario, mientras que la Figura 21 B muestra la localización dependiente del tiempo de SorC27-cy5.5 en tumor de próstata. Los riñones también se destacan en estas dos imágenes. La naturaleza 3-D del dispositivo escáner permite diferenciar claramente entre los tumores y los tejidos renales visibles, aislando un corte de 2 mm del animal. Además, un 'corte' perpendicular a través del tumor (corte perpendicular) permite observar con claridad la región central fluorescente de los tumores.

EJEMPLO 27: RT-PCR cuantitativa del ARNm de TRPV6 en tejidos de cáncer

Se realizó una RT-PCR cuantitativa del ARNm de TRPV6 en muestras de biopsias de cáncer de ovario, próstata y mama, así como muestras de control combinadas correspondientes de 15 individuos sanos. Se analizaron 18 biopsias de tumores de ovario, 4 biopsias de tumores de próstata y 3 biopsias de tumores de mama. Para analizar las muestras de próstata se utilizaron 3 conjuntos diferentes de cebadores de RT-PCR (A, B y C). Los resultados se estandarizaron frente a los niveles de expresión del gen constitutivo de hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) y se expresaron como una relación de la señal estandarizada de las muestras tumorales con respecto a las señales estandarizadas de una muestra combinada de 15 tejidos sanos.

Resultados

La Figura 22 muestra los resultados de la cuantificación de Q-RT-PCR del ARNm de TRPV6 extraído de biopsias de cáncer de ovario (A), próstata (B) y cáncer de mama (C) humano, en comparación con tejidos sanos. Las tablas 5 a 7 también proporcionan los resultados cuantitativos de Q-RT-PCR de cada una de las biopsias de muestra en relación con los controles normales. Las biopsias tumorales mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm de TRPV6. Se observaron aumentos en la expresión de ARNm de TRPV6 en relación con los tejidos de control en cada muestra de cáncer analizada, excepto en una muestra de cáncer de ovario (LTL290). Las muestras de cáncer de ovario mostraron un aumento promedio de 39 veces en la expresión del ARNm de TRPV6 en comparación con controles sanos, mientras que las muestras de cáncer de próstata y de cáncer de mama presentaron aumentos de 8,7 y 13 veces respectivamente. Los aumentos significativos observados en la transcripción del ARNm de TRPV6 en tejidos de cáncer proporcionan una herramienta de diagnóstico o pronóstico útil para identificar cáncer, incluidos los cánceres de ovario, mama y/o próstata.

ID de muestra	Aumento promedio relativo en la expresión de ARNm de TRPV6	D.T.	n
LTL175	2,93	0,6	3
LTL205	10,08	1,7	3
LTL234	12,04	1,0	3
LTL237	17,62	3,3	3
LTL246	5,94	0,0	3
LTL247	41,52	3,0	3
LTL258	4,54	0,1	3
LTL259	4,55	1,4	3
LTL260	4,87	0,4	3
LTL269	14,56	0,6	3
LTL273	12,44	0,3	3
LTL284	13,49	1,6	3
LTL290	0,44	0,0	3
LTL300	101,15	9,1	3
LTL305	13,42	3,0	3
LTL315	72,90	7,0	3
LTL317	20,23	1,2	3
LTL320	354,02	33,8	3

ID de muestra	Aumento promedio relativo en la expresión de ARNm de TRPV6	D.T.	n
Promedio	39,3		
Mediana	12,9		

Tabla 5: resultados de RT-PCR cuantitativa del ARNm de TRPV6 de biopsias de cáncer de ovario, DT = desviación típica; n = número de muestras,

ID de muestra	Aumento relativo en la expresión de ARNm de TRPV6		
	Conjunto de cebadores A	Conjunto de cebadores B	Conjunto de cebadores C
A5	12,3	4,9	5,4
A11	20,8	5,9	9,6
A12	9,1	2,4	5,6
PA-T		16,3	3,1
Promedio	8,7		
Mediana	5,9		

Tabla 6: resultados de RT-PCR cuantitativa del ARNm de TRPV6 de biopsias de cáncer de próstata. Promedio y mediana de todos los conjuntos de cebadores de cada muestra.

ID de muestra	Aumento relativo en la expresión de ARNm de TRPV6
FBT-1	22,5
FBT-2	3,6
FBT-3	12,9
Promedio	13

Tabla 7: resultados de RT-PCR cuantitativa del ARNm de TRPV6 de biopsias de cáncer de mama.

10 EJEMPLO 28: Inyección e imágenes de MRI *in vivo* de conjugados de péptidos de unión a TRPV6 (SPIO-SorC27)

Conjugación de SorC27 con nanopérlas SPIO

Se hicieron reaccionar perlas de SPIO (óxido de hierro superparamagnético) funcionalizadas con aproximadamente 120 grupos maleimida por perla (Producto N° 77-96-20 de Micromod Partikeltechnologie GmbH, Alemania) con un exceso molar de 5 veces de Sor-C27 tamponado (1 mM, 10x PBS, pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas se separaron de la mezcla de reacción por centrifugación y se suspendieron en un volumen de PBS de Dulbecco estéril para inyección en los ratones CD-1 lampiños portadores de tumores. El número de péptidos SOR-C27 por perla se determinó por análisis cuantitativo ^1H NMR del sobrenadante para determinar el número de moléculas peptídicas que reaccionaban. En promedio, se conjugaron 75 moléculas de SOR-C27 con cada partícula SPIO. La conjugación del péptido con el SPIO se confirmó mediante LC-MS después de digestión con tripsina del conjugado SPIO-péptido. El conjugado SPIO-SorC27 se inyectó después por vía intraperitoneal (ip) en tumores de ovario derivados de SKOV-3 xenoinjertados en ratones CD-1 lampiños antes de la formación de imágenes.

25 Captura de imágenes MRI

Las imágenes MRI se adquirieron en una consola 3T Varian Direct Drive utilizando una bobina de gradiente Magnex de 305/210 mm OD/ID y una bobina RF de ratón en cuadratura de 25 mm de diámetro de Doty Inc. Las imágenes se adquirieron utilizando una secuencia de pulso específicamente seleccionada para optimizar la sensibilidad de contraste a las nanopartículas de óxido de hierro. El óxido de hierro aparece oscuro (contraste negativo) para este tipo de adquisiciones. Las adquisiciones utilizaron una secuencia de pulsos de precesión libre estacionaria equilibrada (b-SSFP) en 3-D con un TR/TE de 8/4 ms y una resolución de imagen de 150 micras (dimensión píxel de 150 micras en las 3 direcciones).

35 Resultados

La Figura 23 muestra imágenes MRI y la localización del agente potenciador de MRI (SPIO-SorC27) en tumores de ovario derivados de SKOV-3 xenoinjertados en ratones CD-1 lampiños. Los paneles de control superiores (A) muestran la administración de las perlas de control SPIO, sin SorC27 conjugado. Las perlas de control SPIO se eliminaron del tumor 24 horas después de la inyección. El panel de nivel inferior (B) muestra que el compuesto SPIO-SorC27 marca la corteza del tumor 24 horas después de la inyección. La flecha blanca continua que se

muestra en las imágenes de la izquierda indica la posición del tumor en el xenoinjerto, La flecha discontinua en el panel inferior derecho indica la señal de MRI potenciada oscurecida de la construcción SPIO-SorC27 unida a la corteza del tumor, No se observa la acumulación correspondiente de las nanopartículas de hierro en el panel de control superior de la derecha. Los paneles de la izquierda muestran imágenes MRI antes de la inyección ip. mientras que los de la derecha muestran imágenes MRI 24 horas después de la administración del control o reactivo de diagnóstico, Los péptidos de unión a TRPV6 conjugados, tales como los conjugados con SorC27, son por tanto capaces de dirigirse eficazmente a sitios tumorales *in vivo*.

EJEMPLO 29: RT-PCR de sangre de sujetos con cáncer estadificado

Se analizaron muestras de sangre extraídas de sujetos con cáncer de próstata, mama u ovario (estadios I a IV) para determinar la expresión del ARNm de TRPV6 utilizando RT-PCR, También se analizaron muestras de control de sangre extraída de un hombre (próstata) sano o de una mujer (mama y ovario) sana. Los productos resultantes de la RT-PCR se cargaron en geles de agarosa y se separaron utilizando electroforesis. Después, se midió la densidad de banda integrada en los geles de agarosa para los amplicones del ARNm de TRPV6 (~ 320 pb) para cada muestra y control.

Resultados

La Figura 24 muestra que la expresión del ARNm de TRPV6 en muestras de sangre extraídas de pacientes con cáncer fue significativamente mayor en comparación con muestras extraídas de controles sanos normales. La figura 24A muestra que los sujetos con cáncer de próstata en estadios I, II, III o IV tenían hasta 6 veces más expresión de TRPV6 en sangre. También se observa un aumento significativo en la expresión de TRPV6 en muestras que representan diferentes estadios de cáncer en comparación con muestras normales. La figura 24B muestra que los sujetos con cáncer de mama presentan un aumento significativo en la expresión de TRPV6 en sangre. La Figura 24C muestra que los sujetos con cáncer de ovario también presentan un aumento en la expresión de TRPV6 en comparación con las muestras de control de mujeres sanas. Las señales integradas representadas en la Figura 24 se dividieron entre un factor de 100.000 (24 A y 24 B) o 10.000 (24 C). El análisis de los niveles de expresión del ARNm de TRPV6 en sangre es, por lo tanto, útil para identificar sujetos con cáncer, incluida la detección temprana de cáncer de próstata, mama u ovario en estadio I.

EJEMPLO 30: ARNm de TRPV6 en muestras de plasma de sujetos con cáncer de ovario en estadio I o estadio II

Se extrajo ARN total de muestras de plasma de mujeres sanas (10) y de mujeres con cáncer de ovario en Estadio I (3) o II (3) utilizando el método TRI Reagent® LS (Sigma Aldrich). Después de la preparación de bibliotecas de ADNc (iScript, BioRad) a partir de una cantidad equivalente de ARN extraído de cada muestra, las muestras se sometieron a PCR convencional. Las reacciones de PCR se analizaron utilizando geles de agarosa E-Gel® EX 1 % y se procesaron en la unidad de electroforesis en gel de E-Gel® iBase, utilizando el Programa 7, para geles E-Gel® EX 1-2 %, durante 10 minutos. Se obtuvieron imágenes de los amplicones de ARNm de TRPV6 (ADNc) y se cuantificaron con el tomógrafo FluorChem® FC2 de Alpha Innotech, utilizando la posición de filtro n.º 1 (filtro verde) y luz ultravioleta (302 nm) con exposición automática. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los datos se compararon mediante la prueba de la t de Student y el límite de confianza del 95 %.

Resultados

Como se muestra en la Figura 25, el plasma extraído de mujeres con cáncer de ovario en estadio I o II tenía significativamente más expresión de ARNm de TRPV6 ($p < 0,0001$ OVI, $p = 0,0475$ OVII) en comparación con muestras de controles de mujeres sanas.

EJEMPLO 31: Análisis de los niveles de proteína TRPV6 en mujeres con cáncer de ovario en estadio I y II

Se obtuvieron muestras de plasma de mujeres sanas y de mujeres diagnosticadas con cáncer de ovario en estadio I o II, La proteína se aisló de las muestras de plasma siguiendo el método TRI Reagent® LS (Sigma Aldrich), Los lisados se prepararon a partir de los sedimentos de proteína plasmática obtenidos aplicando el procedimiento TRI Reagent® LS calentando en una solución de SDS al 1 % en PBS y ditiotritol (DTT) 15 mM en un baño de agua hirviendo. Los extractos de proteína se cuantificaron midiendo la absorbancia a 280 nm de cada lisado en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV. La cantidad de proteína en ug/ul se extrapoló a partir de una curva patrón de proteína de albúmina sérica bovina. Los extractos de proteína se sometieron a electroforesis en pocillos NuPage® Novex de gel Bis-Tris 4-12 % 1,5 mm (Invitrogen) a 145 V durante 55 minutos. Los geles se transfirieron durante 10 minutos a una Pila de transferencia iBlot®, PVDF regular (Invitrogen) utilizando el sistema de transferencia Invitrogen iBlot, El bloqueo de PVDF, la incubación de anticuerpos y el lavado se realizaron utilizando un sistema de detección de proteína SNAP i.d. (Millipore). Las membranas de PVDF se bloquearon después durante 30 segundos con tampón de bloqueo avanzado ECL al 0,5 % (Fisher). Los PVDF se incubaron en una dilución 1/30 de anticuerpo primario contra TRPV6 (H-90) (Santa Cruz) durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con 30 ml de TBS-T. Los PVDF se incubaron a continuación en una dilución 1/1500 de anticuerpo secundario de cabra contra IgG de conejo conjugado con HRP (Santa Cruz) durante 10 minutos y se lavó 3 veces con 30 ml de TBS-T. Las bandas de TRPV6

se detectaron con 15 ml de Luminol durante 3 minutos. Se tomaron imágenes de los geles y la densidad de banda se cuantificó con un tomógrafo Alpha Innotech FluroChem durante 10 minutos. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los datos se compararon utilizando la prueba de la t de Student y el límite de confianza del 95 %.

5 Resultados

Como se muestra en la Figura 26A, los niveles de proteína TRPV6 fueron significativamente mayores en muestras de sangre extraídas de mujeres con cáncer de ovario en estadio I ($p = 0,0001$) o en estadio II ($p = 0,0270$) en comparación con muestras extraídas de controles sanos. La Figura 26B muestra que el cáncer de ovario en estadio I y estadio II, considerado en conjunto (cánceres en estadio temprano), también presenta niveles aumentados de proteína TRPV6 ($p = 0,0006$) en comparación con los controles sanos.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la invención no está limitada a los ejemplos divulgados. Por el contrario, la invención pretende incluir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se incorporan aquí como referencia en su totalidad en la misma extensión que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente se indicara específica e individualmente para ser incorporada por referencia en su totalidad,

REFERENCIAS:

- Aalders J.G., Thomas G. 2007. Endometrial cancer-revisiting the importance of pelvic and para aortic lymph nodes. *Gynecol. Oncol.* 104(1): 222-231. Review
- Agnes, R.S., Lee, Y.S., Davis, P., Ma, S.W., Badghisi, H., Porreca, F., Lai, J., Hruby, V.J. 2006. Structure-activity relationships of bifunctional peptides based on overlapping pharmacophores and opioid and cholecystokinin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 2868-2875.
- Barth, R.F., Coderre, J.A., Graca, M., Vicente, H., Blue, T.E. 2005. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clinical Cancer Research*, 11: 3987-4002.
- Bolton, A. E. and Hunter, W. M. 1973. The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.*, 133: 529-539.
- Bolanz et al. 2008. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics* 7(2), 271-279.
- Cheng, Z., Zhang, L., Graves, E., Xiong, Z., Dandekar, M., Chen, X. Gambhir S.S. 2007. Small-animal PET of melanocortin 1 receptor expression using a ^{18}F -labeled α -melanocyte stimulating hormone analog. *J. Nucl. Med.* 48: 987-994.
- Cumont, M.C., Monceaux, V., Viollet, L., Lay, S., Parker, R., Hurtrel, B. Estaquier, J. 2007. TFG-b in intestinal lymphoid organs contributes to the death of armed effector CD8 T cells and is associated with the absence of virus containment in rhesus macaques infected with the simian immunodeficiency virus. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1747-1758.
- den Dekker, E., Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., Bindels, R.J.M. 2003. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, 33: 497-507.
- Estaquier, J. Hurtrel, B. 2008. Mesenteric lymph nodes, a sanctuary for the persistence of HIV. *Medical Science (Paris)* 24(12): 1055-1060.
- Guan, L., Wims, L.A., Kane, R.R., Smuckler, M.B., Morrison, S.L. Hawthorne, M.F. 1998. Homogeneous immunoconjugates for boron neutron-capture therapy: Design, synthesis, and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 13206-13210.
- Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R.J., Hoenderop, J.G. 2008. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol. Dial. Transplant*, 23: 3397-3402.
- Lyshchik, A., Higashi, T., Asato, R., Tanaka, S., Ito, J., Hiraoka, M., Insana, M.F., Brill, A.B., Saga, T., Togashi, K. 2007. Cervical lymph node metastases: diagnosis at sonoelastography-initial experience. *Radiology*. 243(1): 258-267.

Ma, J., Liu, L., Tang, L., Zong, J., Lin, A., Lu, T., Cui, N., Cui, C., Li, L. 2007. Retropharyngeal lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma: prognostic value and staging categories. Clin. Cancer Res. 13(5): 1445-1452.

5 Mujoondar, A., Austin, J.H., Malhotra, R., Powell, C.A., Pearson, G.D., Shiau, M.C., Raftopoulos, H. 2007. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. Radiology. 242(3): 882-888.

10 Peng, J., Chen, X., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A. 2000. Human Calcium Transport Protein CaT1. Biochim. Biophys. Res. Comm. 278: 326-332. [Note: CaT1 = TRPV6]

Peng, L., Jiang, S., Pero, S.C., Olingino, L., Krag, D.N., Michejda, C.J., Roller, P.P. 2007. Design and synthesis of paclitaxel conjugated with an ErbB2-Recognizing peptide, EC-1. Biopolymers, 87: 225-230.

15 Veness, M.J., Porceddu, S., Palme, C.E., Morgan, G.J. 2007. Cutaneous head and neck squamous cell carcinoma metastatic to parotid and cervical lymph nodes. Head Neck. 29(7): 621-631. Review.

Vernooij, F., Sie-Go, D.M., Heintz, A.P. 2007. Lymph node recurrence following stage IA vulvar carcinoma: two cases and a short overview of literature. Int. J. Gynecol. Cancer. 17(2): 517-520. Review.

20 Wind, J., Lagarde, S.M., Ten Kate, F.J., Ubbink, D.T., Bemelman, W.A., van Lanschot, J.J. 2007. A systematic review on the significance of extracapsular lymph node involvement in gastrointestinal malignancies. Eur. J. Surg. Oncol. 33(4): 401-408. Review.

25 Yamamoto, T., Nair, P., Vagner, J., Largent-Milnes₁ T., Davis, P., Ma, S.W., Navratilova, E., Moye, S., Tumati, S., Lai, J., Yamamura, H.I., Vanderah, T.W., Porreca, F., Hruby, V.J. 2008. A structure-activity relationship study of combinatorial synthetic approach of C-terminal modified bifunctional peptides that are deltamorphin opioid receptor agonists and neurokinin 1 receptor antagonists. J. of Med. Chem. 51(5): 1369- 1376.

30 Zhuang, L., Peng, J-B., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R.M., Hediger, M.A., Freeman, M.R. 2002. Calcium-Selective Ion Channel, CaT1, Is Apically Localized in Gastrointestinal Tract Epithelia and Is Aberrantly Expressed in Human Malignancies. Laboratory Investigation. 82(12): 1755-1764.

35 WO 2004/046178

US 7273850

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Soricimed Biopharma Inc.
Stewart, John M.

45 <120> COMPUESTOS Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCERES TRPV-6 Y ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

<130> 15309-28

50 <150> US 61/220.833

<151> 26-06-2009

<150> US 61/244.634

<151> 22-09-2009

55 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

60 <210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Péptido

ES 2 670 588 T3

<400> 1

Glu Gly Lys Leu Ser Ser Asn Asp Thr Glu Gly Gly Leu Cys Lys Glu
1 5 10 15

Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg
20 25

5 <210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido

<400> 2

Ser Ile Leu Ala Arg Pro Ala Glu Leu Asn Thr Glu Thr Cys Ile Leu
1 5 10 15

15 Glu Cys

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende un péptido de unión al vainilloide 6 de potencial receptor transitorio (TRPV6) conjugado con una biomolécula, en el que el péptido de unión a TRPV6 no presenta actividad paralizante y:
 - a) comprende de 9 a 27 aminoácidos contiguos de la secuencia C-terminal de SEQ ID NO: 1;
 - b) tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR;
 - c) tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos KEFLHPSKVDLPR; o
 - d) tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de aminoácidos EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el péptido de unión a TRPV6 comprende la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR, KEFLHPSKVDLPR o EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el péptido de unión a TRPV6 consiste en de 9 a 27 aminoácidos contiguos de la secuencia C-terminal de SEQ ID NO: 1.
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido de unión a TRPV6:
 - i) consiste en 9 a menos de 27 aminoácidos; o
 - ii) consiste en la secuencia de aminoácidos HPSKVDLPR, KEFLHPSKVDLPR, o EGKLSSNDTEGGLCKEFLHPSKVDLPR.
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el péptido de unión a TRPV6 tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos KEFLHPSKVDLPR.
6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la biomolécula comprende un marcador detectable tal como un marcador radioactivo, un fluoróforo o un agente de contraste para formación de imágenes por resonancia magnética.
7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la biomolécula comprende un agente terapéutico tal como un agente contra el cancer.
8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un método para detectar la proteína TRPV6 en una muestra que comprende:
 - a) poner en contacto la muestra con el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 - b) detectar la biomolécula conjugada con el péptido de unión a TRPV6, detectando de este modo la proteína TRPV6.
10. El método de la reivindicación 9, en el que la biomolécula se detecta *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.
11. Un método para identificar cáncer en una muestra de un sujeto que comprende:
 - a) detectar la proteína TRPV6 en la muestra, comprendiendo la detección de la proteína TRPV6 en la muestra poner en contacto la muestra con el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 - b) comparar la cantidad de proteína TRPV6 en la muestra con una cantidad de proteína TRPV6 en una muestra de control, en la que una cantidad aumentada de proteína TRPV6 en la muestra en comparación con el control es indicativa de cáncer.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la muestra es un líquido corporal, tal como sangre, orina o saliva.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en el que el cáncer es cáncer en estadio I o cáncer en estadio II, opcionalmente cáncer de ovario o cáncer de mama.
14. Un compuesto que comprende un péptido de unión al vainilloide 6 con potencial receptor transitorio (TRPV6) conjugado con una biomolécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso en un método para identificar un tumor canceroso en un sujeto, comprendiendo dicho método:
 - a) administrar al sujeto un compuesto que comprende dicho péptido de unión a TRPV6, en el que el compuesto que comprende un péptido de unión a TRPV6 comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
 - b) detectar el péptido de unión a TRPV6 en el sujeto, detectando así el TRPV6;
 - c) identificar regiones del sujeto con niveles aumentados de TRPV6 con respecto a un nivel de control, en el que los niveles aumentados de TRPV6 son indicativos de un tumor canceroso.

5 15. El compuesto para el uso de la reivindicación 14, en el que el compuesto que comprende el péptido de unión a TRPV6 comprende i) un agente de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética y el péptido de unión a TRPV6 se detectará por obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI), ii) un fluoróforo y el péptido de unión a TRPV6 se detectará detectando el fluoróforo, o iii) un marcador radiactivo y el péptido de unión a TRPV6 se detectará detectando el marcador radiactivo.

16. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento o detección de cáncer en un paciente, en el que dicha biomolécula se administra a una célula que expresa TRPV6.

FIG. 1

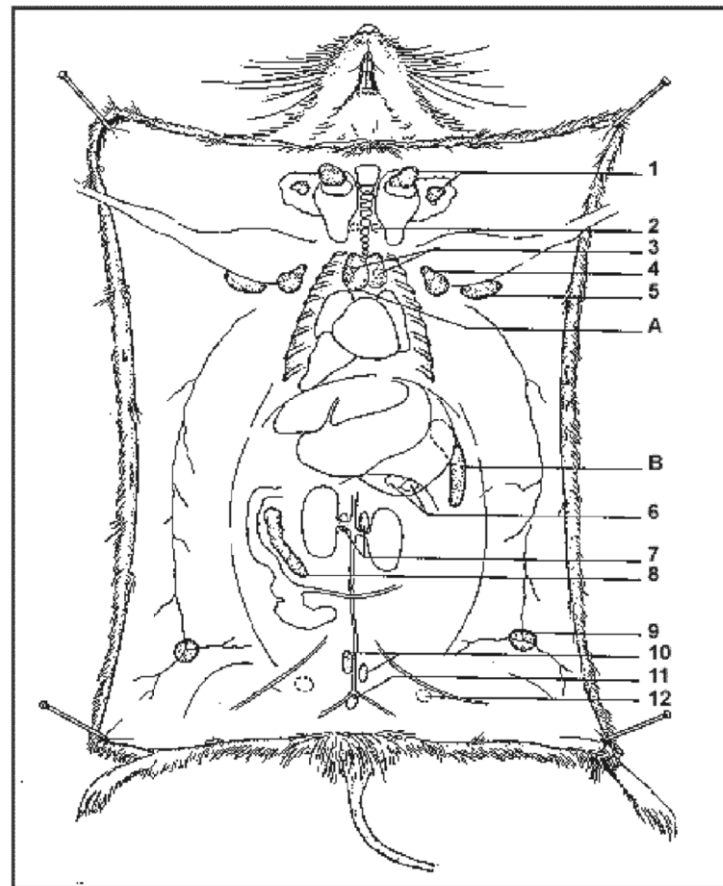


FIG. 2

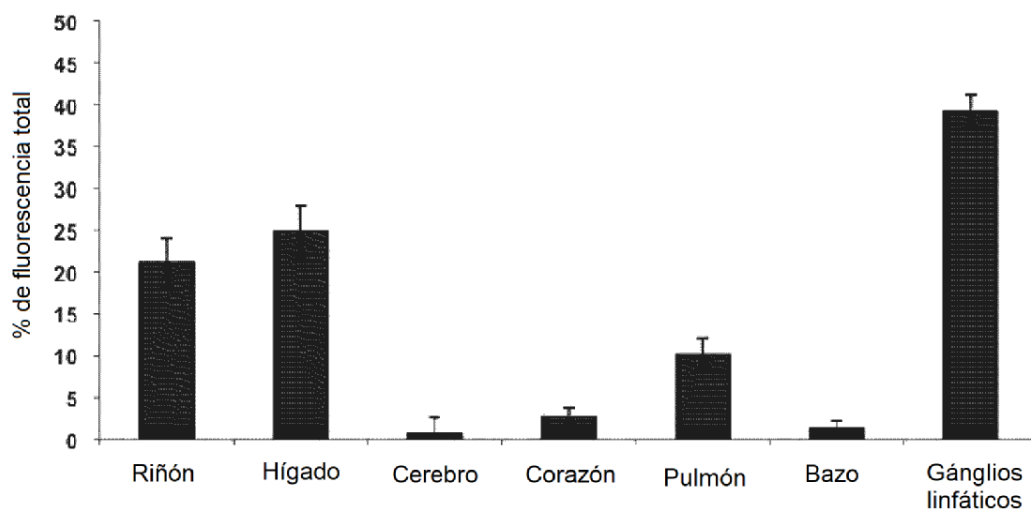


FIG. 3

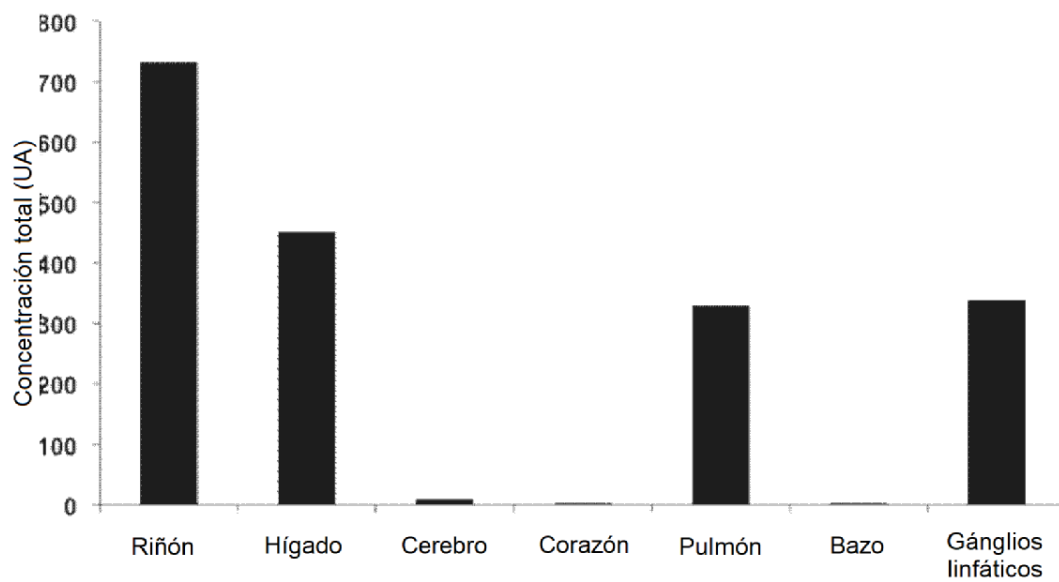
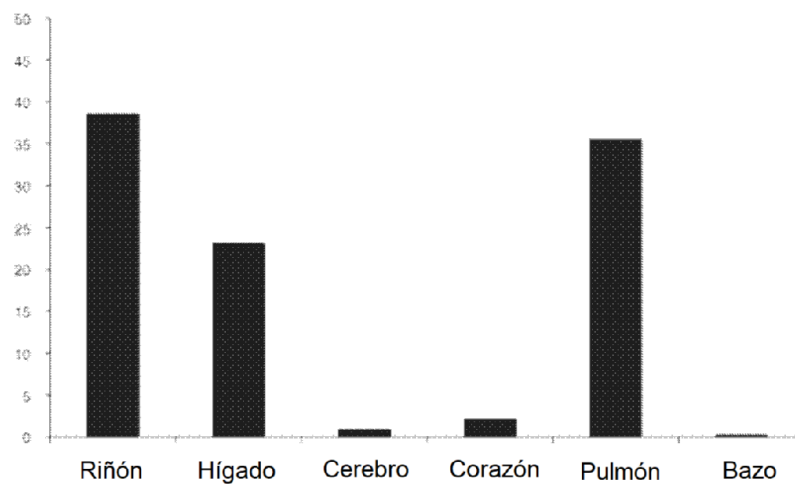


FIG. 4

A



B

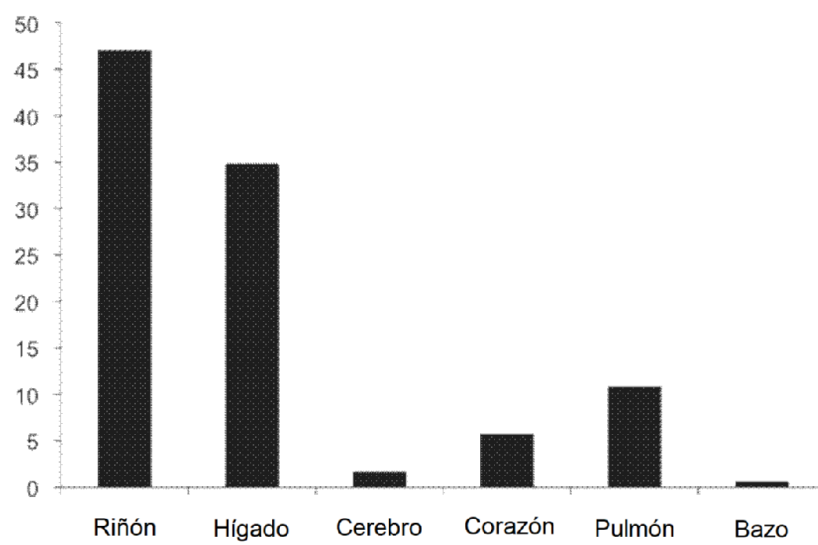


FIG. 5

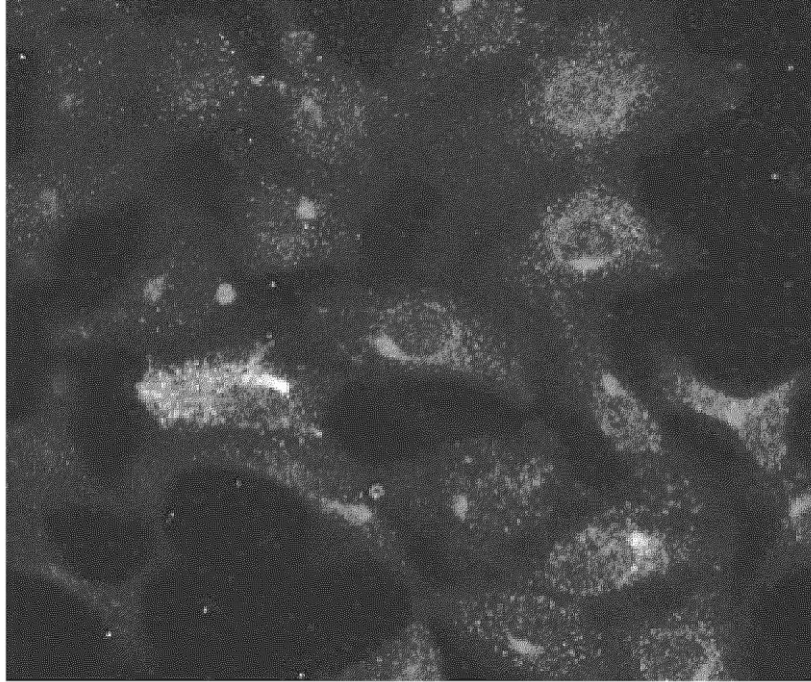


FIG. 6

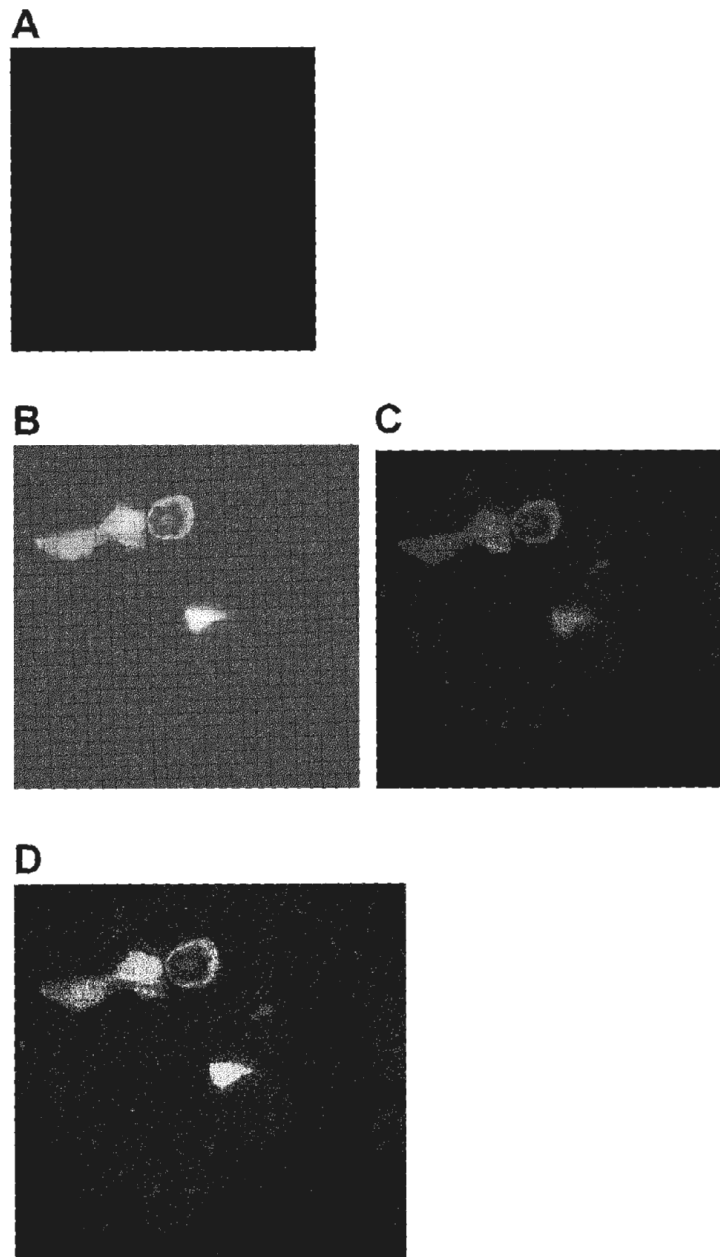


FIG. 7

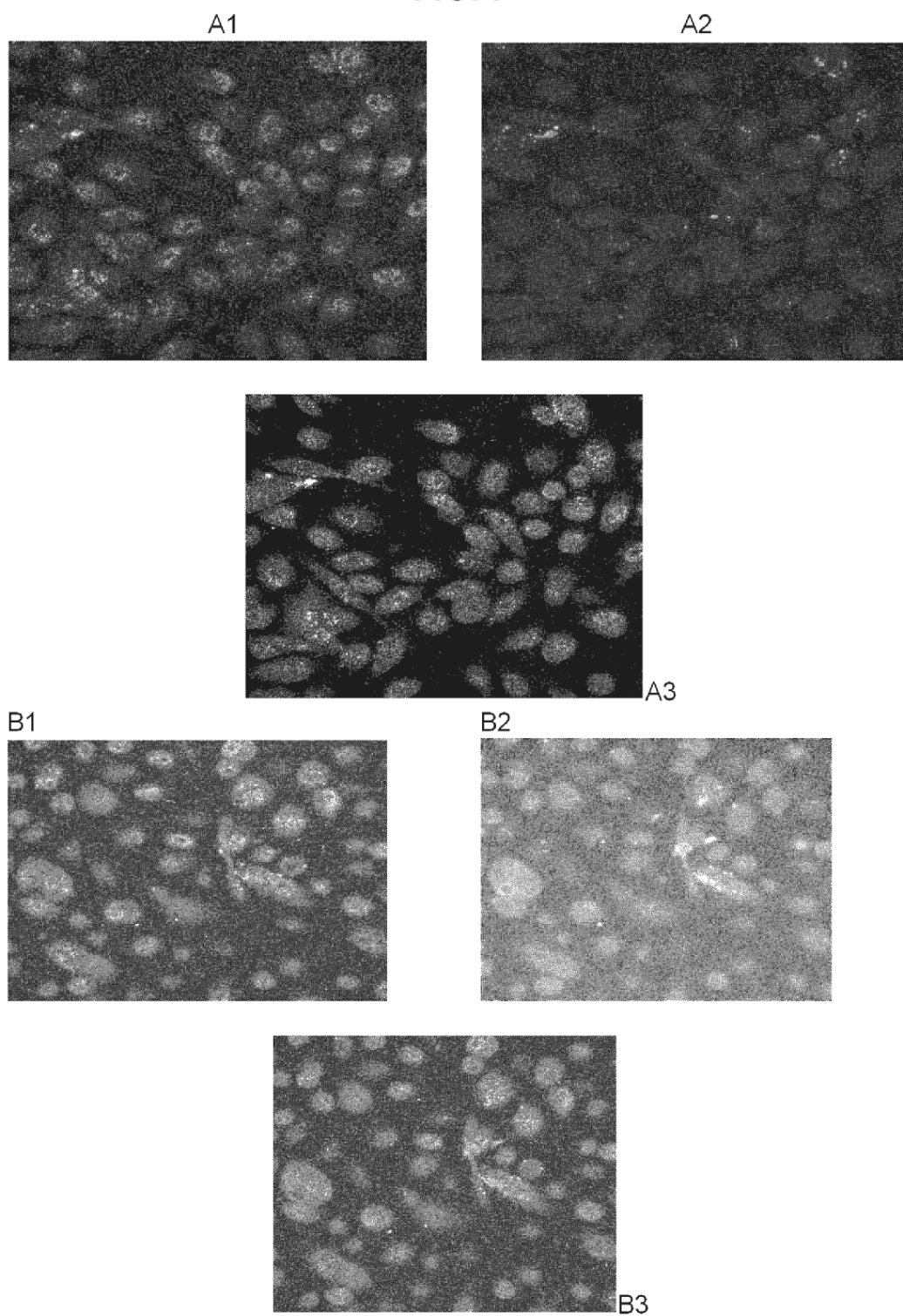
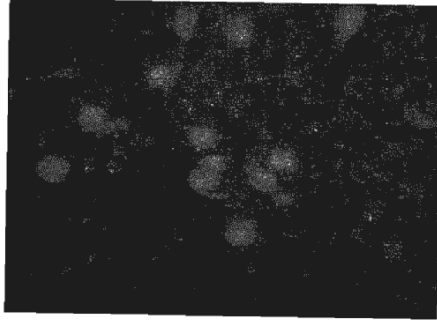
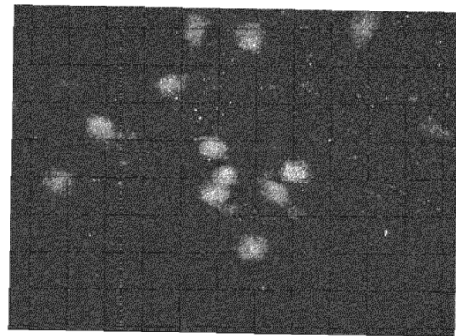
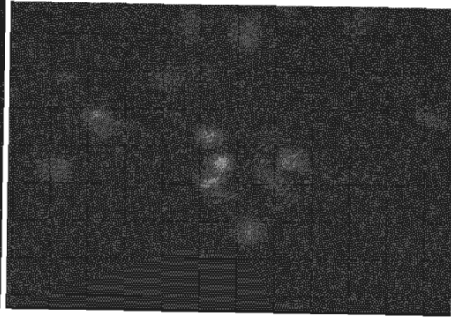


FIG. 8

A1

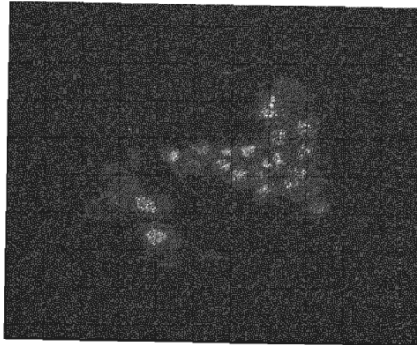


A2

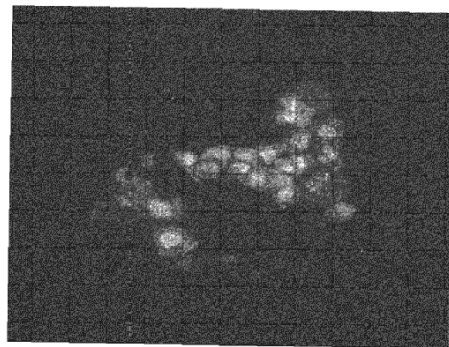
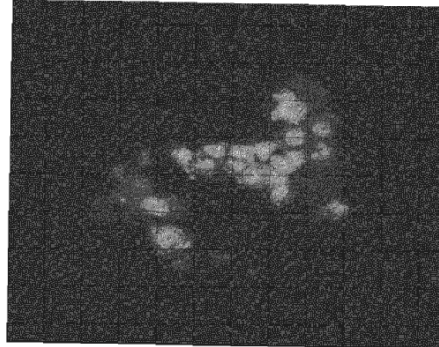


A3

B1



B2



B3

FIG. 9

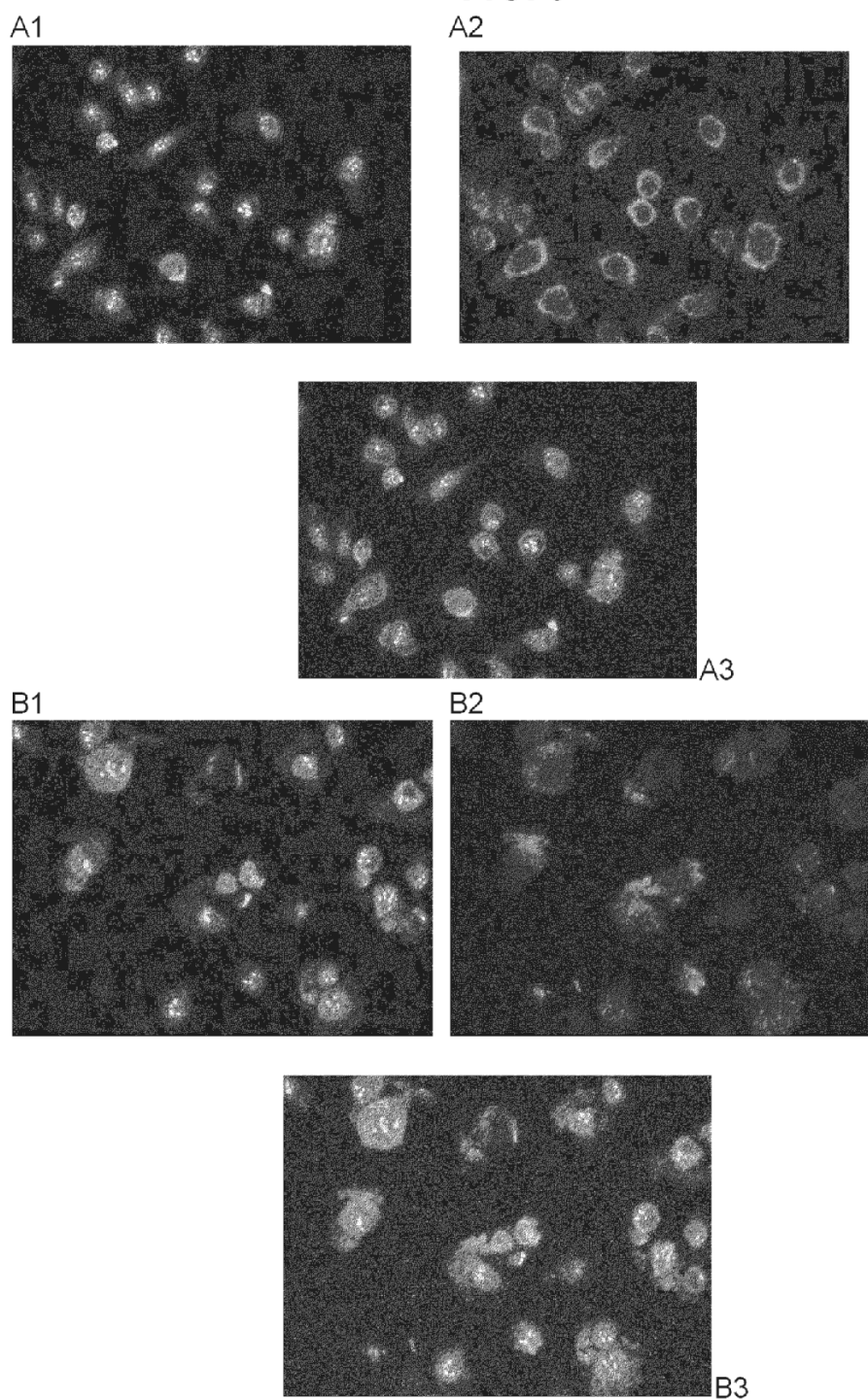


FIG. 10

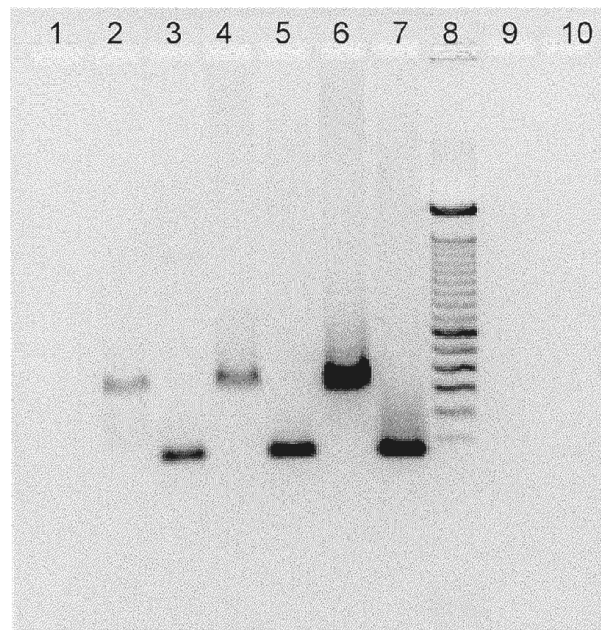


FIG. 11

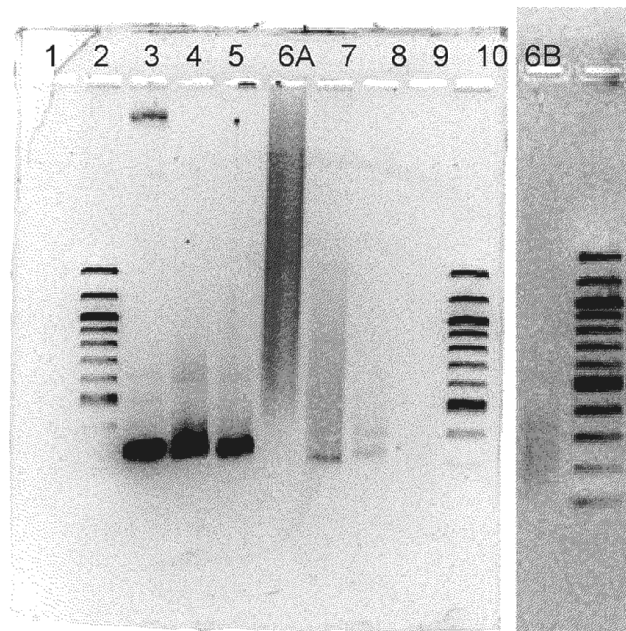


FIG. 12A

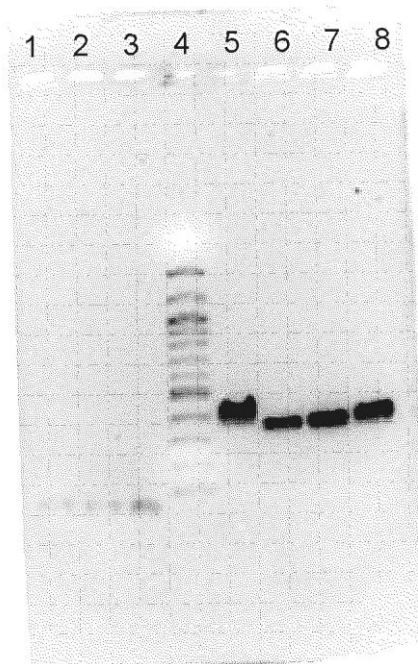


FIG. 12B

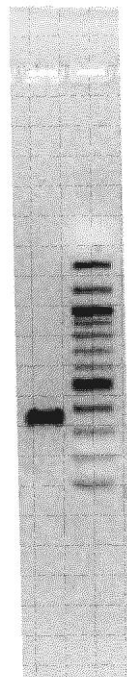


FIG. 13

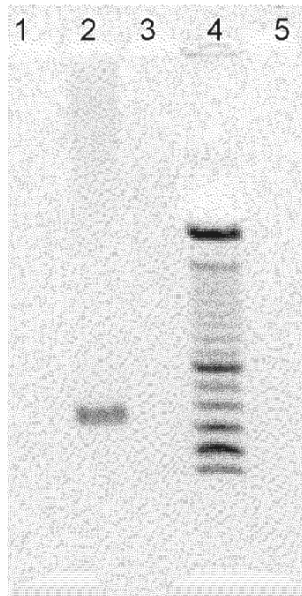


FIG. 14

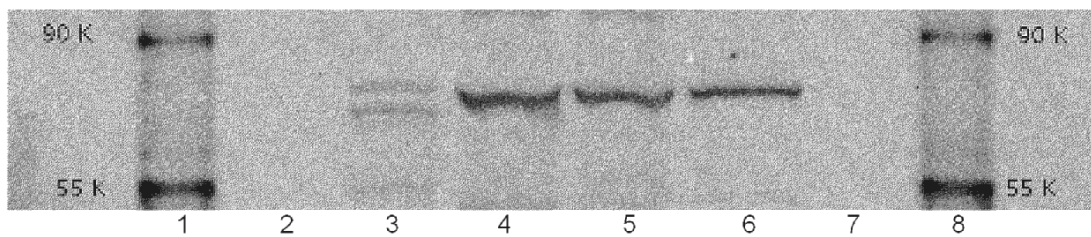


FIG. 15A

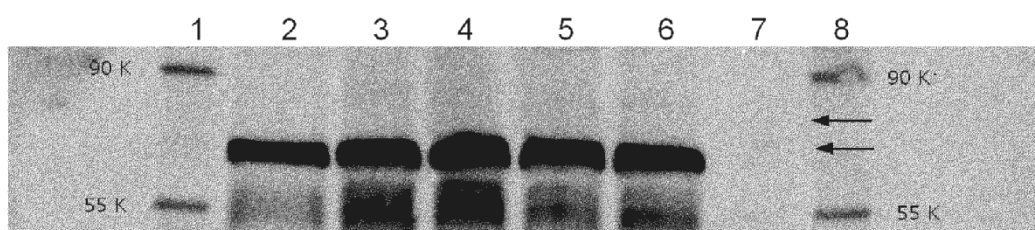


FIG. 15B

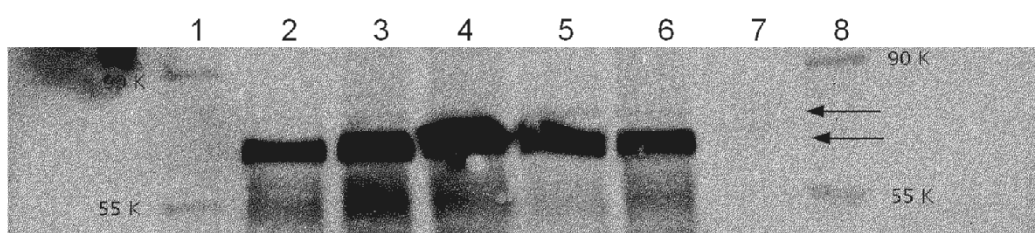


FIG. 15C

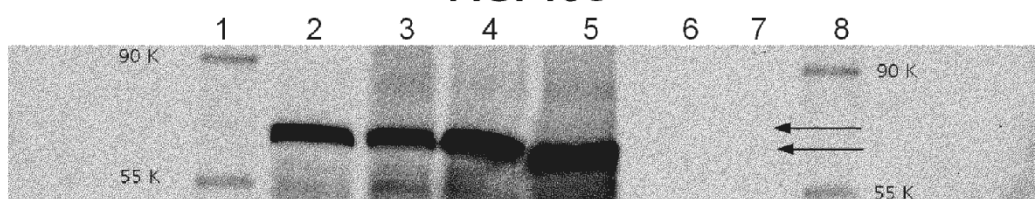


FIG. 15D

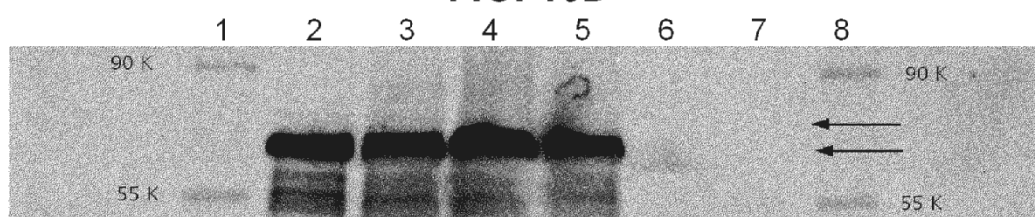


FIG. 16

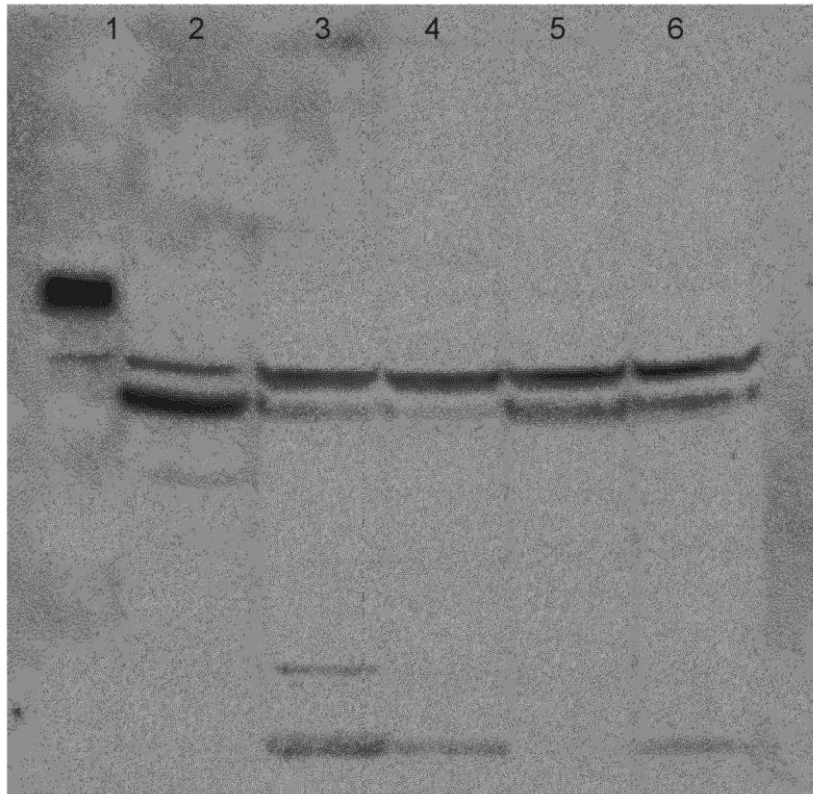


FIG. 17

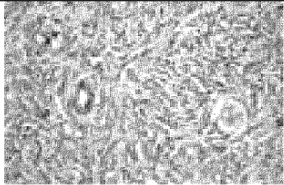
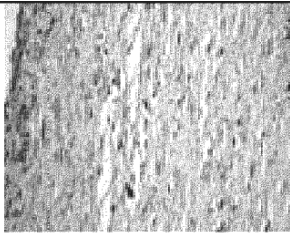
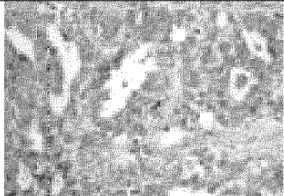
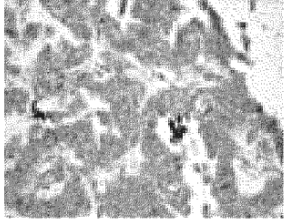
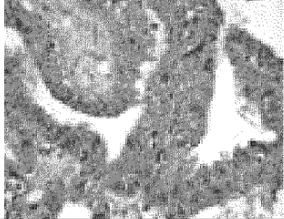
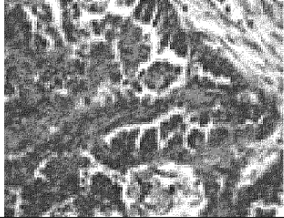
Puntuación IHQ	Intensidad de tinción (breve descripción)	Imagen representativa	Puntuación del espécimen (tipo y grado de tumor de ovario)
0	Sin tinción tisular		Tejido de ovario normal
1/2	Tinción muy débil: la mayoría de las células dan tinción negativa; tinción débil de algunas células		Tejido de ovario normal
2	Tinción débil de la mayoría de las células		Adenocarcinoma papilar mucinoso Grado II-III
3	Tinción clara de la mayoría de las células		Adenocarcinoma papilar seroso Grado II
4	Tinción moderada de la mayoría de las células		Adenocarcinoma papilar seroso Grado II
5	Tinción intensa de la mayoría de las células		Adenocarcinoma papilar seroso Grado II

FIG. 18

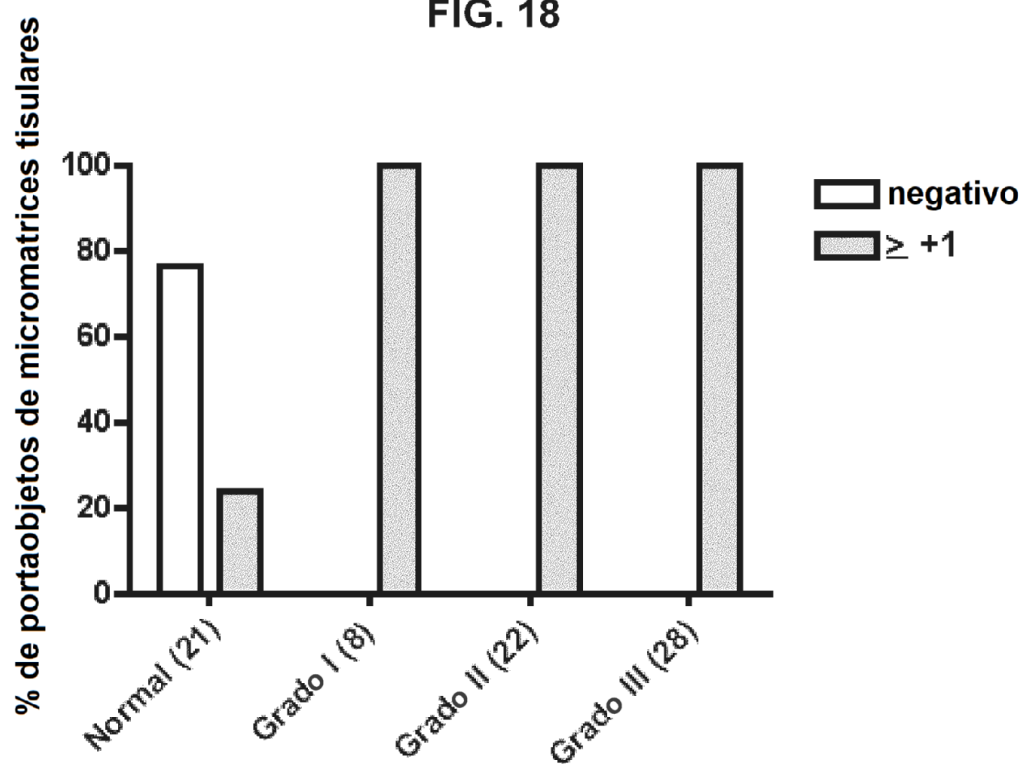
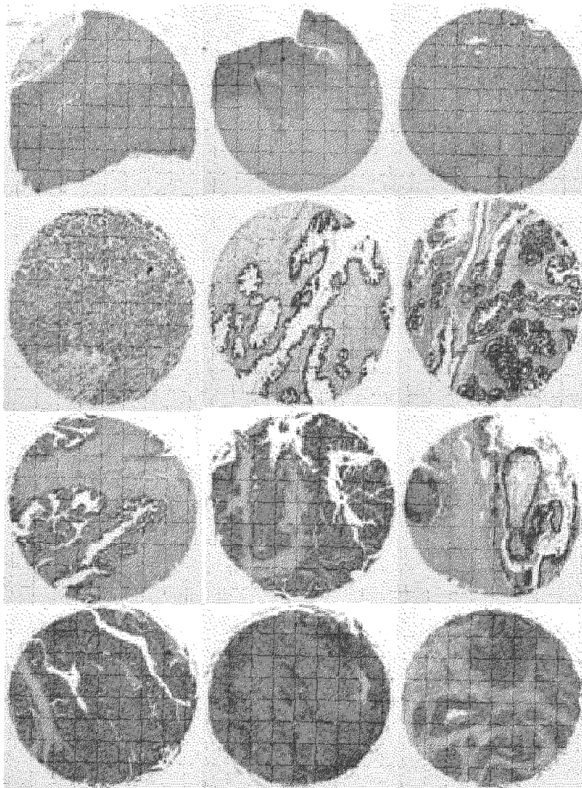


FIG. 19



Biopsia de ovario
Grado
Posición (graduación de intensidad)
Tejido de ovario normal
 H-7(-), H-8(-/+), H-10 (-)

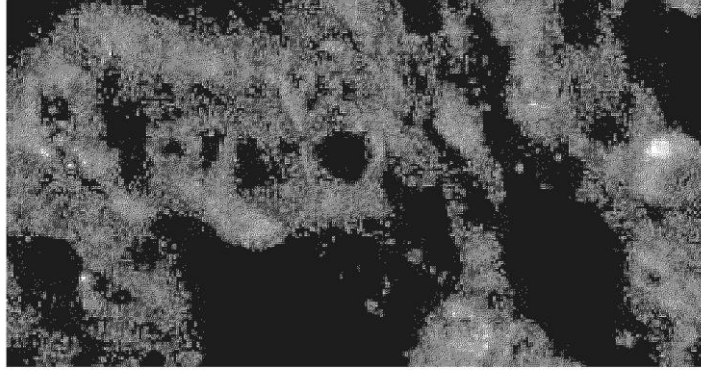
Adenocarcinoma papilar seroso
Grado I
 D-5 (++), C-5(+), C-6 (++++)

Adenocarcinoma papilar seroso
Grado II
 G-5 (++), G8 (+++), G10 (+++)

Adenocarcinoma papilar seroso
Grado III
 E-3 (++++), F-4 (+++), F-7 (++++)

FIG. 20

A



B

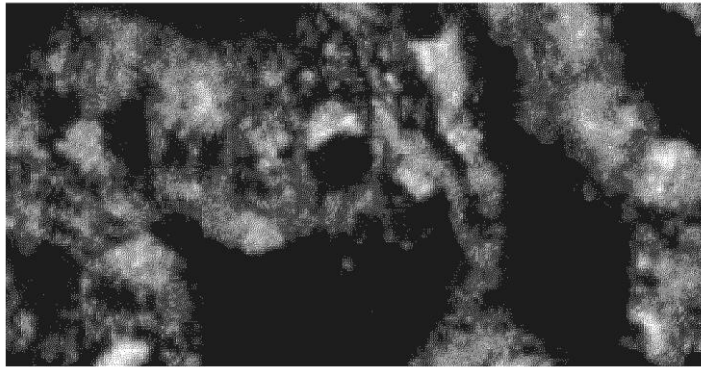
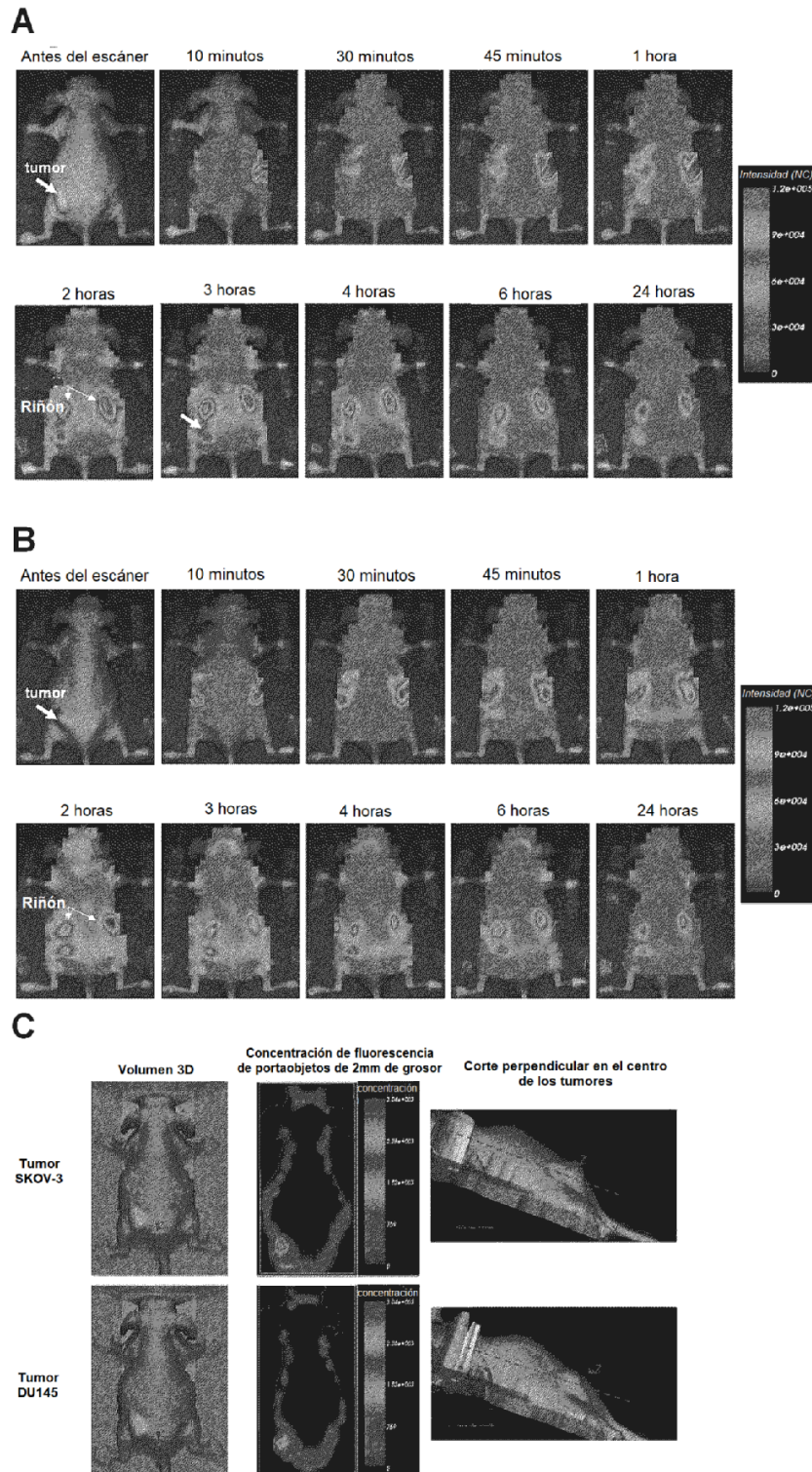
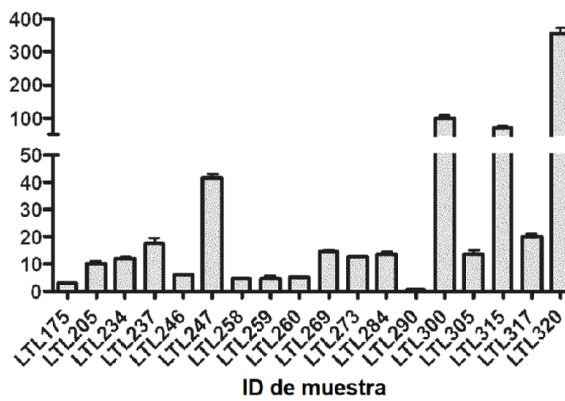


FIG. 21



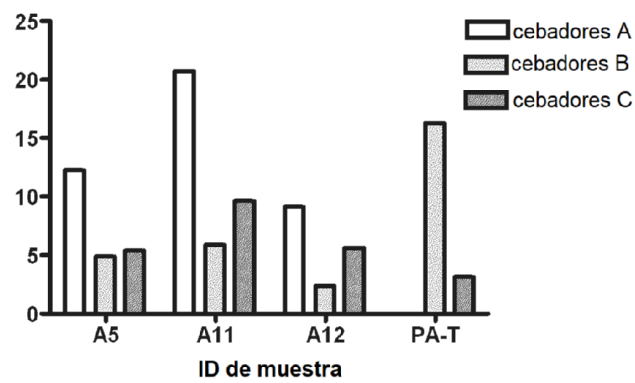
Expresión de ARNm de TRPV6 en relación
con controles sanos en muestras de cáncer
de ovario

FIG. 22A



Expresión de ARNm de TRPV6 en relación
con controles sanos en muestra de cáncer de
próstata

FIG. 22B



Expresión de ARNm de TRPV6 en relación
con controles sanos en muestras de cáncer
de mama

FIG. 22C

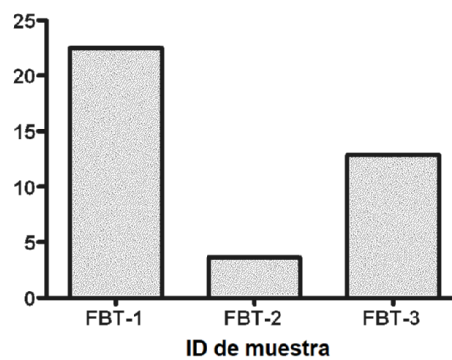
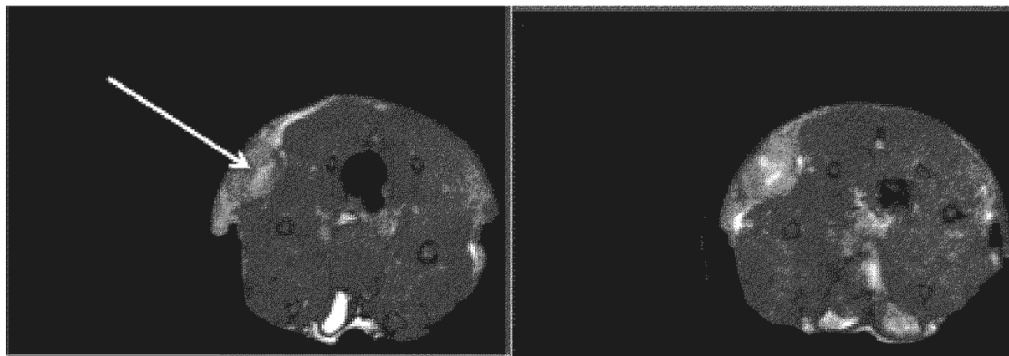


FIG. 23

A. Perlas de control SPIO



Tumor antes de la inyección

Tumor 24 h después
de la inyección

B. Conjugado SPIO-SorC27 de unión a TRPV6

Tumor antes de la inyección

Tumor 24 h después
de la inyección

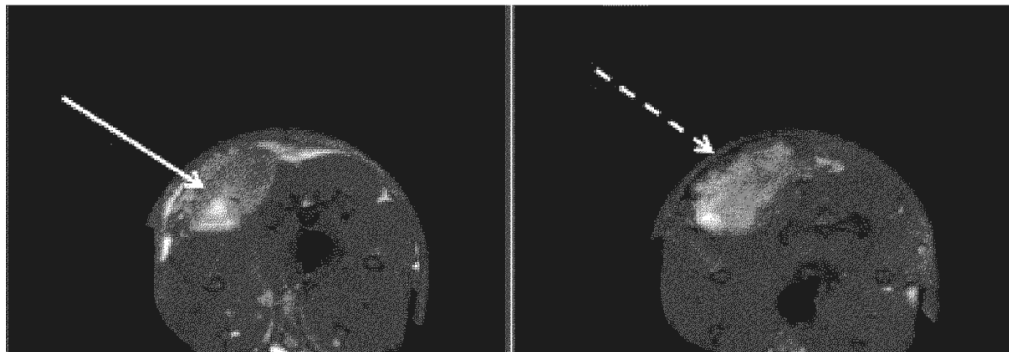
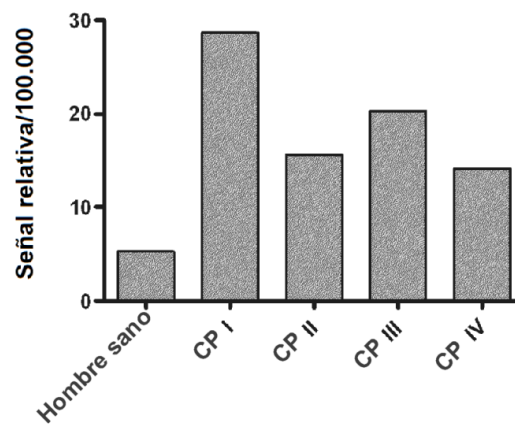
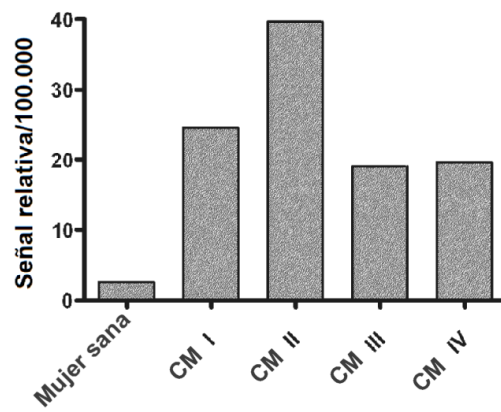


FIG. 24A



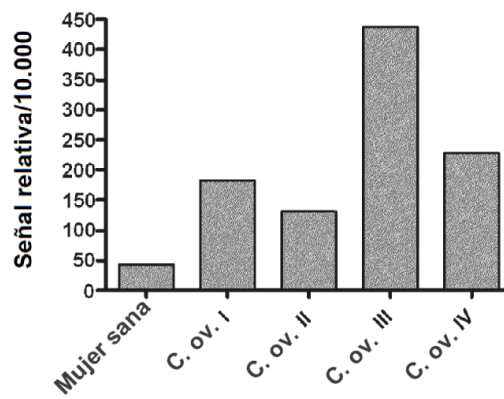
Próstata

Fig 24B



Mama

Fig 24C



Ovario

Fig 25

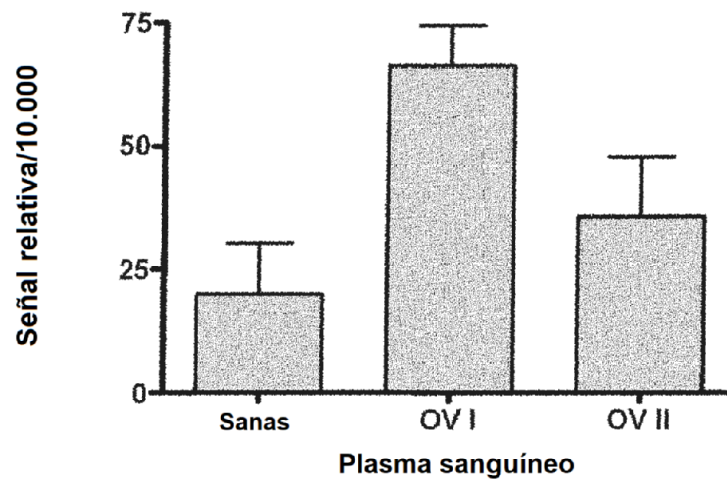


Fig 26A

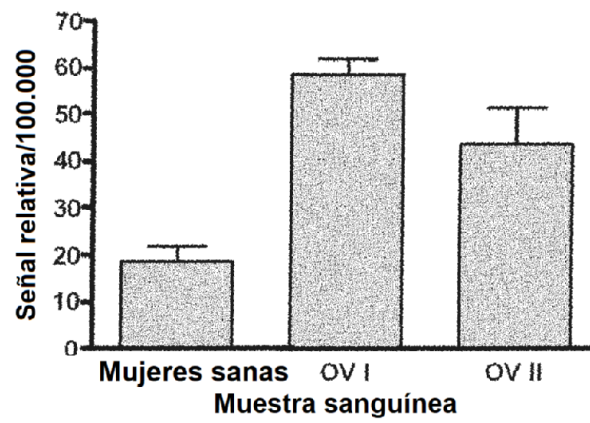


Fig 26B

