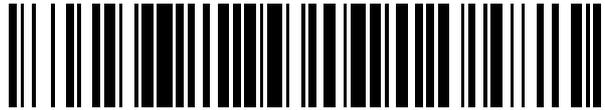


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 121**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2002 E 02743382 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **31.03.2004 EP 1402070**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico del cáncer en base a genes OBCAM y NTM**

30 Prioridad:

**27.06.2001 GB 0115673
16.07.2001 US 305137 P
31.10.2001 US 330792 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2013

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)
Angel Building 407 St. John Street
London EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**SELLAR, GRANT CLARK y
GABRA, HANI**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 121 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

Métodos para el diagnóstico del cáncer en base a genes OBCAM y NTM

0001 La presente invención se refiere al cáncer y en particular a los cánceres de ovario y colorrectal.

5 0002 El cáncer es una enfermedad seria y una importante causa de muerte. Aunque ha habido avances en el diagnóstico y tratamiento de ciertos cánceres en años recientes, todavía hay una necesidad de mejoras en el diagnóstico y tratamiento.

10 0003 El cáncer es una enfermedad genética y en muchos casos implica mutaciones en uno o más genes. Se cree que hay alrededor de 30-40,000 genes en el genoma humano pero sólo un puñado de estos genes han demostrado estar implicados en el cáncer. Aunque se conjetura que muchos genes más que han sido identificados en la actualidad se encontrarán implicados en el cáncer, el progreso en esta área ha sido lento a pesar de la disponibilidad de técnicas de análisis molecular. Esto es debido a la estructura y función variada de los genes que han sido identificados a la fecha que sugiere que los genes del cáncer pueden tomar muchas formas y tienen muchas funciones diferentes.

15 0004 El cáncer de ovario es la causa más frecuente de muerte por tumores ginecológicos malignos en el mundo occidental, con una incidencia de 5,500 nuevos casos cada año en Inglaterra y Gales. Es la cuarta causa más común de mortalidad por cáncer en mujeres estadounidenses. La mayoría de pacientes con cáncer epitelial de ovario presentan en una etapa avanzada de la enfermedad. En consecuencia, la tasa de supervivencia a los 5 años es sólo 30% después de cirugía y quimioterapia adecuada a pesar de la introducción de nuevos fármacos tales como platino y taxol (Advanced Ovarian Cancer Trialists Group (1991) *BMJ* 303, 884-893; Ozols (1995) *Semin Oncol* 22, 61-66). Sin embargo, los pacientes que tienen la enfermedad de etapa I (confinada a los ovarios) van mejor con tasa de supervivencia de 5 años del 70%. Por lo tanto es deseable tener técnicas para detectar el cáncer antes de la metástasis para tener un impacto significativo en la supervivencia.

25 0005 El cáncer epitelial de ovario constituye el 70-80% del cáncer de ovario y abarca un amplio espectro de lesiones, que va desde tumores benignos localizados y neoplasias de potencial maligno límite a adenocarcinomas invasivos. Histológicamente, los cánceres epiteliales de ovario comunes se clasifican en varios tipos, esto es, tumores serosos, mucinosos, endometrioides, de células claras, epiteliales mixtos y no diferenciados. La heterogeneidad de subtipos histológicos refleja el potencial metaplásico de la superficie del epitelio ovárico Mulleriano, que comparte un origen embriológico común con el peritoneo y el resto del sistema uro-genital. Tumores de células germinales, de los cordones sexuales/estromas y sarcomas representan el resto de los cánceres ováricos. La histogénesis y características biológicas del cáncer epitelial de ovario no son bien entendidas lo mismo que las alteraciones genéticas moleculares que pueden contribuir al desarrollo de tales tumores o su progresión. Los factores epidemiológicos relacionados a la ovulación parecen ser importantes, por lo que las células epiteliales de ovario se someten a varias tandas de división y crecimiento proliferativo para curar la herida en la superficie epitelial. Esto lleva al desarrollo de quistes epiteliales de inclusión y tumores malignos francos pueden derivarse de ellos (Fathalla (1971) *Lancet* 2, 163).

35 0006 Una revisión de detección de cáncer de ovario se da en Bel et al (1998) *Health Technology Assessment* 2, 1-50.

40 0007 Los cambios genéticos en el tumor son críticos para el desarrollo del cáncer. Muchas regiones cromosómicas (los cromosomas 3, 5, 6, 8, 11, 13, 17, 18, 22, y X) han sido implicados en contener genes supresores de tumores implicados en la progresión tumoral de cáncer de ovario esporádico, pero solo el gen p53 (brazo del cromosoma 17p) se encontró que con frecuencia mutaba (Shelling et al (1995) *Br. J. Cancer* 72, 521-527). El gen BRCA1 (brazo del cromosoma 17q) y el gen BRCA2 (brazo del cromosoma 13q) aislados en 1994 y 1996 respectivamente, están mutados en una proporción de pacientes con cáncer de mama/ovario familiar (Ford & Easton (1995) *Br. J. Cancer* 72, 805-812). El cáncer de ovario familiar sólo representa el 5-10% de todos los tumores ováricos. En tumores de pacientes con cáncer de ovario esporádico, solo cinco mutaciones en el gen BRCA1 y cuatro en el gen BRCA2 han sido informados (Takahashi et al (1995) *Cancer Res.* 55, 2998-3002; Takahashi et al (1996) *Cancer Res.* 56, 2738-2741) sugiriendo que son raros en el cáncer de ovario esporádico. Las mutaciones en los genes de reparación de errores de emparejamiento se han informado con una frecuencia del 10% (Tangi et al (1996) *Cancer Res.* 56, 2501-2505; Fujita et al (1995) *Int. J. Cancer* 64, 361-366; Orth et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9495-9499). Así los genes que pueden ser más críticos en la progresión del tumor en el cáncer de ovario esporádico no han sido aún totalmente caracterizados.

45 0008 WO 96/05306, WO 96/05307 y WO 96/05308 se refieren a métodos y materiales usados para aislar y detectar un gen (BRCA1) que predispone al cáncer de mama y ovario humano, algunos de cuyos alelos mutantes se alega que causan susceptibilidad al cáncer, en particular cáncer de mama y ovario.

55 0009 Se ha sugerido que la actividad supresora del tumor está codificada en el cromosoma 11 (Tanaka et al (1991) *Nature* 349, 340-342; Rimessi et al (1994) *Oncogene* 9, 3467-3474; Satoh et al (1993) *Mol. Carcinogenesis* 7, 157-164; Yoshida et al (1994) *Mol. Carcinogenesis* 9, 114-121; Gabra et al (1996) *Int. J. Oncol.* 8, 625-631; Gabra et al (1996) *Cancer Res.* 56, 950-954; Gabra et al (1995) *Br. J. Cancer* 72, 367-375; EP 0 727 486; Gabra et al (1998)

Proc. AACR 39, Abstract #4236; y Gabra et al (1998) Br J. Cancer 78, Poster P185), pero ninguno de estos documentos identifican al gen(es) candidato.

0010 Los tumores colorrectales del intestino grueso son una causa frecuente de mortalidad por cáncer humano en el mundo occidental con aproximadamente 19,000 muertes en el Reino Unido por año.

5 0011 La mayoría de los cánceres de colon y recto son adenocarcinomas (Jass y Morson (1987) J. Clin. Pathol. 40,1016-1023; Morson (1974) Proc. R. Soc. Med. 67, 451-457). La bibliografía sigue dividida sobre los verdaderos orígenes de los carcinomas colorrectales y se ha propuesto que los carcinomas pueden surgir tanto desde dentro de los neoplasmas benignos existentes (denominados adenomas), en lo que se denomina la secuencia adenoma a carcinoma (Muto et al (1975) Cancer 30, 2251-2270), o por áreas de displasia generalizada (*de novo*) sin una etapa adenomatosa. Si bien es probable que algunos cánceres colorrectales se originen en los adenomas, la mayoría de adenomas no parecen progresar al carcinoma y de hecho incluso pueden retroceder (Knoernschild (1963) Surg. Forum XIV 137-138). Si bien la evidencia respecto al ambiente, dieta, edad y sexo sugieren que éstos son todos factores de riesgo para el cáncer colorrectal, la falta de confirmación de la participación de estos factores en todos los casos sugiere una base genética subyacente para la formación del tumor colorrectal. La mayoría de cánceres colorrectales no están asociados con claros síndromes hereditarios aunque existen formas hereditarias, incluyendo Poliposis Familiar Intestinal (FPC), síndrome de Gardner, cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC) y síndrome de Turcot.

20 0012 Varios oncogenes y genes supresores de tumores han demostrado jugar un papel definido en la tumorigénesis colorrectal, mientras que en otros loci una correlación entre LOH y el cáncer colorrectal no está tan bien definido, sobre todo, se encontró que el gen *Barx2* es un supresor de tumor candidato en la región 11q24-q25 LOH implicada en el cáncer de ovario y colorrectal (WO 00/77252).

25 0013 Los IgLONs (LAMP inmunoglobulina, OBCAM y Neurotrimin) son una familia de moléculas de adhesión de células que contienen dominio inmunoglobulina (Ig), parte de la SuperFamilia de proteínas que contienen dominio Ig (IgSF). Los IgLONs consisten de LAMP (Proteína de Membrana Asociada al Sistema Límbico), OBCAM/OPCML (Molécula de Adhesión Celular de Unión de Opiáceos, previamente llamada OP55A), y Neurotrimin (NTM o HNT en humanos, o CEPU-1 en pollitos). Recientemente, se ha demostrado que la familia IgLON incluye neurotractin de rata (kilon – Vástagos de LON es el homólogo de pollo). Los IgLONs son todas proteínas extracelulares, y no son en sí mismas proteínas transmembrana o de hecho incluso directamente en contacto con la membrana celular. En cambio, están atados a la membrana celular través de un anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) atado cerca del C-terminal de la proteína, que es luego insertada en la membrana celular. Se presume que la señalización al núcleo tras la unión IgLON es llevada a cabo entonces a través de la trans- y cis-interacción con, aún no definido, vías de señalización acopladas a la proteína G (Clarke y Moss (1997) Eur. J. Neurosci. 9:334-41).

35 0014 Los genes que codifican OBCAM y NTM se ubican en la región 11q24-q25 del cromosoma 11. Los dos genes comparten aproximadamente el 80% y 76% de identidad en el nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. En el ratón, ambas proteínas están también codificadas por genes distintos que parecen estar agrupados en el extremo proximal del cromosoma 9 de ratón, en una región sinténica al cromosoma 11 humano. Los dos genes comparten aproximadamente 80% y 76% de identidad en el nivel de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente. En el ratón, ambas proteínas están también codificadas por genes distintos que parecen estar confinados en el extremo proximal del cromosoma 9 del ratón, en una región sinténica al cromosoma 11q24-q25. Es probable, por lo tanto, que estos genes altamente relacionados han surgido lo más probablemente como un resultado de un suceso ancestral de duplicación de genes que ocurrió al menos antes de la divergencia del hombre y el ratón (Struyk AF et al (1995) J. Neurosci 15(3):2141-56).

45 0015 La función de IgLON ha sido descrita principalmente en el contexto de la guía de axón neuronal y contacto célula-célula en el desarrollo del cerebro. Los miembros de la familia IgLON pueden estar co-expresados en un solo tipo de célula, y puede ser que sus niveles relativos en la superficie celular e interacciones heterofílicas resultantes, en adición a las interacciones homofílicas, sean importantes en la contextualización de su función. La homodimerización (y también trimerización) en el plano de una membrana es una característica de cis-interacción de NTM (Gil et al (1998) J. Neuroscience 18:9312-9325). No ha sido previamente sugerido que los miembros de la familia IGLON están implicados en el cáncer y, en particular, no ha sido previamente sugerido que miembros de la familia IgLON puedan ser genes supresores de tumores.

50 0016 Nakajima Osamu et al (1997, Neuroreport 8 (14): 3005-3008, XP009010402 ISSN: 0959-4965) (D1) discute la expresión de la molécula de adhesión celular de unión de opiáceos (OBCAM) y neurotrimin (NTM) en *E. coli* y su reactividad con el anticuerpo monoclonal anti-OBCAM.

55 0017 WO 01/19845 (The Johns Hopkins University School of Medicine) (D2) describe el polipéptido CACNA1G diferencialmente metilado.

0018 EP1077259 (Ono Pharmaceutical Co.) (D4) describe un polipéptido, y un ADNc que corresponde al mismo, que tiene 96% que se identifica con la secuencia que se muestra en la Figura 9.

0019 Govitrapong P et al (1993, J. Biol. Chem. 268 (24): 18280-18285, XP000602144 ISSN: 0021-9258) (D6) describe que la transfección de las células NG108-15 con el ADNc antisentido de la molécula de adhesión celular de unión de opiáceos altera la interacción de la proteína G – receptor de opioide.

5 0020 Sorprendentemente, se ha encontrado que en adición al supresor de tumores Barx2 ubicado en 11q24-q25, dos genes adicionales en esta región son metilados, mutados y/o eliminados en el cáncer. Se cree que los genes OBCAM y NTM están implicados en el cáncer de ovario y colorrectal como genes supresores de tumores.

0021 Esta observación inesperada proporciona nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento para el cáncer, especialmente para los cánceres de ovario y colorrectal.

10 0022 Un primer aspecto de la invención proporciona un método de diagnóstico del cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- (i) la obtención de una muestra que contiene ácido nucleico del paciente; y
- (ii) el contacto de dicho ácido nucleico con
 - (a) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (b) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (c) ambos (a) y (b).

20 0023 Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para la predicción de las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- (i) obtener una muestra que contiene ácido nucleico del paciente; y
- (ii) contactar dicho ácido nucleico con
 - (a) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (b) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (c) ambos (a) y (b).

0024 La identificación de las mutaciones en, o la falta de actividad de, OBCAM o NTM se cree que es particularmente útil para el pronóstico (e.d. conexión con resultado) y en determinar si un paciente puede ser adecuado para tratamiento por terapia génica o terapia agonista/mimética (ver más adelante).

35 0025 En particular, la falta de actividad de OBCAM debida a pérdida de heterocigosidad se cree que es un suceso temprano en, por ejemplo, el cáncer de ovario. La pérdida de heterocigosidad NTM se cree que ocurre más tarde que la pérdida de OBCAM en el cáncer de ovario. Por lo tanto, la identificación de una falta de actividad o mutación en OBCAM puede ser particularmente informativa sobre la posibilidad del comienzo del cáncer, mientras que el análisis de ambos OBCAM y NTM y la identificación de falta de actividad o mutación (tal como supresión) (ej., por análisis de metilación o análisis de LOH) en ambos genes puede permitir una conclusión en cuanto al grado, o donde el método se realiza sobre el mismo paciente en tiempos diferentes, de la progresión de la enfermedad.

45 0026 Como se discute más adelante, el ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos, puede hibridar con dicho gen una vez que dicho gen ha sido expuesto a un tratamiento modificador, por ejemplo tratamiento con bisulfito o enzimas de restricción sensible a metilación, como se discute más adelante. Así, el método del primer o segundo aspecto de la invención puede comprender el paso de exponer dicho ácido nucleico del paciente a un tratamiento modificador, por ejemplo tratamiento bisulfito, antes de contactar dicho ácido nucleico del paciente con el ácido nucleico de ensayo.

0027 La detección temprana del cáncer de ovario es particularmente útil ya que este tipo de cáncer sigue siendo asintomático hasta las últimas etapas de desarrollo del tumor.

50 0028 Preferentemente, el paciente es un paciente humano y, generalmente, la referencia a OBCAM y NTM es una referencia al OBCAM humano y al NTM humano respectivamente.

0029 Sera fácilmente apreciado por el experto que los genes OBCAM y NTM o sus partes pueden fácilmente obtenerse desde otras bibliotecas adecuadas de genes humanos, tales como bibliotecas de cósmido estándar, o cromosoma artificial de levadura (YAC) o cromosoma artificial P1 (PAC). Un ADNc OBCAM o NTM pueden usarse como una sonda para identifica todo o partes del gen OBCAM o NTM respectivamente.

- 0030 La secuencia de ADNc OBCAM está disponible al público desde el GenBank bajo el Número de Acceso NM_002545. Esta secuencia es también mostrada en la Figura 7. Secuencias adicionales para OBCAM en rata y vaca están disponibles del GenBank bajo los siguientes Números de Acceso: M88711 (*Rattus norvegicus*) y X12672 (*Bos taurus*).
- 5 0031 La estructura genómica del gen puede determinarse comparando las secuencias de ADNc, con la secuencia de clones BAC genómicos de la base de datos del GenBank. Los siguientes clones BAC o PAC contienen el gen OBCAM: AC027631 (aunque esta secuencia en GenBank está incorrectamente anotada, al referirse al cromosoma 18; los marcadores en ella contenidas son todos cromosoma 11) AC027631, AC012234, AP000843 y AP000912. Se pueden obtener de los centros de secuenciación pertinentes como parte del proyecto HGS.
- 10 0032 Se cree que el gen OBCAM abarca el marcador genético D11S4085 en el cromosoma 11. Como se describe en más detalle en el Ejemplo, el marcador D11S4085 ha sido identificado como perdido desde un alelo del cromosoma 11 en el cáncer de ovario o colorrectal (en 56% (24/43) y 32% (8/25) de casos respectivamente). El marcador D11S4085 se sabe que está localizado telomérico al marcador D11S1320. El marcador D11S4085 es intrónica, en el segundo intrón de OBCAM, aproximadamente 300-600kb telomérico a D11S1320. Por lo tanto, en una realización alternativa del primer y segundo aspecto de la invención, el paso (ii) parte (a) puede formularse como:
- 15 “un ácido nucleico que hibrida selectivamente a un polinucleótido que comprende el marcador microsatélites D11S4985, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o”.
- 20 0033 En este caso, el polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido que comprende el marcador D11S4085. Preferentemente, el polinucleótido comprende al menos una parte del gen OBCAM, más preferentemente todo el gen OBCAM. Aún más preferiblemente, el polinucleótido es el cromosoma 11, o una porción del mismo donde la porción es al menos 100, 500, 5000, o 50000 nucleótidos en longitud. Preferentemente, la porción de nucleótido es tal que comprende al menos 50, 100, 2500, 5000 o 25000 nucleótidos consecutivos del cromosoma 11 a cada lado del marcador D11S4085.
- 25 0034 D11S4085 está flanqueado por secuencia genómica en el intrón 2 de OBCAM. Este está en BAC AC012234. La secuencia parcial de nucleótido de intrón 2 se muestra en la Figura 16. Sin embargo, ya que la Figura 16 solo muestra límites intrón/exón y no muestra los intrones de longitud total, el marcador D11S4085 no se muestra en esta Figura.
- 30 0035 Por lo tanto, se apreciará que la referencia al “gen OBCAM” a continuación puede ser una referencia a un polinucleótido que comprende el marcador D11S4085 como se define antes.
- 0036 La secuencia ADNc de NTM está disponible al público del GenBank bajo el Número de Acceso NM_016522. Esta secuencia es también mostrada en la Figura 8. Una secuencia adicional para NTM en rata está disponible del GenBank bajo el Número de Acceso NM_017354 (*Rattus norvegicus*).
- 35 0037 La estructura genómica del gen puede determinarse comparando las secuencias ADNc, por ejemplo secuencias ADNc del GenBank, con la secuencia de clones genómicos BAC de la base de datos del GenBank. Los siguientes clones BAC o PAC contienen el gen NTM: AC012134, AC018368 y AP0000912. Se pueden obtener de los centros de secuenciación pertinentes como parte del proyecto HGS.
- 0038 Otras secuencias de ADNc NTM pueden incluir las de clones 11753149.0.6 y 11753149.0.37 de WO 00/61754 y PRO337 de WO 99/46281.
- 40 0039 Hemos determinado secuencias adicionales de ADNc NTM que se muestran en la Figura 9. Estas secuencias se encuentran, por ejemplo, en el epitelio superficial del ovario humano. La forma predominante en el epitelio superficial del ovario humano parece ser la forma “+33bp”. La forma “+69bp” es otra forma alternativa. Ambas formas parecen ser más abundantes en el epitelio superficial del ovario humano que la secuencia mostrada en la Figura 8 y en la entrada de la base de datos referida anteriormente. Una forma adicional es la forma “+108bp”, que contiene un
- 45 108bp adicional, que se prediría que resultará en terminación prematura de la traslación de proteínas y una isoforma de proteína NTM truncada resultante que carece del sitio de unión de anclaje GPI en el extremo carboxi. La proteína truncada, por tanto, podría predecirse que no se anclará a la membrana celular por medio de un ancla GPI. Esta isoforma puede por tanto representar una forma soluble de NTM, que puede estar ubicada extracelularmente, y que puede potencialmente interferir con o modular la función normal de NTM anclado a GPI.
- 50 0040 Así, se prefiere en relación al primer y segundo aspecto de la invención que el ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos, hibride al gen NTM +33bp y/o +69bp y/o +108bp o ADNc o sus complementos (particularmente en relación al cáncer del ovario).
- 55 0041 En una realización, se prefiere que dicho ácido nucleico hibride a las formas +33bp y/o +69bp y/o +108bp del gen NTM o ADNc o sus complementos. En una realización más se puede preferir que dicho ácido nucleico no hibride

además al gen NTM “normal” a de base de datos o a la secuencia ADNc, como se ejemplifica por la secuencia ADNc en la Figura 8.

5 0042 En cualquier caso, un OBCAM o ADNc NTM puede ser fácilmente obtenido de una biblioteca de ADNc humano usando técnicas bien conocidas y porciones de los clones genómicos, o porciones de la secuencia OBCAM o ADNc NTM mostrada en la Figura 7 y 8 o 9 respectivamente, como una sonda. Una biblioteca de ADNc humano adecuada es una preparada del ARNm aislado de un ovario humano o un tejido de ovario humano o cerebro humano o tejidos humanos linfoblastoides aunque diferentes isoformas específicas de tejido de NTM pueden existir en tejidos no ováricos. Una vez que un OBCAM o ADNc NTM o gen o fragmento del mismo ha sido identificado como se dijo, su secuencia de nucleótido puede fácilmente determinarse, por ejemplo usando secuenciación dideoxi de Sanger u otros métodos bien conocidos en la técnica.

15 0043 Se apreciará que el gen OBCAM o NTM puede existir como un gen “tipo salvaje” o puede existir como alelos mutantes que difieren en secuencia del gen de tipo salvaje, como se indica arriba. Por “alelos mutantes” se incluye no sólo secuencias que llevan a cambios en función o expresión del polipéptido OBCAM o NTM, sino variantes alélicas (o polimorfismos) que tienen un efecto nulo o menor en la función o expresión del polipéptido OBCAM o NTM. Así, los ácidos nucleicos que hibridan selectivamente en los métodos de la invención incluyen los que selectivamente hibridan la secuencia del gen OBCAM o NTM del tipo salvaje o la secuencia ADNc OBCAM o NTM de tipo salvaje (o la secuencia ARNm) así como los que selectivamente hibridan a alelos mutantes de los mismos. También, será fácilmente apreciado que, como se describe en más detalle, el experto puede fácilmente identificar alelos mutantes del gen OBCAM o NTM y polimorfismos de los mismos.

20 0044 Un ejemplo de un alelo mutante del gen OBCAM se describe en el Ejemplo 5, donde una nucleótido de citosina en el axón 2 (en la posición 334 en la entrada GenBank Número NM_002545 que se muestra en la Figura 7; mutación indicada en la Figura 18) está presente como una guanina. Esta mutación se ve en las líneas celulares del cáncer de ovario PEO1 y PEO4, pero no se ve en ADN de fibroblastos aislado del mismo paciente como PEO1 y PEO4. La mutación produce un cambio en la secuencia de aminoácido codificada; un residuo de prolina de “tipo salvaje” es reemplazado por una arginina en las líneas celulares del cáncer de ovario (Figura 18).

30 0045 Por “el polipéptido OBCAM o NTM” incluimos un polipéptido cuya secuencia comprende o consiste de la secuencia de aminoácido dada en la Figura 7, u 8 u 9, respectivamente, o cuya secuencia esta codificada por la secuencia de nucleótido indicada como región de codificación en las Figuras 7, u 8, u 9, respectivamente, y variantes naturales del mismo. Preferentemente, el polipéptido OBCAM es uno cuya secuencia de aminoácido comprende la secuencia dada en la Figura 7. Preferentemente, el polipéptido NTM es uno cuya secuencia de aminoácido comprende la secuencia dada en la Figura 8 o 9.

0046 Por “el polipéptido OBCAM o NTM” también incluimos cualquier polipéptido de origen natural que comprende una porción residual de 50 aminoácidos consecutivos o sus variantes naturales de la secuencia de polipéptido dada en la Figura 7, o Figura 8 o 9, respectivamente. Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido humano.

35 0047 Por “cambio en expresión del polipéptido OBCAM o NTM” se incluye cualquier cambio en el gen OBCAM o NTM que lleva a cambios en la expresión del polipéptido OBCAM o NTM respectivamente. Por ejemplo, cambios en la transcripción del gen OBCAM o NTM llevarán a cambios en la expresión del polipéptido OBCAM o NTM respectivamente. De forma similar, cambios en la traslación del ARNm OBCAM o NTM llevarán a cambios en la expresión del polipéptido OBCAM o NTM respectivamente.

40 0048 Mutaciones de la secuencia de codificación de la proteína de OBCAM o NTM pueden llevar a una pérdida de función de la proteína OBCAM o NTM respectivamente; de forma similar, pérdida de función puede ser debida al silenciamiento transcripcional del gen OBCAM o NTM o la presencia de mutaciones dominantes negativas.

45 0049 Se apreciará que los métodos de la invención definidos arriba pueden implicar ya sea directa o indirectamente comparar los resultados de la muestra de ensayo con resultados de una muestra de control tal como de una muestra no cancerosa conocida (normal) o de una muestra cancerosa conocida.

50 0050 Se apreciará que los ácidos nucleicos que son útiles en el método de la invención pueden fácilmente ser definidos como los que selectivamente hibridan al ADNc OBCAM o NTM, o un alelo mutante del mismo o sus complementos. En adición, los métodos de la invención incluyen el uso de un ácido nucleico que selectivamente hibridan al gen OBCAM o NTM o ADNc, o alelos mutantes del mismo cualquiera que sea la fuente del gen o ADNc. Un ejemplo de un alelo OBCAM mutante es mostrado en la Figura 18 y descrito en más detalle arriba. Los ácidos nucleicos que selectivamente hibridan a este mutante pueden ser fácilmente determinados usando las secuencias mostradas en las Figuras 7, 16 y 18.

55 0051 Por “hibridar selectivamente” se significa a que el ácido nucleico tiene suficiente similitud de secuencia de nucleótidos con dicho ADN o ADNc que puede hibridar bajo condiciones moderadas o altamente rigurosas. Como es bien conocido en la materia, la rigurosidad de hibridación de ácidos nucleicos depende de factores tales como la longitud del ácido nucleico sobre la que ocurre la hibridación, grado de identificación de las secuencias de hibridación y factores tales como la temperatura, fuerza iónica y contenido de CG o AT de la secuencia. Así, cualquier ácido nucleico que es capaz de hibridar selectivamente como se dijo es útil en la práctica de la invención.

Se prefiere que el ácido nucleico que hibrida selectivamente, hibride selectivamente al gen o ADNc OBCAM o NTM humano.

5 0052 Los ácidos nucleicos que pueden hibridar selectivamente a dichos ADN o ADNc (tales como el ADN o ADNc humano) incluyen ácidos nucleicos que tienen >95% de identidad de secuencia, preferentemente aquellos con >98%, más preferentemente aquéllos con >99% de identidad de secuencia, en al menos una porción del ácido nucleico con dicho ADN o ADNc. Como se sabe bien, los genes humanos usualmente contienen intrones de tal manera que, por ejemplo, un ARNm o ADNc derivado de un gen dentro de dicho ADN humano no coincidiría perfectamente a lo largo de toda su longitud con dicho ADN humano pero podría sin embargo ser un ácido nucleico capaz de hibridar selectivamente a dicho ADN humano. Así, la invención incluye específicamente ácidos nucleicos que hibridan selectivamente a un ADNc OBCAM o NTM pero pueden no hibridar a un gen OBCAM o NTM, o viceversa. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que extienden los límites intrón-exón del gen OBCAM o NTM pueden no ser capaces de hibridar selectivamente al ADNc OBCAM o NTM respectivamente. Los límites intrón-exón para el gen OBCAM se muestran en la Figura 16; la secuencia de nucleótidos para todos los intrones está incompleta.

15 0053 Condiciones de hibridación normales moderadamente o altamente rigurosas que llevan a hibridación selectiva son conocidas en la materia, por ejemplo aquellas descritas en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2da edición, Sambrook et al (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE.UU.

0054 Un ejemplo de una solución de hibridación típica cuando un ácido nucleico es inmovilizado en una membrana de nylon y el ácido nucleico de la sonda es ≥ 500 bases o pares de bases es:

6 x SSC (citrato de sodio salino)

20 0.5% dodecil sulfato sódico (SDS)

100 $\mu\text{g/ml}$ desnaturalizado, ADN de esperma de salmón fragmentado

0055 La hibridación se lleva a cabo a 68°C. La membrana de nylon, con el ácido nucleico inmovilizado, puede ser lavado a 68°C en 1 x SSC o, por alta rigurosidad, 0.1 x SSC.

25 0056 Puede prepararse 20 x SSC de la siguiente manera. Se disuelve 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio en 800 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 7.0 con unas gotas de solución 10 N de NaOH. Se ajusta el volumen a 1 litro con H₂O. Se dispensa en alícuotas. Se esteriliza en autoclave.

0057 Un ejemplo de una solución de hibridación típica cuando un ácido nucleico es inmovilizado en una membrana de nylon y la sonda es un oligonucleótido de entre 15 y 50 bases es:

3.0 M cloruro de trimetilamonio (TMAC1)

30 0.01 M fosfato de sodio (pH 6.8)

1 mM EDTA (pH 7.6)

0.5% SDS

100 $\mu\text{g/ml}$ desnaturalizado, ADN de esperma de salmón fragmentado

0.1% leche en polvo descremada

35 0058 La temperatura óptima para la hibridación es usualmente elegida como 5°C por debajo del T_i para la longitud de cadena dada. T_i es la temperatura de fusión irreversible del híbrido formado entre la sonda y su secuencia diana. Jacobs *et al* (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 4637 discute determinar T_is. La temperatura de hibridación recomendada para 17-meros en 3 M TMAC1 es 48-50°C; para 19-meros, es 55-57°C; y para 20-meros, es 58-66°C.

40 0059 Por "ácido nucleico que hibrida selectivamente" se incluye también ácidos nucleicos que amplificarán el ADN de dicha región del ADN humano por cualquiera de los bien conocidos sistemas de amplificación tales como los descritos en más detalle a continuación, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Condiciones adecuadas para la amplificación PCR incluyen la amplificación en un adecuado tampón de amplificación 1 x:

tampón de amplificación 10 x es 500 mM KCl; 100mM

Tris.Cl (pH 8.3 a temperatura ambiente); 15 mM MgCl₂;

45 0.1% gelatina.

0060 Un agente o procedimiento adecuado de desnaturalización (tales como calentar a 95°C) es usado con el fin de separar las hebras de ADN de doble cadena.

0061 Adecuadamente, la parte de recocido de la amplificación es entre 37°C y 60°C, preferentemente 50°C.

0062 Aunque el ácido nucleico que es útil en los métodos de la invención puede ser ARN o ADN, se prefiere ADN. Aunque el ácido nucleico que es útil en los métodos de la invención puede ser bicatenario o monocatenario, es preferido el ácido nucleico monocatenario bajo algunas circunstancias tales como en reacciones de amplificación del ácido nucleico.

5 0063 El ácido nucleico que es útil en los métodos de la invención puede ser muy grande, como 100 kb, si es bicatenario. Por ejemplo, tales ácidos nucleicos grandes son útiles como una plantilla para la fabricación de sondas para su uso en el análisis FISH (hibridación fluorescente *in situ*). Normalmente, las sondas etiquetadas usadas en FISH son generalmente hechos por traslación por muescas o cebado al azar a partir de un clon genómico (tal como un inserto en un clon PAC adecuado). Una vez hechas estas sondas son de unos 50-1000 nucleótidos de longitud.
10 Se usa más preferiblemente como una plantilla para traslación de muesca o extensión del cebador aleatorio como se describe arriba. Sin embargo, para ciertos diagnósticos, propósitos de sondeo o de amplificación, es preferido que el ácido nucleico tenga menos de 10 000, más preferiblemente menos de 1000, más preferiblemente aún de 10 a 100, y con más preferencia de 15 a 30 pares de bases (si el ácido nucleico es bicatenario) o bases (si el ácido nucleico es monocatenario). Como se describe más detalladamente a continuación, son particularmente preferidos cebadores de ADN monocatenarios, adecuados para su uso en una reacción en cadena de la polimerasa.

0064 El ácido nucleico para uso en los métodos de la invención es un ácido nucleico capaz de hibridar al gen OBCAM o NTM o al ADNc OBCAM o NTM o ARNm o un mutante del mismo. Los fragmentos y variantes de este gen, y ADNsc derivables a partir del ARNm codificado por el gen son también ácidos nucleicos preferidos para su uso en los métodos de la invención.

20 0065 Claramente los ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen en si o variantes del mismo son particularmente útiles. Los fragmentos del gen son preferidos para su uso en el método de la invención. Los fragmentos pueden estar hechos por degradación enzimática o química de un fragmento más grande, o pueden ser sintetizados químicamente. Por "gen" se incluye no sólo los intrones y exones, sino también las regiones reguladoras relacionadas con, y físicamente cerca de, los intrones y exones, particularmente los exones 5' al extremo 5'-most.
25 Por "físicamente cerca" se entiende dentro de 50 kb, preferible dentro de 10 kb, preferiblemente dentro de 5 kb y aun más preferiblemente dentro de 2 kb. Se cree que el promotor básico y los elementos reguladores del gen OBCAM y NTM probablemente se encuentran a 200-400 pares de bases desde el sitio de inicio transcripcional o inicio de las regiones codificantes. Sin embargo, los elementos específicos de tejido o inducibles pueden estar a 50 kb en cualquier dirección de las regiones codificantes (exones) o pueden estar en los intrones. Tales elementos de los genes OBCAM o NTM pueden ser identificados o ubicados por sitios de hipersensibilidad de ADNs (detectados en Southern blots) que indican sitios de unión de proteína reguladora.

0066 Alternativamente, se pueden generar constructos indicadores utilizando el ADN genómico aguas arriba (e.d. aguas arriba del exón 5'-most) y, por ejemplo, β -galactosidasa como una enzima indicadora. Supresiones en serie y técnicas de huella pueden también usarse para identificar las regiones reguladoras.

35 0067 La isla NTM CpG se superpone con el sitio de inicio de traslación ATG y tiene unos 1.1 kb de longitud. La isla OBCAM CpG está aproximadamente 500bp aguas arriba del sitio de inicio de traslación y tiene unos 900bp de longitud. Al investigar el estado de metilación del gen NTM o OBCAM (como se discute más adelante), pueden ser particularmente útiles los ácidos nucleicos que hibridan selectivamente a la isla CpG del gen seleccionado

40 0068 Por "fragmento" de un gen se incluye cualquier porción del gen de al menos 15 nucleótidos en longitud (ya sea monocatenario o bicatenario) pero más preferiblemente el fragmento es de al menos 20 nucleótidos de longitud, más preferiblemente al menos 50 nucleótidos de longitud y puede ser al menos de 100 nucleótidos en longitud o puede ser al menos de 500 nucleótidos de longitud: Preferiblemente el fragmento no es de más de 50 kb y, más preferible, no más de 100 kb.

45 0069 Por "variante" de un gen se incluye específicamente un ADNc, ya sea de longitud parcial o total, o ya sea copiado de cualquier variante de empalme del ARNm. También se incluye específicamente un ácido nucleico en el que, comparado al gen natural, están presentes sustituciones de nucleótidos (incluyendo inversiones), inserciones y supresiones ya sea en el gen o un fragmento del mismo o en un ADNc. Ambos variantes y fragmentos se seleccionarán según sus fines previstos; para propósitos de sondeo, amplificación, o diagnóstico, generalmente se requieren fragmentos más cortos pero con un grado mayor de identidad de secuencia (ej., al menos 80%, 90%, 95% o 99%). Un ejemplo de una variante del gen OBCAM (y correspondiente ADNc) incluye el mutante con una sustitución citosina a guanina en el nucleótido 334 como se numera en la Figura 7 y muestra en la Figura 18.

0070 Es particularmente preferido si el ácido nucleico para su uso en los métodos de la invención es un oligonucleótido cebador que puede usarse para amplificar una parte del gen o ADNc.

55 0071 Los ácidos nucleicos preferidos para uso en la invención son los que hibridan selectivamente al gen OBCAM o NTM o ADNc y no hibridan a otros genes o ADNsc. Tales ácidos nucleicos que hibridan selectivamente pueden ser fácilmente obtenidos, por ejemplo, por referencia a si hibridan o no hibridan al ADNc OBCAM o NTM como se describe en las Figuras 7 y 8 o 9 respectivamente.

0072 Preferiblemente, los métodos del primer y segundo aspecto son usados para detectar la presencia o ausencia de una mutación en cualquiera de dichos genes o ADNc. En otras palabras, si un gen variante o ADNc está presente. Más preferiblemente, se determina si el nucleótido correspondiente al nucleótido 334 del OBCAM como se numera en la Figura 7 en el ácido nucleico del paciente es el mismo que en la Figura 7, o no. Tal determinación se puede hacer usando un polinucleótido según la invención y como se describe a continuación.

0073 Los métodos son adecuados respecto a cualquier cáncer pero es preferido si el cáncer es cáncer de ovario, colorrectal, u otros adenocarcinomas comunes como el cáncer de mama, pulmón, próstata y cuello uterino. Adicionalmente, los métodos relacionados a OBCAM pueden también ser adecuados para la leucemia y métodos relacionados a NTM adecuados para el páncreas y leucemia. Los métodos son particularmente adecuados con respecto al cáncer de ovario o colon; los métodos son los más adecuados con relación al cáncer de ovario cuando el método implica un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o ADNc o un polinucleótido que comprende el marcador D11S4085, y son los más adecuados con respecto al cáncer colorrectal cuando el método implica un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen NTM o ADNc. Se apreciará que los métodos de la invención incluyen métodos de pronóstico y métodos que ayudan al diagnóstico. También se apreciará que los métodos de la invención son útiles para el médico o cirujano para determinar un camino de gestión o tratamiento del paciente.

0074 El paciente puede ser cualquier individuo en el que se ha encontrado o se sospecha un cáncer o tumor. Los pacientes particularmente preferidos son los que tienen una masa pélvica identificada por ultrasonido y/o que tienen ligeramente elevados los niveles de CA125. CA125 es un glicopéptido de suero recientemente identificado como Muc16 y es un marcador tumoral, no sólo para el cáncer de ovario, pero principalmente utilizado en el manejo clínico de los tumores de ovario.

0075 Aunque se cree que cualquier muestra que contiene ácido nucleico derivado del paciente es útil en los métodos de la invención, ya que pueden ocurrir mutaciones en el gen OBCAM o NTM en cánceres familiares y no sólo en cánceres esporádicos, es, sin embargo, preferido si el ácido nucleico se deriva de una muestra del tejido en el que se sospecha de cáncer o en el que el cáncer puede ser o se ha encontrado. Por ejemplo, si el tejido en el que se sospecha de cáncer o en el que el cáncer puede ser o ha sido encontrado es el ovario, se prefiere si la muestra que contiene ácido nucleico se deriva del ovario del paciente. Las muestras de ovario se pueden obtener por excisión quirúrgica, laparoscopia y biopsia, endoscopia y biopsia, y la biopsia guiada por imagen. La imagen puede ser generada por ultrasonido o anticuerpos etiquetados con tecnecio-99 o fragmentos de anticuerpo que se unen o ubican selectivamente en el ovario. El bien conocido anticuerpo monoclonal HMFG1 es un anticuerpo adecuado para la representación de imagen del cáncer de ovario. El fluido ascítico/ cavidad peritoneal, y muestras peritoneales, se pueden obtener por cirugía o laparoscopia. De forma similar, si el tejido en el que el cáncer se sospecha o en el que el cáncer puede ser o ha sido encontrado es el colon, se prefiere si la muestra que contiene ácido nucleico se deriva del colon del paciente; y así sucesivamente. Las muestras de colon se pueden obtener por colonoscopia.

0076 Otras muestras en las que puede ser beneficioso para analizar OBCAM o NTM incluyen ganglios linfáticos, sangre, suero y sitios potenciales o reales de metástasis, por ejemplo, hueso. Se prefiere en particular que la muestra sea sangre o ganglios linfáticos, por ejemplo para diagnóstico temprano de la enfermedad oculta, por ejemplo, cáncer de ovario asintomático.

0077 La muestra puede ser derivada directamente del paciente, por ejemplo, mediante biopsia del tejido, o puede ser derivado del paciente de un sitio lejano al tejido, por ejemplo porque las células del tejido han migrado del tejido a otras partes del cuerpo. Alternativamente, la muestra puede ser derivada indirectamente del paciente en el sentido de que, por ejemplo, el tejido o células del mismo pueden ser cultivados *in vitro*, cultivados en un modelo de xenoinjerto; o la muestra de ácido nucleico puede ser una que ha sido replicada (ya sea *in vitro* o *in vivo*) del ácido nucleico desde la fuente original del paciente. Así, aunque el ácido nucleico derivado del paciente puede haber estado físicamente dentro del paciente, también puede haber sido copiado del ácido nucleico que estaba físicamente dentro del paciente. El tejido del tumor puede ser tomado del tumor primario o de la metástasis.

0078 Se apreciará que un método útil de la invención incluye el análisis de mutaciones en, o la detección de la presencia o ausencia de, el gen OBCAM o NTM en cualquier muestra adecuada. La muestra puede adecuadamente ser una muestra recién obtenida del paciente, o la muestra puede ser una muestra histórica, por ejemplo una muestra guardada en una biblioteca de muestras.

0079 Convencionalmente, el ácido nucleico capaz de hibridar selectivamente a dicho ADN humano y que es usado en los métodos de la invención comprende también una etiqueta detectable.

0080 Por "etiqueta detectable" se incluye cualquier etiqueta radioactiva conveniente tales como ^{32}P ^{33}P o ^{35}S que puede fácilmente ser incorporada dentro de una molécula de ácido nucleico usando métodos bien conocidos; se incluye también cualquier etiqueta quimioluminiscente o fluorescente conveniente que puede fácilmente ser incorporada en un ácido nucleico. En adición el termino "etiqueta detectable" también incluye una fracción que puede detectarse en virtud de unión a otra fracción (tal como la biotina que puede ser detectada mediante la unión a estreptavidina); y una fracción, como una enzima, que puede ser detectada en virtud de su capacidad para convertir

- un compuesto incoloro en un compuesto coloreado, o *viceversa* (por ejemplo, fosfatasa alcalina puede convertir *o*-nitrofenilfosfato incoloro en *o*-nitrofenol coloreado). Convenientemente, la sonda de ácido nucleico puede ocupar una cierta posición en un ensayo fijado y puede determinarse si el ácido nucleico hibrida a dicha región del ADN humano por referencia a la posición de la hibridación en el ensayo fijado. La etiqueta detectable puede también ser un par fluoróforo-apagador como se describe en Tyagi y Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14, 303-308.
- 5
- 0081 Se apreciará que los métodos ya mencionados pueden usarse para la detección presintomática de un paciente que está en un grupo de riesgo por cáncer. Los pacientes con alto riesgo para la detección incluyen pacientes mayores de 50 años de edad o pacientes que portan un gen que da lugar a una mayor susceptibilidad (ej., versiones que predisponen de BRCA1, BRCA2 o p53); pacientes con una historia familiar de cáncer de mama/ovario; pacientes con hermanos afectados, mujeres nulíparas; y mujeres que tienen un largo intervalo entre la menarquia y la menopausia. Similarmente, los métodos pueden usarse para la clasificación patológica de tumores tales como tumores de ovario o tumores de colon.
- 10
- 0082 Convencionalmente, en los métodos del primer, segundo y tercer aspectos de la invención el ácido nucleico que es capaz de dicha hibridación selectiva (ya sea etiquetado con una etiqueta detectable o no) es contactado con un ácido nucleico derivado del paciente bajo condiciones de hibridación. Condiciones adecuadas de hibridación incluyen las descritas arriba.
- 15
- 0083 Se prefiere que si la muestra que contiene el ácido nucleico derivado del paciente no es una muestra sustancialmente pura del tejido o tipo de célula en cuestión que la muestra sea enriquecida en dicho tejido o células. Por ejemplo, el enriquecimiento de las células de ovario en una muestra tal como una muestra de sangre puede lograrse usando, por ejemplo, métodos de clasificación celular, tales como clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) usando un anticuerpo selectivo de células de ovario, o al menos un anticuerpo que es selectivo para una célula epitelial. Por ejemplo. Cam 5.2 anticitoqueratina 7/8, de Becton Dickinson, 2350 Qume Drive, San José, California, EE.UU., puede ser útil.
- 20
- 0084 En una realización preferida, la invención proporciona un análisis de sangre diagnóstico para la enfermedad temprana de ovario u otros tipos de tumores. El ensayo de sangre permite analizar pequeños números de células tumorales circulantes respecto al OBCAM y/o NTM, por ejemplo respecto al estado de metilación de uno o ambos de estos genes.
- 25
- 0085 La fuente de dicha muestra también incluye material de biopsia como se discutió anteriormente y muestras de tumores, incluyendo también especímenes fijos montado en parafina, así como tejido fresco o congelado. La muestra de ácido nucleico del paciente puede ser procesado antes del contacto con el ácido nucleico que hibrida selectivamente a OBCAM o NTM. Por ejemplo, la muestra de ácido nucleico del paciente puede ser tratada por amplificación selectiva, transcripción inversa, inmovilización (tales como inmovilización específica de secuencia), o incorporación de un marcador detectable.
- 30
- 0086 Es particularmente preferido si los métodos de la invención incluyen determinar metilación de, mutaciones en, o la detección de la presencia o ausencia de, el gen OBCAM o NTM.
- 35
- 0087 Los métodos del primer o segundo aspectos de la invención pueden implicar la secuenciación de ADN en uno o más de las posiciones relevantes dentro de la región relevante, incluyendo la secuenciación directa; secuenciación directa de exones amplificados por PCR; hibridación diferencial de una sonda oligonucleótido diseñada para hibridar en las posiciones relevantes dentro de la región relevante (convencionalmente este uso inmoviliza sondas de oligonucleótidos en los llamados, sistemas "chip" que son bien conocidos en la técnica); electroforesis en gel desnaturizante tras la digestión con una enzima de restricción apropiada, preferentemente después de amplificación de regiones relevantes de ADN; análisis de secuencia de la nucleasa S1; electroforesis en gel no desnaturizante, preferiblemente tras la amplificación de las regiones de ADN relevantes; ensayos RFLP convencionales (polimorfismo de restricción de longitud de fragmentos); análisis heterodúplex; amplificación selectiva de ADN usando oligonucleótidos; hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de cromosomas de interfase; ARMS-PCR (PCR de Amplificación de Sistema Refractario de Mutación) para mutaciones específicas; escisión en los sitios de desajuste en ácidos nucleicos hibridados (siendo la escisión química o enzimática); polimorfismo SSCP conformacional monocatenario o DGGE (electroforesis en gel gradiente discontinuo o desnaturizante); análisis para detectar el desajuste en ADN amplificado por PCR normal/mutante recocado; y ensayo de truncamiento de proteína (traslación y transcripción de exones- si una mutación introduce un codón de parada resultará un producto de proteína truncada). Otros métodos pueden ser empleados tales como la detección de cambios en la estructura secundaria del ADN monocatenario que resulta de los cambios en la secuencia primaria, por ejemplo, usando la enzima I de escisión. Este sistema está disponible comercialmente en GibcoBRL, Life Technologies, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA4 9RF, Escocia.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 0088 Se apreciará que los métodos de la invención pueden también llevarse a cabo en "chips de ADN". Tales "chips" se describen en US 5,445,934 (Affymetrix; probe arrays), WO 96/31622 (Oxford, probe array plus ligase or polymerase extension), y WO 95/22058 (Affymax; fluorescently marked targets bind to oligomer substrate, and location in array detected).

0089 Métodos detallados de detección de mutación se describen en "Laboratory protocols for mutation detection" 1996, ed. Landegren, Oxford University Press en nombre de HUGO (Organización del Genoma Humano).

0090 Se prefiere si se usa RFLP para la detección de grandes supresiones o inserciones ≥ 500 bp). Pueden usarse Southern blots para este método de la invención.

5 0091 La amplificación PCR de regiones menores (máximo 300bp) para detectar pequeños cambios mayores que 3-4 bp inserciones o deleciones puede ser preferida. La secuencia amplificada puede ser analizada en un gel de secuenciación, y pueden visualizarse pequeños cambios (tamaño mínimo 3-4 bp). Se diseñan cebadores adecuados como aquí se describe.

10 0092 En adición, utilizando sea el análisis Southern blot o PCR pueden detectarse sitios variantes de enzimas de restricción. Por ejemplo, para analizar sitios variantes en la digestión enzimática de restricción de ADN genómico, electroforesis en gel, Southern Blot, y sonda específica de hibridación (por ejemplo cualquier fragmento adecuado derivado de ADNc o gen OBCAM o NTM).

15 0093 Por ejemplo, para analizar sitios variantes que usan amplificación de ADN por PCR, digestión con enzimas de restricción, detección de gel por bromuro de etidio, tinción de plata o incorporación de radionucleótido o cebador fluorescente en el PCR.

0094 Otros métodos adecuados incluyen el desarrollo de oligonucleótidos específicos de alelo (ASOs) para sucesos mutacionales específicos. Métodos similares se usan sobre ARN y ADNc para el tejido adecuado, tales como el tejido de ovario o colon.

20 0095 Mientras es útil para detectar mutaciones en cualquier parte del gen OBCAM y/o NTM, se prefiere si las mutaciones se detectan en los exones del gen y es más preferido si las mutaciones son unas que cambian el sentido de codificación. La detección de estas mutaciones es un aspecto preferido de la invención. Un ejemplo de una mutación de citosina a guanina en el exón 2 (nucleótido 334 como se numera en la Entrada del GenBank No NM_002545) del gen OBCAM se describe en el Ejemplo 5.

25 0096 Los métodos de la invención también incluyen la comprobación de pérdida de heterocigosidad (LOH; muestra una copia pérdida). LOH puede ser un marcador suficiente para diagnóstico; buscar mutación/pérdida del segundo alelo puede no ser necesario. LOH del gen puede detectarse usando polimorfismos en la secuencia de codificación, e intrones, del gen. LOH en una célula tumoral, de cualquier fuente, comparado a la sangre es útil como una herramienta de diagnóstico, ej., puede mostrar que el tumor ha progresado y requiere un tratamiento más riguroso.

30 0097 Ácidos nucleicos particularmente preferidos para uso en los métodos antes mencionados de la invención son los seleccionados del grupo que consiste de cebadores adecuados para amplificar ácido nucleico.

35 0098 Convenientemente, los cebadores se seleccionan del grupo consistente de cebadores que hibridan a las secuencias de nucleótidos mostradas en cualquiera de las Figuras que muestran al gen OBCAM o NTM o secuencias de ADNc. Se prefiere particularmente si los cebadores hibridan a los intrones del gen OBCAM o NTM o si los cebadores son unos que cebarán la síntesis del ADN desde el gen OBCAM o NTM o ADNc pero no desde otros genes o ADNcs. Las fronteras intrón-exón del gen OBCAM se muestran en la Figura 16.

0099 Cebadores que son adecuados para uso en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al (1988) Ciencia 239, 487-491) son preferidos. Cebadores PCR preferidos pueden tener las siguientes propiedades:

Es bien sabido que la secuencia en el extremo 5' del oligonucleótido no necesita encajar con la secuencia objetivo a amplificar.

40 0100 Es usual que los cebadores PCR no contengan ninguna estructura complementaria entre si superior a 2 bases, especialmente en sus extremos 3', ya que esta característica puede promover la formación de un producto artefactual llamado "dímero cebador". Cuando los extremos 3' de los dos cebadores hibridan, forman un complejo "plantilla cebada", y la extensión del cebador da lugar a un producto dúplex corto llamado "dímero cebador".

45 0101 La estructura secundaria interna se debe evitar en los cebadores. Para PCR simétrica, se recomienda a menudo un 40-60% de contenido de G + C para ambos cebadores sin largos segmentos de cualquier base. Los cálculos clásicos de temperatura de fusión utilizados en conjunción con estudios de hibridación de sonda de ADN a menudo predicen que un cebador dado debe recocer a una temperatura específica o que la temperatura de extensión de 72°C disociará el híbrido cebador/plantilla antes de tiempo. En la práctica, los híbridos son más eficaces en el proceso de PCR que lo que generalmente se predice por simples cálculos de T_m .

50 0102 Las temperaturas óptimas de recocado pueden determinarse empíricamente y pueden ser mayores que la prevista *Taq* ADN polimerasa tiene actividad en la región 37-55°C, de modo que la extensión del cebador tendrá lugar en el paso de recocado y el híbrido se estabilizará. Las concentraciones de los cebadores son iguales en PCR convencional (simétrica) y, normalmente, dentro del intervalo 0.1 – a 1- μ M.

- 0103 Cualquiera de los protocolos de amplificación del ácido nucleico puede usarse en el método de la invención incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa, QB replicasa y la reacción en cadena de ligasa. También, puede usarse NASBA (amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico) también llamada 3SR, como se describe en Compton (1991) Nature 350, 91-92 y AIDS (1993), Vol 7 (Suppl 2), S108 o SDA (amplificación de desplazamiento de hebra) puede usarse como se describe en Walker et al (1992) Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696. La reacción en cadena de la polimerasa es particularmente preferida debido a su simplicidad.
- 0104 Cuando un par de ácidos nucleicos adecuados de la invención son usados en una PCR es conveniente detectar el producto por electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Como alternativa para detectar el producto de ADN, la amplificación usando electroforesis en gel agarosa y tinción con bromuro de etidio del ADN, es conveniente usar un oligonucleótido etiquetado capaz de hibridar al ADN amplificado como una sonda. Cuando la amplificación es por una PCR la sonda de oligonucleótido hibrida a la secuencia intercebador como se define por los dos cebadores. La sonda de oligonucleótido es preferentemente entre 10 y 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. La sonda puede ser etiquetada con un radionúclido tal como ³²P, ³³P y ³⁵S usando técnicas estándar, o puede ser etiquetada con un colorante fluorescente. Cuando la sonda de oligonucleótido es etiquetada con fluorescencia, el producto de ADN amplificado puede detectarse en solución (ver por ejemplo Balaguer et al (1991) "La cuantificación de las secuencias de ADN obtenidas por reacción en cadena de la polimerasa mediante una bioluminiscencia adsorbente" Anal. Biochem. 195, 105-110 y Dilesare et al (1993) "Un sistema de detección de la sensibilidad basado en electroquimioluminiscencia para la cuantificación del producto PCR automatizada" Bio Techniques 15, 152-157.
- 0105 Los productos PCR pueden también detectarse usando una sonda que puede tener un par fluoróforo-apagador o pueden unirse a un soporte sólido o pueden tener una etiqueta de biotina o pueden detectarse usando una combinación de una sonda de captura y una sonda detectora.
- 0106 Pares fluoróforo-apagador son particularmente adecuados para las mediciones cuantitativas de reacciones PCR (ej., RT-PCR). Puede también usarse polarización fluorescente usando una sonda adecuada para detectar productos PCR.
- 0107 Pueden sintetizarse cebadores oligonucleótidos usando métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo usando química de fosforamidita de fase sólida.
- 0108 La presente invención proporciona el uso de un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM o a un polinucleótido que comprende el microsatélite D11S4085 (como se describe arriba), o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc OBCAM o NTM o un alelo mutante del mismo, o sus complementos en un método de diagnosticar cáncer o pronosticar cáncer o determinar susceptibilidad a cáncer, o en la fabricación de un reactivo para llevar a cabo estos métodos.
- 0109 También, la presente invención proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de, o mutación en, dicho gen OBCAM y/o NTM. Preferentemente, el método usa una muestra adecuada de un paciente. Un ejemplo de una mutación adecuada incluye la mutación citosina a guanina en el nucleótido 334 en el OBCAM, como se describe en el Ejemplo 5 y se muestra en la Figura 18.
- 0110 Los métodos de la invención incluyen la detección de mutaciones en el gen OBCAM y/o NTM.
- 0111 Los métodos de la invención puede hacer uso de una diferencia en los sitios de escisión de enzimas de restricción causados por mutación. Un gel no desnaturizante puede usarse para detectar diferentes longitudes de fragmentos que resultan de la digestión con una enzima de restricción apropiada.
- 0112 Una "enzima de restricción apropiada" es una que reconocerá y cortará la secuencia de tipo salvaje y no la secuencia mutada o *viceversa*. La secuencia que es reconocida y cortada por la enzima de restricción (o no, según sea el caso) puede estar presente como una consecuencia de la mutación o puede ser introducida en el alelo normal o mutante usando oligonucleótidos no emparejados en la reacción PCR. Es conveniente si la enzima corta el ADN con poca frecuencia, en otras palabras si reconoce una secuencia que sucede sólo en raras ocasiones.
- 0113 En otro método, se usan un par de cebadores PCR que encajan (e.d. hibridan a) ya sea con el genotipo de tipo salvaje o el genotipo mutante pero no ambos. Si el ADN amplificado es producido entonces indicará el genotipo (y por tanto fenotipo) de tipo salvaje o mutante. Sin embargo, este método se basa en parte en un resultado negativo (e.d. la ausencia del ADN amplificado) que podría ser debida a un fallo técnico. Por lo tanto puede ser menos fiable y/o requiere experimentos de control adicionales. En una realización preferida, uno del par de cebadores hibrida selectivamente a una porción del gen OBCAM que incluye el nucleótido 334 como se numera en la Figura 7, o la porción correspondiente del ADNc OBCAM.
- 0114 Un método preferible emplea cebadores PCR similares pero, así como hibridan sólo una de las secuencias de tipo salvaje o mutante, introducen un sitio de restricción que no esté allí en cualquiera de las secuencias de tipo salvaje o mutante.

0115 Se apreciará que el ácido nucleico que hibrida selectivamente como se dijo puede hibridar selectivamente a los OBCAM y NTM porque estos dos genes se encuentran dentro de la proximidad relativamente cercana entre sí en el cromosoma 11. Como se muestra en la Figura 1, los dos genes están probablemente adyacentes entre sí.

5 0116 Los ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen OBCAM y/o NTM o al ADNc OBCAM y/o NTM son útiles para una serie de propósitos.

10 0117 Pueden usarse en hibridación Southern al ADN genómico y en el método de protección de RNasa para detectar mutaciones puntuales ya discutidos anteriormente. Las sondas pueden usarse para detectar productos de amplificación PCR. Pueden también usarse para detectar desparejamientos con el gen OBCAM o NTM o ARNm en una muestra usando otras técnicas. Los desparejamientos pueden detectarse usando bien enzimas (ej., nucleasa S1 o resolvasa), productos químicos (ej., hidroxilamina o tetróxido de osmio y piperidina), o cambios en la movilidad electroforética de los híbridos desparejados comparados con los híbridos totalmente emparejados. Estas técnicas son conocidas en la materia. Generalmente, las sondas son complementarias a las secuencias codificantes del gen OBCAM y/o NTM aunque también se contemplan sondas a ciertos intrones. Una batería de sondas de ácido nucleico puede usarse para componer un kit para detectar pérdida de o mutación en el gen OBCAM y/o NTM de tipo salvaje. El kit permite la hibridación al gen OBCAM y/o NTM en su totalidad. Las sondas pueden superponerse entre sí o ser contiguas. En una realización preferida, la sonda detecta una porción del gen OBCAM (por ejemplo, después de la amplificación como se describe arriba), que incluye el nucleótido 334 como se numera en la Figura 7, o el nucleótido correspondiente en el ADNc OBCAM.

20 0118 Si una ribosonda es usada para detectar emparejamientos erróneos con ARNm, es complementaria al ARNm del gen humano OBCAM o NTM. La ribosonda por tanto es una sonda antisentido porque no codifica para la proteína codificada por el gen OBCAM o NTM debido a que es de polaridad opuesta a la hebra de sentido. La ribosonda generalmente será etiquetada, por ejemplo, etiquetada radioactivamente lo que puede lograrse por cualquier medio conocido en la materia. Si la ribosonda es usada para detectar errores de emparejamiento con el ADN puede ser de cualquier polaridad, sentido o antisentido. Similarmente, las sondas de ADN también pueden usarse para detectar errores de emparejamiento.

25 0119 Sondas de ácido nucleico pueden también ser complementarias a los alelos mutantes de los genes OBCAM o NTM. Estas son útiles para detectar mutaciones similares en otros pacientes en base a la hibridación en lugar de a errores de emparejamiento. Como se menciona anteriormente, las sondas del gen OBCAM y NTM pueden también usarse en hibridaciones Southern a ADN genómico para detectar los cambios cromosómicos groseros tales como deleciones e inserciones.

30 0120 Según el método de diagnóstico y pronóstico de la presente invención, puede detectarse pérdida de, o modificación de, la función del gen de tipo salvaje. La pérdida puede ser debida a cualquier suceso de inserción, deleción, o de mutación puntual. Si solo se muta un único alelo, puede estar indicado un estado neoplásico temprano. Sin embargo, si ambos alelos están mutados entonces se indica un estado maligno o se indica una mayor probabilidad de malignidad. La búsqueda de tales mutaciones por tanto proporciona la información de diagnóstico y pronóstico. Un alelo de gen OBCAM o NTM que no es eliminado (ej., en el cromosoma hermano de un cromosoma que lleva una deleción de gen) puede ser analizado para otras mutaciones, tales como inserciones, pequeñas deleciones, y mutaciones puntuales. Creemos que la detección de una mutación en una copia única (alelo) del gen es útil. Por ejemplo, la mutación del gen OBCAM en la citosina 334 como se numera en el GenBank Número de Acceso NM_002545 se observa como un suceso temprano en el desarrollo del cáncer de ovario. La pérdida del segundo alelo puede ser necesaria para la carcinogénesis. Si la segunda copia se perdió de forma rutinaria por un mecanismo grosero, esta podría ser un suceso útil de detectar. Algunas mutaciones del gen pueden tener un efecto negativo dominante en el alelo restante. Las mutaciones que conducen a productos de gen no funcionales pueden también conducir a un estado maligno o una mayor probabilidad de malignidad. Sucesos mutacionales (tales como mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y similares) puede ocurrir en regiones reguladoras, tales como en la promotora del gen, llevando a la pérdida o disminución de expresión del ARNm. Las mutaciones puntuales pueden también suprimir el procesamiento adecuado del ARN, llevando a la pérdida de o alteración en la expresión del producto gen OBCAM o NTM o a que el polipéptido OBCAM o NTM sea no funcional o tenga una expresión alterada. Se prefiere si la cantidad de ARNm OBCAM o NTM es una muestra de ensayo es cuantificada y comparada con la presente en una muestra de control. También es preferido si los patrones de empalme o estructura del ARNm OBCAM o NTM en una muestra de ensayo se determinan y comparan con los presentes en una muestra de control. Sin embargo, la detección de la expresión OBCAM o NTM es menos preferida.

50 0121 La cantidad de ARNm OBCAM o NTM se determina adecuadamente por unidad de masa de tejido de muestra o por el número de unidades de células de muestra y se compara esto a la masa unitaria de tejido normal conocido o por número de unidades de células normales. El ARN puede ser cuantificado usando, por ejemplo, Northern blot o RT-PCR cuantitativa.

55 0122 Los genes tienen dos alelos cada uno, y se apreciará que las alteraciones de ambos alelos pueden tener un mayor efecto sobre el comportamiento celular que la alteración de uno. Se espera que al menos un alelo mutante tenga mutaciones que resulten en una secuencia de codificación alterada. Las modificaciones del segundo alelo,

distintas de la secuencia codificante, pueden incluir la delección total o parcial del gen, y la pérdida o mutación de regiones reguladoras.

5 0123 Como antes se mencionó, puede ser útil para determinar la pérdida o inactivación de un alelo de OBCAM o NTM, ya que la pérdida o inactivación de OBCAM puede ser un suceso más temprano que la pérdida o inactivación en NTM, y determinar la presencia o ausencia de pérdida o inactivación en cualquiera de los dos puede ser informativa en cuanto a la etapa de progresión del cáncer. Por ejemplo, un paciente en el que una delección (u otras pérdidas o inactivaciones) se identifica en el OBCAM, pero no en el NTM, puede tener una etapa más temprana de cáncer que un paciente en el que se identifica una pérdida o inactivación en el OBCAM y NTM. Por ejemplo, se cree que un subsecuente NTM LOH ocurre casi exclusivamente en casos con OBCAM LOH, y que NTM LOH casi nunca ocurre solo. Puede haber una correlación con una etapa superior, o grado, o supervivencia adversa. Para cáncer colorrectal, las tasas de OBCAM y LOH neutrimin se considera que son aproximadamente unos 32% y 50%, respectivamente.

15 0124 Dado que la progresión de un cáncer o una condición precancerosa puede ser indicada mediante la detección de pérdida o inactivación en NTM, en adición a la pérdida o inactivación en OBCAM, entonces puede ser útil llevar a cabo el método del primer o segundo aspecto de la invención más de una vez en el mismo paciente.

0125 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para determinar la progresión de una enfermedad cancerosa, por ejemplo la progresión de un tumor, en un paciente comprendiendo los pasos de

- (i) obtener una muestra de ácido nucleico del paciente en la que el gen OBCAM del paciente se ha perdido o inactivado;
- 20 (ii) contactar dicho ácido nucleico con un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen NTM o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos.

0126 Preferiblemente, la muestra es una muestra del tejido en la que el cáncer se encuentra o sospecha, y más preferiblemente la muestra es del ovario o colon.

25 0127 Tal información en relación a la progresión de, o cambio en, cualquier cáncer o condición precancerosa puede ser útil para el médico en el control de la eficacia de un tratamiento, o en el diagnóstico de la afección exacta o en el pronóstico o predicción de las perspectivas relativas de un resultado particular en un paciente.

30 0128 La invención también incluye los siguientes métodos: transcripción y traslación *in vitro* del gen OBCAM y/o NTM para identificar productos truncados de genes, o propiedades alteradas tales como unión al sustrato; inmunohistoquímica de secciones de tejido para identificar células en las que la expresión de la proteína está reducida/perdida, o su distribución está alterada en las células o en sus superficies; y el uso de RT-PCR usando cebadores aleatorios, antes de la detección de mutaciones en la región como se describe arriba. Se prefiere si se analiza la distribución alterada del polipéptido OBCAM o NTM.

35 0129 Un ejemplo de una mutación que puede ser útil de detectar es la mutación de prolina a arginina en el polipéptido OBCAM que se describe en el Ejemplo 5. El residuo mutado está ubicado dentro del primer dominio de inmunoglobulina, y puede introducir un cambio de conformación en el polipéptido OBCAM. Esta mutación se cree que es un indicador de cáncer, particularmente un indicador temprano del cáncer de ovario. Tal mutación en el polipéptido OBCAM puede detectarse usando un anticuerpo que es capaz de distinguir entre el tipo salvaje (e.d. sin mutación de prolina a arginina) y el mutante. Tales anticuerpos se describen en más detalle a continuación.

40 0130 Los métodos de las invenciones también incluyen la detección o inactivación del gen OBCAM o NTM mediante la investigación de su estado de metilación del ADN. La metilación del ADN del gen OBCAM o NTM puede ser evaluada usando técnicas estándar tales como las descritas en Herman et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9821-9826. La metilación aberrante del gen OBCAM o NTM puede ser asociada con su inactivación.

45 0131 Como se conocerá por el experto en la materia, las regiones de citosinas situadas 5' a guaninas, llamadas islas CpG, están presentes en las regiones reguladoras de muchos genes. Estas citosinas son generalmente no metiladas en circunstancias normales. Sin embargo, estas citosinas se pueden convertir en metiladas dentro de ciertos genes en asociación con el cáncer. Estos genes metilados se pueden reprimir como consecuencia de esto tanto por metilación bialélica o en combinación con un segundo mecanismo de inactivación (por ejemplo LOH o mutación). La PCR Específica de Metilación (MS-PCR) implica desaminación de las citosinas no metiladas en el ADN genómico a uracilo por modificación utilizando bisulfito de sodio. Las citosinas metiladas no se desaminan por bisulfito de sodio. Los cebadores están diseñados de modo que son creados desparejamientos, dependiendo del estado de metilación del ADN genómico bajo investigación. Los experimentos típicos implican dos reacciones PCR usando la misma plantilla. Un experimento usa un cebador que recuce a ADN metilado modificado y el otro diseñado para reconocer a ADN no metilado modificado, produciendo bandas específicas para el ADN metilado y no metilado, respectivamente, mediante Secuenciación MS-PCR de productos MS-PCR confirma además el alcance de metilación de la isla CpG para los genes sometidos a ensayo. Ejemplos de cebadores adecuados se muestran en la Figura 12.

0132 Las siguientes referencias se refieren a MS-PCR: Maekawa et al (2001) Clin Chem Lab Med Feb; 39(2):121-8; Maekawa M et al (1999) Biochem Biophys Res Commun 262(3):671-6.

5 0133 Los Ejemplos muestran que hay una correlación entre el estado de metilación del gen OBCAM o NTM y su nivel de expresión: la regulación a la baja de la expresión de OBCAM o NTM se correlaciona con la metilación de OBCAM o NTM. Por ello, la invención incluye métodos para determinar el nivel de expresión de OBCAM o NTM mediante la evaluación del nivel o grado de metilación del gen OBCAM o NTM, y para usar esta información en diagnosticar o predecir las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente.

0134 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para diagnosticar cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- 10 (i) obtener una muestra que contiene el gen OBCAM y/o NTM del paciente;
- (ii) determinar el grado de metilación del gen OBCAM y/o NTM;
- (iii) comparar el nivel de metilación del gen OBCAM y/o NTM de la muestra del paciente con el nivel de metilación en una muestra de control; y
- 15 (iv) si la muestra del paciente tiene un mayor grado de metilación del gen OBCAM y/o NTM comparada a la muestra de control esto es indicativa de cáncer.

20 0135 Por determinar el grado de metilación se incluye determinar la presencia o ausencia de metilación, por ejemplo la presencia o ausencia de metilación en un residuo o región particular. Así, por ejemplo, la metilación en la región cebadora puede ser detectada por la presencia o ausencia de un producto usando MS-PCR como antes se ha descrito, mientras que la secuenciación del producto puede indicar si o cuántos de los sitios potenciales de metilación en la región de interposición (amplificada) son metilados (y por lo tanto mutados como consecuencia del agente o tratamiento desaminante, por ejemplo el tratamiento de bisulfito).

0136 Si la muestra del paciente muestra metilación del gen OBCAM y/o NTM mientras que la muestra de control muestra ninguna o insignificante metilación del gen OBCAM y/o NTM esto es indicativo de cáncer. Se considera que la metilación puede ocurrir en una forma esencialmente "todo o nada".

25 0137 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para predecir la perspectiva relativa de un resultado particular de un paciente de cáncer que comprende los pasos de

- (i) obtener una muestra que contiene el gen OBCAM y/o NTM del paciente;
- (ii) determinar el grado de metilación del gen OBCAM y/o NTM;
- 30 (iii) comparar el nivel de metilación del gen OBCAM y/o NTM de la muestra del paciente con el nivel de metilación en una muestra de control; y
- (iv) si la muestra del paciente tiene un mayor grado de metilación del gen OBCAM y/o NTM comparada a la muestra de control esto es indicativo de una menor probabilidad de un resultado exitoso.

0138 Por "muestra de control" incluimos el significado de una muestra no tumoral o una muestra que puede ser tumoral pero que está en una etapa anterior de desarrollo que la sospechada en la muestra del paciente.

35 0139 Preferentemente, la muestra de control es una muestra no tumoral. En el caso de la medición de la progresión de un tumor, puede ser preferible si la muestra de control es una muestra tumoral de una etapa más temprana de desarrollo, normalmente del mismo paciente.

40 0140 Una progresión en la enfermedad o tumor puede ser identificada determinando el grado de metilación en el NTM solo, o puede ser identificada determinando el grado de metilación en NTM y OBCAM. Preferentemente, el grado de metilación se determina en NTM y OBCAM. Por "progresión" incluimos un aumento en la probabilidad de que el tumor se vuelva maligno.

0141 A diferencia del cáncer colorrectal que tiene un claro camino de progresión, los tumores de ovario no tienen un indicador premaligno/maligno que sea detectable. Por lo tanto, la progresión de la enfermedad del ovario refiere a un tumor crecientemente agresivo con, por ejemplo, pronóstico disminuido o propagación local aumentada.

45 0142 LOH parece estar temporalmente separado con OBCAM LOH antes que con NTM LOH. La metilación puede también ser temporalmente definida para OBCAM y NTM pero es más común que la metilación, si se produce, se produzca en ambos genes al mismo tiempo, como se describe en el Ejemplo 1.

50 0143 La identificación de cualquier metilación en NTM, o de metilación adicional en NTM donde previamente sólo se metiló OBCAM, puede indicar una progresión en la enfermedad o tumor desde la etapa en la que no se identificó metilación en NTM.

0144 Por ello, otro aspecto adicional de la invención proporciona un método para determinar la progresión de una enfermedad cancerosa, por ejemplo la progresión de un tumor, en un paciente que comprende los pasos de

- (i) obtener una muestra del paciente que contiene el gen NTM en la que el gen OBCAM del paciente ha sido metilado;

- (ii) determinar el grado de metilación del gen NTM;
- (iii) comparar el nivel de metilación del gen NTM de la muestra del paciente con el nivel de metilación en una muestra de control; y
- (iv) si el nivel de metilación de NTM de la muestra del paciente se incrementa en comparación con la muestra de control, esto es indicativo de una progresión en la enfermedad o tumor.

5 0145 El tumor puede ser benigno o maligno. Como se describe arriba en relación al primer y segundo aspecto de la invención, es preferible si el tumor es un tumor de ovario o colorrectal, y es también preferible si la muestra es una muestra del tejido en el que se sospecha cáncer o se encuentra el tumor.

10 0146 Los métodos para determinar las diferencias de metilación entre ácidos nucleicos son bien conocidos en la materia e incluyen (a) el uso de una extensión de cebador de nucleótido simple sensible a metilación (Ms-SNuPE); (b) digestión del ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación por análisis de Southern; y (c) ensayos de metilación basados en PCR utilizando la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a metilación antes de la amplificación de PCR. Los métodos anteriores pueden llevarse a cabo tras la digestión de ADN convertido por bisulfito. El tratamiento de bisulfito causa citosina no metilada en la muestra de ácido nucleico a convertir a uracilo, pero no causa desaminación de la citosina metilada (a timina).

15 0147 Pueden llevarse a cabo aspectos de la invención usando un sistema (o también podría denominarse un kit de partes) para detectar la presencia o ausencia de, o la mutación en, la región relevante del ADN humano, el sistema comprendiendo un ácido nucleico capaz de hibridar selectivamente a la región relevante del ADN humano y un trifosfato de nucleósido o trifosfato de desoxinucleósido o derivado del mismo. Los ácidos nucleicos preferidos capaces de hibridar selectivamente a la región relevante del ADN humano son los mismos que los preferidos anteriormente.

20 La "región relevante del ADN humano" incluye el gen OBCAM o NTM o el ADNc OBCAM o NTM. Preferiblemente, la región relevante del ADN humano es el gen OBCAM o NTM como se define en este documento.

25 0148 El kit de partes puede comprender un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM o un alelo mutante del mismo, y medios para la detección de una mutación en el gen OBCAM o NTM donde dicha mutación es una mutación en OBCAM o NTM encontrada en una célula cancerosa.

0149 Por "mutación" se incluye inserciones, sustituciones y deleciones. Un ejemplo de una mutación en el que el ácido nucleico es capaz de hibridar selectivamente es la mutación citosina a guanina de OBCAM en el nucleótido 334 como se numera en la Figura 7.

30 0150 Por "trifosfato de nucleósido o trifosfato de desoxinucleósido o derivado del mismo" se incluye cualquier trifosfato de nucleósido o trifosfato de desoxinucleósido natural tales como ATP, GTP, CTP, y UTP, dATP, dGTP, dCTP, TTP así como derivados no naturales tales como los que incluyen un enlace fosforotioato (por ejemplo derivados aS).

35 0151 Convenientemente el trifosfato de nucleósido o trifosfato de desoxinucleósido es etiquetado radioactivamente o derivado del mismo, por ejemplo con ³²P, ³³P o ³⁵S, o es etiquetado fluorescentemente o etiquetado con un compuesto quimioluminiscente o con digoxigenina.

0152 Convenientemente los desoxinucleótidos están en una concentración adecuada para dilución para su uso en una PCR.

40 0153 El kit de partes puede incluir un ácido nucleico capaz de hibridar selectivamente a dicha región relevante del ADN humano y medios para detectar la presencia o ausencia de, o una mutación en, dicha región. Medios para detectar la presencia o ausencia de, o mutación en, dicha región incluyen, por ejemplo, una enzima de restricción de diagnóstico o una sonda de ácido nucleico específica de mutante o similares.

0154 Pueden llevarse a cabo aspectos de la invención usando un kit de partes que comprende:

- 45 (a) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen OBCAM o un alelo mutante del mismo, o al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al ADNc OBCAM o un alelo mutante del mismo; o
- (b) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen OBCAM metilado tratado por bisulfito o un alelo mutante del mismo; o
- 50 (c) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen OBCAM no metilado tratado por bisulfito o un alelo mutante del mismo; o
- (d) ambos (a) y (b), o (a) y (c), o (b) y (c), o (a), (b) y (c) y una fuente de bisulfito.

0155 Pueden también llevarse a cabo aspectos de la invención usando un kit de partes que comprende:

- (a) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen NTM o un alelo mutante del mismo, o al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al ADNc NTM o un alelo mutante del mismo; o

- (b) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen NTM metilado tratado por bisulfito o un alelo mutante del mismo; o
- (c) al menos dos ácidos nucleicos que hibridan selectivamente al gen NTM no metilado tratado por bisulfito o un alelo mutante del mismo; o
- 5 (d) ambos (a) y (b), o (a) y (c), o (b) y (c), o (a), (b) y (c) y una fuente de bisulfito.

0156 El kit puede comprender además medios para llevar a cabo una reacción de amplificación, como se describe más adelante (por ejemplo una reacción PCR) y/o para secuenciar un producto de amplificación, que puede indicar la presencia o ausencia de CpG metilado en el cuerpo del producto de amplificación, por ejemplo PCR.

- 10 0157 Convenientemente, estos kits que comprenden una fuente de bisulfito comprenden además ADN metilado de control. Tal ADN de control se sabe que está metilado en al menos una citosina, y permite una comparación positiva con ADN de ensayo. Puede usarse cualquier ADN humano metilado, por ejemplo ADN que ha sido metilado artificialmente usando métodos enzimáticos. El ADN derivado de la sangre puede ser útil ya que ésta representa una fuente renovable. El ADN humano metilado está disponible comercialmente de Intergen (Purchase, Nueva York, EE.UU./Oxford, Reino Unido): CpGenome Universal Methylated ADN Cat No. S7821.

- 15 0158 También convenientemente, estos kits comprenden además una ADN polimerasa. Las ADN polimerasas son útiles para amplificar ADN modificado con bisulfito antes del análisis de secuencia. El uso de bisulfito en la modificación del ADN, y la amplificación del ADN subsiguiente en la investigación del estado de metilación del ADN se describe arriba en el Ejemplo.

- 20 0159 Aspectos de la invención pueden llevarse a cabo usando un sistema para la detección de la presencia o ausencia de, o mutación en, la región relevante de ADN, el sistema comprendiendo un ácido nucleico que hibrida selectivamente a la región relevante del ADN humano y un enzima que modifica ácido nucleico. Ácidos nucleicos preferidos capaces de hibridar selectivamente a la región relevante del ADN humano son los mismos que los preferidos anteriormente.

0160 Por "mutación" se incluye inserciones, sustituciones (incluyendo transversiones) y deleciones.

- 25 0161 Por "enzima que modifica ácido nucleico" se incluye cualquier enzima capaz de modificar una molécula de ARN o ADN.

- 30 0162 Enzimas preferidas se seleccionan del grupo consistente de ADN polimerasas, ADN ligasas, quinasas polinucleótido o endonucleasas de restricción. Una enzima particularmente preferida es una ADN polimerasa termoestable tal como *Taq* ADN polimerasa. Las nucleasas tales como Cleavase I que reconocen estructura secundaria, por ejemplo desparejamientos, pueden también ser útiles.

- 35 0163 La detección de mutaciones en el gen será útil para determinar el tratamiento apropiado para un paciente, ej., terapia del gen OBCAM y/o NTM (ver a continuación). La detección de mutaciones en el gen puede ser útil para identificar un subconjunto de pacientes cuyos tumores tienen esta característica común, y pueden ser analizados como un grupo para el pronóstico o respuesta a varias terapias. Un ejemplo de una mutación en OBCAM se describe en el Ejemplo 5 y se muestra en la Figura 18.

0164 Las mutaciones en el gen puede estar relacionado a la respuesta o resistencia a ciertos tratamientos, esto puede ser investigado usando líneas celulares con sensibilidad conocida a varias terapias, o por estudios clínicos de correlación.

- 40 0165 Es posible que los genes fueran usados como parte de un panel de marcadores y ensayos, cuyos resultados combinados dirigirían la terapia. La detección de mutaciones en uno o ambos de los genes pueden ser útiles para el seguimiento de propagación y la carga de la enfermedad.

0166 El análisis de los genes puede ser útil para el diagnóstico diferencial en el caso donde las mutaciones en el gen son comunes en un tumor, pero no en otro. Por ejemplo, los tumores secundarios de origen gastrointestinal se encuentran frecuentemente en los ovarios y son difíciles de distinguir de los tumores de origen ovárico real.

- 45 0167 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para el diagnóstico del cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- (i) obtener una muestra que contiene proteína derivada del paciente;y
- (ii) determinar:
 - 50 (a) la cantidad o actividad o secuencia del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la cantidad, o actividad o secuencia de, el polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b).

0168 Otro aspecto adicional más de la invención proporciona un método para predecir las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- (i) obtener una muestra que contiene proteína derivada del paciente;y

- (ii) determinar:
 - (a) la cantidad o actividad o secuencia del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la cantidad, o actividad o secuencia del polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b).

5 0169 Los métodos de la invención también incluyen la medición y detección del polipéptido OBCAM y/o NTM o mutantes del mismo en muestra de ensayo y su comparación en una muestra de control. Puede también ser útil detectar actividad alterada del polipéptido. Se apreciará que las mediciones tomadas respecto al polipéptido OBCAM y/o NTM (o mutantes del mismo) en la muestra de ensayo puedan ser comparadas a las mediciones equivalentes en muestras de control que pueden derivarse de células no cancerosas (normales) conocidas o derivadas de células cancerosas conocidas.

10 0170 La muestra que contiene proteína derivada del paciente es convenientemente una muestra del tejido en el que el cáncer se sospecha o en el que el cáncer puede ser o se ha hallado. Estos métodos pueden usarse para cualquier cáncer, pero son particularmente adecuados en relación con cáncer de ovario, cáncer colorrectal, y otros adenocarcinomas comunes tales como cáncer de mama, de pulmón o del tracto gastrointestinal superior; los métodos son especialmente adecuados en relación con el cáncer de ovario o el cáncer colorrectal. Los métodos para obtener muestras adecuadas se describen en relación a métodos anteriores.

0171 Los métodos de la invención que implican detección del polipéptido OBCAM y/o NTM son particularmente útiles en relación con muestras históricas tales como aquellos que contienen secciones de muestras de tumor embebidas en parafina.

20 0172 La cantidad del polipéptido OBCAM o NTM puede determinarse de cualquier modo adecuado.

0173 La secuencia de polipéptido de OBCAM se da en la biblioteca de datos del GenBank bajo N° de Accesos NM_002545 (ver Figura 7). La secuencia de polipéptido de NTM se da en la biblioteca de datos del GenBank bajo Nos de Accesos NM_016522 (ver Figuras 8 y 9). Secuencias de polipéptido de NTM pueden también incluir las codificadas por los clones 11753149.0.6 y 11753149.0.37 de WO 00/61754 y PRO337 de WO 99/46281.

25 0174 Por determinación de la secuencia del polipéptido, incluimos por ejemplo, determinar la presencia de diferencias tales como inserciones, deleciones, sustituciones, etc., entre la secuencia de tipo salvaje como se muestra en las Figuras 7 y la secuencia del polipéptido presente en la muestra del paciente. Puede ser útil determinar si el polipéptido es una variante, tal como el mutante descrito en el Ejemplo 5 en el caso del OBCAM, ya que estas variantes pueden ser informativas. Por ejemplo, determinar que una muestra de un paciente contiene una variante OBCAM en la que el residuo 95 (como se numera en el polipéptido inmaduro mostrado en la Figura 7 y en la secuencia de referencia de la proteína correspondiente bajo el N° de Acceso del GenBank NP_002536) es una arginina en vez de prolina puede ser indicativo de cáncer de ovario. Puesto que se cree que esta variante es detectable desde una etapa temprana del cáncer de ovario, su detección permite un diagnóstico, pronóstico y una determinación rápidos de las perspectivas relativas de un resultado particular en el paciente, todo lo cual permite un tratamiento más adecuado a seleccionar, mejorando así las posibilidades de un resultado favorable para el paciente.

30 0175 Se prefiere que la cantidad de, o secuencia del polipéptido OBCAM o NTM se determine usando una molécula que se une selectivamente al polipéptido OBCAM o NTM o que se une selectivamente a una forma mutante del polipéptido OBCAM o NTM. Como el experto conocerá, OBCAM y NTM son moléculas de adhesión celular extracelulares y secretadas y por tanto las moléculas maduras de tipo salvaje no son generalmente intracelulares. Adecuadamente, la molécula que se une selectivamente a OBCAM o NTM o que se une selectivamente a un mutante de OBCAM o NTM es un anticuerpo. El anticuerpo puede también unirse a una variante natural o fragmento del polipéptido OBCAM o NTM.

0176 Anticuerpos para OBCAM o NTM pueden hacerse por métodos bien conocidos en la técnica.

45 0177 Es preferible que los anticuerpos usados sean selectivos para OBCAM o NTM. Por "selectivo para OBCAM o NTM" queremos decir que ligan OBCAM o NTM pero no se unen sustancialmente a otros polipéptidos. Preferiblemente el anticuerpo se une selectivamente sólo al polipéptido OBCAM o NTM, y más preferiblemente, el anticuerpo se une sólo a uno de OBCAM y NTM, y no a ambos.

50 0178 Anticuerpos que pueden unirse selectivamente a una forma mutante de OBCAM o NTM pueden hacerse, por ejemplo, usando péptidos que abarcan la región cambiada o modificada de otro modo de aminoácido de OBCAM o NTM, o usando proteínas de fusión que expresan una porción del polipéptido OBCAM o NTM que incluye la región de aminoácido cambiada o modificada de otro modo.

55 0179 Un ejemplo de una variante OBCAM (e.d., una secuencia de polipéptido OBCAM mutante, contra la que puede ser útil hacer un anticuerpo, que es capaz de unión selectiva, se describe en el Ejemplo 5, y la secuencia de aminoácido rodeando inmediatamente el residuo mutado se muestra en la Figura 18. El aminoácido mutado corresponde al residuo 95 del polipéptido inmaduro (e.d., con la señal péptido aun unida), como se numera en la Figura 7. El residuo 95 se cree que se encuentra en el primer dominio de inmunoglobulina de OBCAM.

- 0180 En cualquier caso, en base al código genético, es posible deducir fácilmente el cambio en la secuencia de aminoácido.
- 0181 Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Anticuerpos monoclonales adecuados pueden prepararse por técnicas conocidas, por ejemplo las descritas en "Anticuerpos Monoclonales: Un Manual de Técnicas", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Anticuerpos Monoclonales de Hibridoma: Técnicas y Aplicaciones", J G R Hurrel (CRC Press, 1982).
- 0182 Por "la cantidad de polipéptido OBCAM" se quiere decir la cantidad de polipéptido OBCAM por unidad de masa de muestra de tejido o por el número de unidades de células de muestra, normalmente comparada a la cantidad de polipéptido OBCAM por unidad de masa de tejido normal conocido o por número de unidades de células normales. La cantidad puede determinarse usando cualquier método adecuado de cuantificación de proteínas. En particular, es preferible que se usen anticuerpos y que la cantidad de OBCAM se determine usando métodos que incluyen Western Blot cuantitativo, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) o inmunohistoquímica cuantitativa. Similarmente, por "la cantidad de polipéptido NTM" se quiere decir la cantidad de polipéptido NTM por unidad de masa de la muestra etc, como se describe a continuación en relación con OBCAM.
- 0183 La condición neoplásica de lesiones puede también detectarse en base a la alteración del polipéptido OBCAM o NTM de tipo salvaje. Tales alteraciones pueden determinarse por análisis de secuencia según técnicas convencionales. Más preferentemente, se usan anticuerpos (policlonales o monoclonales) para detectar diferencias en, o ausencia de, polipéptido OBCAM o NTM o péptidos derivados de los mismos. Los anticuerpos pueden prepararse como se describe en este documento.
- 0184 Otras técnicas para crear y purificar anticuerpos son bien conocidas en la materia y cualquiera de tales técnicas puede ser elegida.
- 0185 En una realización preferida de la invención, pueden usarse anticuerpos para inmunoprecipitar proteínas OBCAM o NTM de solución así como reaccionar con la proteína OBCAM o NTM en Western o inmunoblots de geles de poliacrilamida. En otra realización preferida, pueden usarse anticuerpos para detectar proteínas OBCAM o NTM en parafina o secciones de tejidos congelados, usando técnicas inmunocitoquímicas.
- 0186 Realizaciones preferidas en relación a los métodos para detectar OBCAM o NTM o sus mutaciones incluyen ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA), incluyendo ensayos sandwich utilizando anticuerpos monoclonales y/o policlonales (ensayos sandwich ejemplares se describen por David et al en las Patentes US Nº 4,376,110 y 4,486,530, el anticuerpo secundario que reconoce el primero, es etiquetado con una enzima, un tag fluorescente, un radioisótopo) y análisis de imagen asistido por ordenador de secciones teñidas por IHC.
- 0187 La actividad de OBCAM o NTM puede determinarse midiendo la actividad del polipéptido OBCAM o NTM por unidad de masa de la muestra del tejido o por número de unidades de células de muestra y normalmente comparando esta actividad con la actividad del polipéptido OBCAM o NTM por unidad de masa del tejido normal conocido o por el número de unidades de células normales. La cantidad puede determinarse usando cualquier ensayo adecuado de actividad de OBCAM o NTM. Preferentemente, el ensayo es selectivo para la actividad de polipéptido OBCAM o NTM.
- 0188 La actividad de los genes NTM y OBCAM incluyen actividad supresora de tumor, direccionamiento del axón neuronal, promoción de agregación celular y una, aún mal definida, función de señalización celular.
- 0189 Aspectos de la invención pueden llevarse a cabo con un anticuerpo que reacciona con un polipéptido OBCAM o NTM mutante o fragmento del mismo, donde dicho mutante OBCAM o NTM es un mutante encontrado en una célula cancerosa. Preferentemente, el anticuerpo no reacciona con el polipéptido OBCAM o NTM de tipo salvaje. Tales anticuerpos son útiles en los ensayos de diagnóstico y métodos de la invención y pueden hacerse, por ejemplo, usando péptidos cuya secuencia se deriva del polipéptido OBCAM o NTM mutante como inmunógenos. Un ejemplo de un OBCAM mutante se describe en el Ejemplo 5 y se muestra en la Figura 18.
- 0190 La invención puede también llevarse a cabo usando un ácido nucleico que hibrida selectivamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido OBCAM o NTM mutante, cuyo mutante es uno encontrado en una célula cancerosa. Tales ácidos nucleicos son útiles en los ensayos de diagnóstico y métodos de la invención.
- 0191 Se apreciará que en relación con los determinados métodos basados en ácido nucleico de diagnóstico, determinación de susceptibilidad y predicción de perspectivas relativas de resultado, los métodos implican determinar si el estado del ácido nucleico OBCAM o NTM (ya sea ADN o ARNm) es alterado en una muestra que se ensaya en comparación con una muestra de un tejido equivalente u otra fuente que es conocida por ser normal o libre de enfermedad.
- 0192 Péptidos basados en las secuencias mutantes pueden ser útiles en la estimulación de una respuesta inmune.

0193 Un aspecto adicional de la invención proporciona un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc OBCAM o NTM para su uso en tratar cáncer en un paciente.

5 0194 Un aspecto adicional de la invención proporciona un ácido nucleico que codifica el polipéptido OBCAM y/o NTM o una fusión del mismo para uso en el tratamiento de cáncer en un paciente.

0195 La invención también incluye todo o parte del gen o ADNc OBCAM y/o NTM para su uso en tratar el cáncer en un paciente. Preferiblemente, el cáncer a tratar es un cáncer de ovario o cáncer colorrectal.

10 0196 Adecuadamente, el ácido nucleico codifica el polipéptido OBCAM y/o NTM o una fusión del mismo. Preferentemente, el polipéptido OBCAM y/o NTM es un polipéptido de tipo salvaje o un polipéptido variante que tiene sustancialmente actividades de tipo salvaje. Es menos preferido si el polipéptido OBCAM y/o NTM es un polipéptido con mutaciones que se encuentran en células cancerosas tales como células de cáncer de ovario; sin embargo, tales polipéptidos pueden ser útiles en provocar una respuesta inmune celular anti-cáncer. Por ello, según la presente invención, se proporciona también un método para suministrar función OBCAM y/o NTM de tipo salvaje a una célula que lleva alelos OBCAM y/o NTM mutantes. El suministro de tal función debería suprimir el crecimiento neoplásico de las células receptoras. El gen o una parte del gen OBCAM y/o NTM de tipo salvaje puede ser introducido en la célula en un vector de modo que el gen se mantiene extracromosómico. En tal situación, el gen será expresado por la célula desde la ubicación extracromosómica. Si un fragmento de gen es introducido y expresado en una célula que lleva un alelo OBCAM y/o NTM mutante, el fragmento de gen debería codificar una parte de la proteína OBCAM y/o NTM que es requerida para el crecimiento no neoplásico de la célula. más preferida es la situación donde el gen OBCAM y/o NTM de tipo salvaje o una parte del mismo es introducido en la célula mutante de tal manera que se recombina con el gen OBCAM y/o NTM mutante endógeno presente en la célula. Tal recombinación requiere un suceso de recombinación doble que da lugar a la corrección de la mutación genética de OBCAM y/o NTM. Los vectores para la introducción de genes tanto para la recombinación como para el mantenimiento extracromosómico son conocidos en la técnica, y puede usarse cualquier vector adecuado. Métodos para la introducción del ADN en las células tales como electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio y transducción viral son conocidos en la materia, y la elección del método está dentro de la competencia del experto en la materia. Las células transformadas con el gen OBCAM y/o NTM de tipo salvaje pueden usarse como sistemas modelo para estudiar la remisión del cáncer y tratamientos con fármacos que promueven tal remisión.

30 0197 Como generalmente se ha discutido anteriormente, el gen OBCAM y/o NTM o fragmento, en su caso, se puede emplear en métodos de terapia génica con el fin de aumentar la cantidad de los productos de expresión de tales genes en células cancerosas. Tal terapia génica es particularmente apropiada para uso tanto en células cancerosas como precancerosas, en las que el nivel de polipéptido OBCAM y/o NTM está ausente o disminuido o de otro modo cambiado en comparación con las células normales. Puede también ser útil aumentar el nivel de expresión de un gen OBCAM y/o NTM incluso en aquellas células tumorales en las que se expresa el gen mutante a un nivel "normal", pero el producto del gen no es totalmente funcional o tiene una función alterada.

40 0198 La terapia génica puede llevarse a cabo según métodos generalmente aceptados, por ejemplo, como se describe por Friedman, 1991. Las células del tumor de un paciente pueden ser primero analizadas por métodos de diagnóstico descritos en este documento, para determinar la producción del polipéptido OBCAM y/o NTM y su forma física (e.d. qué mutaciones contiene) en las células tumorales. Se prepara un virus o vector plasmídico (ver más detalles abajo), que contiene una copia del gen OBCAM y/o NTM ligada a los elementos de control de expresión y capaz de replicarse dentro de las células tumorales. Se conocen vectores adecuados, tales como los descritos en la Patente US 5,252,479 y Solicitud PCT publicada WO 93/07282. El vector es luego inyectado en el paciente, ya sea localmente en el sitio del tumor o sistémicamente (con el fin de alcanzar cualquier célula tumoral que pueda haber metastatizado a otros sitios). Si el gen transfectado no está permanentemente incorporado en el genoma de cada una de las células tumorales específicas, el tratamiento puede tener que repetirse periódicamente.

50 0199 Los sistemas de transferencias de genes conocidos en la técnica pueden ser útiles en la práctica de los métodos de terapia génica de la presente invención. Estos incluyen métodos de transferencia viral y no viral. Una serie de virus se han usado como vectores de transferencia de genes, incluyendo papovavirus, ej., SV40 (Madzak et al, 1992), adenovirus (Berkner, 1992; Berkner et al, 1988; Gorziglia and Kapikian, 1992; Quantin et al, 1992; Rosenfeld et al, 1992; Wilkinson et al, 1992; Stratford-Perricaudet et al, 1990), virus vaccinia (Moss, 1992), virus adeno-asociado (Muzyczka, 1992; Ohi et al, 1990), herpesvirus incluyendo HSV y EBV (Margolskee, 1992; Johnson et al, 1992; Fink et al, 1992; Breakfield y Geller, 1987; Freese et al, 1990), y retrovirus de influenza aviar (Brandyopadhyay y Temin, 1984; Petropoulos et al., 1992), murine (Miller, 1992; Miller et al, 1985; Sorge et al, 1984; Mann y Baltimore, 1985; Miller et al, 1988), y de origen humano (Shimada et al, 1991; Helseth et al, 1990; Page et al, 1990; Buchschacher y Panganiban, 1992). Hasta la fecha la mayoría de los protocolos de terapia génica humana se han basado en retrovirus de ratón desactivados.

0200 Puede preferirse, particularmente en relación a OBCAM, que el vector de terapia génica no sea un vector de virus de vaccinia.

- 0201 Métodos de transferencia de genes no virales conocidos en la materia incluyen técnicas químicas tales como la coprecipitación con fosfato de calcio (Graham y van der Eb, 1973; Pellicer et al, 1980); técnicas mecánicas, por ejemplo microinyección (Anderson et al, 1980; Gordon et al, 1980; Brinster et al, 1981; Constantini y Lacy, 1981); transferencia de membrana mediada por fusión *vía* liposomas (Felgner et al, 1987; Wang y Huang, 1989; Kaneda et al, 1989; Stewart et al, 1992; Nabel et al, 1990; Lim et al, 1992); y absorción directa de ADN y transferencia de ADN mediada por receptor (Wolff et al, 1990; Wu et al, 1991; Zenke et al 1990; Wu et al, 1989b; Wolff et al, 1991; Wagner et al, 1990; Wagner et al, 1991; Cotten et al, 1990; Curiel et al, 1991a; Curiel et al, 1991b). Transferencias de genes mediadas por virus pueden ser combinadas con transferencia de genes directa *in vivo* usando entrega de liposoma, permitiendo a uno dirigir los vectores virales a las células tumorales y no en las células circundantes que no se dividen. Alternativamente, la línea celular del productor de vector retroviral puede ser inyectada en tumores (Culver et al, 1992). La inyección de células productoras proporcionará entonces una fuente continua de partículas de vector. Esta técnica ha sido aprobada para uso en humanos con tumores cerebrales inoperables.
- 0202 Otros sistemas adecuados incluyen el sistema híbrido adenovirus-retroviral descrito por Feng et al (1997) Nature Biotechnology 15, 866-870, o sistemas virales con ligandos enfocados tales como fragmentos Fv adecuados de cadena simple.
- 0203 En un enfoque que combina los métodos biológicos y físicos de transferencia de genes, se combina ADN plásmido de cualquier tamaño con un anticuerpo polilisina-conjugado específico para la proteína del hexón de adenovirus, y el complejo resultante se liga a un vector adenovirus. El complejo trimolecular es luego usado para infectar células. El vector adenovirus permite una unión, internalización y degradación eficiente del endosoma antes de que el ADN acoplado se dañe.
- 0204 Se ha mostrado que los complejos liposomas/ADN son capaces de mediar la transferencia de genes directa *in vivo*. Mientras que en preparaciones estándar de liposomas el proceso de transferencia de genes es no específico, se ha informado la absorción localizada *in vivo* y la expresión en depósitos de tumores, por ejemplo, tras la administración *in situ* (Nabe1 (1992) Hum. Gene Ther. 3, 399-410).
- 0205 Se prefieren técnicas de transferencia de genes que dirigen el ADN directamente al tejido ovárico, ej., células epiteliales de los ovarios. La transferencia de genes mediada por receptor, por ejemplo, se logra mediante la conjugación de ADN (usualmente en forma de plásmido superespiral cerrado covalentemente) a un ligando de proteína a través de polilisina. Los ligandos son elegidos en base a la presencia de los receptores de ligandos correspondientes en la superficie celular del tipo de célula/tejido diana. Estos conjugados de ligando de ADN pueden ser inyectados directamente en la sangre si se desea y están dirigidos al tejido diana donde ocurre la unión y la internalización del receptor del complejo ADN-proteína. Para superar el problema de la destrucción intracelular del ADN, se puede incluir la coinfección con adenovirus para interrumpir la función endosoma.
- 0206 En el caso de que se use la terapia génica de sustitución que usa una funcionalidad OBCAM y/o NTM de tipo salvaje, puede ser útil para controlar el tratamiento detectando la presencia de ARNm o polipéptido OBCAM y/o NTM, o OBCAM y/o NTM funcional, en varios sitios en el cuerpo, incluyendo el tumor objetivo, los sitios de metástasis, suero sanguíneo, y las secreciones/excreciones corporales, por ejemplo la orina.
- 0207 Aspectos de la invención pueden llevarse a cabo usando un vector de terapia génica que es capaz de expresar el polipéptido OBCAM y/o NTM o un fragmento funcional o variante o fusión de los mismos en una célula mamífera. Normalmente, el fragmento funcional o variante o porción o fusión del polipéptido OBCAM o NTM tiene las actividades supresoras de tumor del OBCAM o NTM de tipo salvaje respectivamente.
- 0208 La actividad supresora de tumor de OBCAM se muestra en la Figura 14, y se describe en más detalle en el Ejemplo3.
- 0209 Preferentemente, el vector es uno que puede replicarse en una célula humana. Preferentemente, el vector es uno que ha sido descrito antes en más detalle en conexión con los aspectos de la terapia génica de la invención.
- 0210 Un aspecto adicional de la invención proporciona una cantidad efectiva del polipéptido OBCAM y/o NTM o una fusión del mismo para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente.
- 0211 Pueden suministrarse péptidos que tienen actividad OBCAM o NTM a las células que llevan alelos OBCAM o NTM mutantes o faltantes. La secuencia de la proteína OBCAM o NTM se describe en las Figuras 7 y 8 o 9 respectivamente. La proteína puede ser producida por expresión de la secuencia de ADNc en la bacteria, por ejemplo, usando vectores de expresión conocidos. Alternativamente, el polipéptido OBCAM o NTM puede ser extraído de células mamíferas que producen OBCAM o que producen NTM. En adición, pueden emplearse técnicas de química sintética para sintetizar la proteína OBCAM o NTM. Cualquiera de tales técnicas puede proporcionar la preparación de la presente invención que comprende la proteína OBCAM o NTM. La preparación esta sustancialmente libre de otras proteínas humanas. Esto se logra más fácilmente mediante síntesis en un microorganismo o *in vitro*.
- 0212 El gen o ADNc OBCAM o NTM puede ser expresado por cualquier método adecuado. Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión, tales como un plásmido, en la orientación correcta y el marco de lectura

- correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede ser ligado a las secuencias de nucleótidos de control regulador de transcripción y traducción apropiadas reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. El vector es luego introducido en el huésped por técnicas estándar. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar células huéspedes transformadas. Una técnica de selección implica incorporar en el vector de expresión una secuencia ADN, con cualquier elemento de control necesario, que codifica para una característica seleccionable en la célula transformada, tal como la resistencia a los antibióticos. Alternativamente, el gen para tal característica seleccionable puede estar en otro vector, que es usado para co-trasformar la célula huésped deseada.
- 5
- 0213 Las células huésped que han sido transformadas por el ADN recombinante de la invención son luego cultivadas durante un tiempo suficiente y bajo condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la materia a la vista de las enseñanzas aquí descritas para permitir la expresión del polipéptido, que puede entonces ser recuperada.
- 10
- 0214 Muchos sistemas de expresión son conocidos, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insectos.
- 15
- 0215 Los vectores incluyen un replicón procariota, como el ColE1 *ori*, para propagación en una procariota, incluso si el vector va a usarse para la expresión en otros tipos de células, no procariotas. Los vectores pueden también incluir un promotor apropiado tal como un promotor procariótico capaz de dirigir la expresión (transcripción y traslación) de los genes en una célula huésped bacteriana, como *E. coli*, transformada con el mismo.
- 20
- 0216 Un promotor es un elemento de control de expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de ARN polimerasa y que se produzca transcripción. Secuencias de promotor compatibles con huéspedes bacterianos de ejemplo son normalmente proporcionadas en plásmidos vectores que contiene sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.
- 25
- 0217 Plásmidos vectores procarióticos típicos son pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratorios, (Richmond, CA, EE.UU.) y pTrc99A y pKK223-3 disponibles de Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU.
- 0218 Un plásmido vector típico de células de mamífero es pSVL disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. este vector usa el promotor tardío de SV40 para conducir la expresión de genes clonados, encontrándose el nivel más alto de expresión en células que producen antígeno T, tales como células COS-1.
- 30
- 0219 Un ejemplo de un vector de expresión inducible de mamífero es pMSG, también disponible de Pharmacia. Este vector usa el promotor inducible por glucocorticoides de la repetición terminal larga del virus del tumor mamario de ratón para conducir la expresión del gen clonado.
- 35
- 0220 Vectores plásmidos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y están generalmente disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de Integración de Levadura (Yips) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Plásmidos pRS413-416 son plásmidos de Centrómero de Levadura (YCps).
- 40
- 0221 Han sido desarrollados una serie de métodos para para enlazar operativamente ADN a vectores a través de términos cohesivos complementarios. Por ejemplo, pueden añadirse zonas complementarias de homopolímero al segmento de ADN a insertar en el ADN del vector. El vector y el segmento de ADN son luego unidos por enlaces de hidrógeno entre las colas homopolímeras complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.
- 45
- 0222 Enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo de unir el segmento de ADN a vectores. El segmento de ADN, generado por digestión con endonucleasas de restricción como se describe anteriormente, se trata con ADN polimerasa I del bacteriófago T4 o ADN polimerasa de *E. coli*, enzimas que eliminan términos salientes 3'-de hebra sencilla con sus actividades exonucleolíticas-3'-5', y rellenados en extremos 3' empotrados con sus actividades de polimerización.
- 50
- 0223 La combinación de estas actividades por lo tanto genera segmentos de ADN de extremos romos. Los segmentos de extremos romos son luego incubados con un gran exceso molar de moléculas conectoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la ligadura de las moléculas de ADN de extremos romos, tales como ADN ligasa del bacteriófago T4. Así, los productos de la reacción son segmentos de ADN que llevan secuencias de polímeros enlazadores en sus extremos. Estos segmentos de ADN son luego escindidos con la enzima de restricción apropiada y ligados a un vector de expresión que ha sido escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.
- 55
- 0224 Moléculas de OBCAM y/o NTM activas pueden ser introducidas en las células por microinyección o por uso de liposomas, por ejemplo. Alternativamente, algunas moléculas activas pueden ser captadas por células, activamente o por difusión. La aplicación extracelular del producto de gen OBCAM y/o NTM puede ser suficiente para afectar el crecimiento del tumor. El suministro de moléculas con actividad OBCAM y/o NTM debe llevar a la reversión parcial

del estado neoplásico. Polipéptidos modificados con función sustancialmente similar se usan también para la terapia de péptido.

5 0225 Aspectos de tratamiento de la invención pueden llevarse a cabo usando una composición farmacéutica que comprende un vector de terapia génica que incluye un ácido nucleico que codifica el polipéptido OBCAM y/o NTM o una variante funcional o porción o fusión del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable; una composición farmacéutica que comprende un vector de terapia génica incluyendo un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM y/o NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ADNc OBCAM y/o NTM, o un alelo mutante del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable; una composición farmacéutica que comprende el polipéptido OBCAM y/o NTM o fusión del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 0226 Vectores de terapia génica adecuados se han descrito antes. Polipéptidos OBCAM y NTM adecuados se han descrito antes. Como se ha indicado, es preferible, particularmente en relación al OBCAM, que el vector de terapia génica no sea un vector de virus de vaccinia.

0227 Por "farmacéuticamente aceptable" se incluye que la formulación es estéril y libre de pirógenos. Portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica de farmacia.

15 0228 La presente invención se describirá ahora en más detalle con referencia a los siguientes, no limitativos, Ejemplos y Figuras.

0229 Figura 1.

20 Mapa secuencias contiguas BAC (cromosoma artificial bacteriano) de la región 11q25 que contiene los genes NTM y OBCAM, organizados según la posición física. La posición relativa de marcadores de microsatélites relevantes se muestra. No está a escala.

0230 Figura 2.

Relación de las regiones de LOH discretas en el cromosoma 11q24-q25 que muestra la región Barx2 (región 2) y la región OBCAM/NTM (región 5).

0231 Figura 3.

25 Valores LOH para marcadores de microsatélites en relación a la figura 2 de centrómero a telómero para cáncer de ovario y colorrectal.

0232 Figura 4.

30 Esta figura muestra cómo los marcadores han sido reordenados y documenta el número de casos con LOH en porcentaje del número de casos informativos para cada marcador. 66% (43/65) de los tumores de ovario y 69% (27/39) de los tumores colorrectales tenían LOH que incluyen al menos 1 locus dentro de la región 11q24-q25. 8 tumores en cada grupo tenían LOH en todos los loci informativos.

0233 Figura 5.

Ejemplos de LOH D11S4085. 2 casos con retención de ambos alelos en la sangre y pérdida completa de un alelo en tejido del cáncer de ovario.

35 0234 Este ejemplo de perfil LOH en D11S4085 muestra retención de heterocigosidad en los marcadores de microsatélites flanqueantes D11S4085 (centromérico) y D11S969 (telomérico). Los marcadores se amplificaron por PCR (con un cebador para cada marcador etiquetado con un tinte fluorescente) de ADN Normal (N) y Tumor (T) de dos pacientes con cáncer de ovario. Los productos PCR (etiquetados fluorescentemente) fueron separados por tamaño en un Analizador Genético AB1310, detectados por un láser y los datos analizados con el software GeneScan ABI. Los picos representan el patrón de alelos para cada uno de los marcadores en el ADN Normal y Tumor para los dos pacientes, Paciente 1 y Paciente 2. La comparación del patrón de alelos de D11S4085 entre N y T para cada paciente muestra dos alelos (heterocigosidad) presentes en el ADN Normal, mientras que sólo un alelo único está presente en el ADN Tumor, indicando que se ha producido pérdida de heterocigosidad. La pérdida de alelo ha sido completa en ambos casos, indicando una falta de heterogeneidad en la muestra Tumor. Esto sugiere que la pérdida de D11S4085 es un suceso temprano en la carcinogénesis de ovario. Por el contrario, los patrones de alelos heterocigotos para los dos marcadores flanqueantes no se modifican entre Normal y Tumor para cada uno de los pacientes, lo que representa retención de heterocigosidad.

0235 Figura 6.

50 Muestra representativa de 13 casos de cáncer de ovario mostrando el estado de metilación para OBCAM y neurotrimin, y las tasas de concordancia y discordancia para ambos entre individuos y a través de la muestra.

M = metilado

U = no metilado

C = concordante

D = discordante

0236 Figura 7.

- 5 La secuencia de nucleótido del ADNc OBCAM humano con la secuencia de aminoácido codificada. La secuencia corresponde a la base de datos GenBank con número de entrada NM_002545.

0237 Figura 8.

La secuencia de nucleótido de ADNc Neurotrimin humano (NTM) con la secuencia de aminoácido codificada. La secuencia corresponde a la base de datos del GenBank con número de entrada NM_016522.

- 10 0238 Figura 9.

Secuencias NTM isoforma. La forma predominante en el epitelio superficial del ovario humano normal es la forma +33bp (unos 69%). La forma +69bp es otra forma alternativa que es una isoforma menor (unos 19%), en comparación con la secuencia de tipo salvaje de la base de datos que forma unos 4%. Una isoforma menor adicional contiene un 108bp adicional, que se prediría que resultará en la terminación prematura de la traslación de proteínas y una proteína isoforma NTM truncada resultante.

- 15 0239 La forma +33bp contiene una secuencia de nucleótido insertada de 33bp, que se deriva de un exón único alternativo dentro del gen NTM. Este exón es uno de los dos exones que contribuye a la inserción 69bp (ver abajo). Se muestra la secuencia de nucleótidos con traslación de proteínas (por debajo de la secuencia de nucleótidos) de la isoforma +33pb del epitelio superficial del ovario de neurotrimin humano. El 33bp adicional de la secuencia de nucleótido y 11 aminoácidos resultantes encuadrados se muestran en negrita subrayados en el contexto de la secuencia de NTM humano de tipo salvaje (GenBank NM_015622). El codón de parada se denota por *. La inserción encuadrada da lugar a la inclusión de unos 11 aminoácidos adicionales cerca del término-C de la proteína NTM: EVKTTALTPWK.

- 20 0240 La forma +69bp contiene una secuencia de nucleótido insertada de 69bp, que se deriva del empalme de 2 exones alternativos dentro del gen NTM. Se muestra la secuencia de nucleótidos con traslación de proteína (bajo la secuencia de nucleótidos) de la isoforma +69bp del epitelio superficial del ovario de NTM humano. El 69bp adicional de la secuencia de nucleótido y 23 aminoácidos resultantes encuadrados se muestran en negrita subrayada en el contexto de la secuencia NTM humana de tipo salvaje (GenBank NM_015622). El codón de parada se denota por *. La inserción encuadrada da lugar a la inclusión de 23 aminoácidos adicionales cerca del término-C de la proteína NTM: ELNEPTSSTLLQEVKTTALTPWK.

- 25 0241 La forma +108bp contiene una secuencia de nucleótidos insertada de 108bp, que se deriva del empalme de 3 exones alternativos dentro del gen NTM. Se muestra la secuencia de nucleótidos con traslación de proteína (bajo la secuencia de nucleótidos) de la isoforma+108bp del epitelio superficial de ovario de NTM humano. El 108bp adicional de la secuencia de nucleótidos se prediría que resultará en la terminación prematura de traslación de proteínas y una isoforma de proteína NTM truncada resultante carente del sitio de fijación del ancla GPI en el término carboxi. La proteína truncada, por tanto, se podría predecir que no sea anclada a la membrana celular a través de un ancla GPI. Esta isoforma puede por tanto representar una forma soluble de NTM, que puede ser ubicado extracelularmente, y que puede potencialmente interferir con o modular la función normal de NTM anclado a GPI. El 108bp adicional de la secuencia de nucleótidos y traslación de proteína se muestran en negrita subrayada en el contexto de la secuencia NTM humana de tipo salvaje (GenBank NM_015622). Los codones de paradas se denota por *.

0242 Figura 10. IgLONs son altamente expresados en ovario normal.

- 45 La secuencia de codificación de longitud completa OBCAM y NTM RT-PCR de panel de ADNc de tejido múltiple (BD Clontech) con la adición de una muestra de ovario normal preparada en ICRF Unidad de Oncología Médica, Edimburgo, Reino Unido. Se observa fuerte expresión de ambos genes en muestras de cerebro y el ovario normal preparadas internamente (e.d. no el panel ADNc Clontech).

Secuencias de cebador:

0243

OBCAM:

- 50 OPCML F1: 5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3' 20'mero nucs 34-53

OPCML R1: 5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3' 20'mero nucs 1110-1091

Numeración de nucleótido OBCAM de NM_002545

NTM:

NTM F2: 5'-AGTTGTGGCTGTGCGAGAATG-3' nucs 248-267

NTM R1: 5'-AGAGGTTGCACGATGCAGCT-3' nucs 1600-1581

5 Numeración de nucleótido NTM de NM_016522

0244 Figura 11. Re-expresión de IgLON

MDAMB23.1 y líneas celulares cancerosas T47D se cultivaron en presencia (+) o ausencia (-) de la azacitidina durante 4 días más TSA (Aza / TSA) para el cuarto día. OBCAM y NTM RT-PCR muestra re-expresión de OBCAM en la línea celular MDAMB23.1, y re-expresión de NTM en las líneas celulares MDAAMB23.1 y T47D. Se incluyen 10 controles negativos de la transcriptasa inversa. NTM RT-PCR muestra re-expresión de isoformas de neurotrimin múltiples.

0245 Los cebadores usados fueron:

OBCAM:

OPCML F4: 5'-TACCATAGATGACCGGGTAA-3' nucs: 221-240

15 OPCML R6: 5'-TTCCGCACATCGGGCGCAGC-3' nucs: 694-675

Numeración de nucleótido OBCAM de NM_002545

NTM:

NTM F3: 5'- ACATGACTATGGGA ACTACA-3' nucs 1125-1144

NTM R2: 5'- GGAAGTGGCACTCACATCAA-3' nucs 1315-1296

20 Numeración de nucleótido NTM de NM_016522

0246 Figura 12. Cebadores representativos útiles en la detección de la metilación de los genes OBCAM y NTM.

0247 Figura 13. Demetilación y re-expresión de OBCAM en células SKNV3.3 después de exposición a 5'-aza-2'-deoxicitidina (AZA). CON son células SKNV3.3 de control no tratadas. Mix es una reacción de control de PCR que contiene todos los componentes excepto el ADN plantilla.

25 0248 Panel superior: OBCAM RT-PCR de la 1ª cadena de ADNc preparada de las células SKNV3.3 después de 4 días de cultivo en presencia (AZA) o ausencia (CON) de 20µM 5'-aza 2'-deoxicitidina. Mix se refiere a una reacción PCR de control que contiene todos los componentes de reacción excepto la plantilla ADN. Productos OBCAM PCR se transfirieron entonces a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda OBCAM. La expresión OBCAM es claramente evidente después de la exposición a AZA pero está ausente en las células de control. Panel inferior: 30 Actina RT-PCR de la 1ra cadena de ADNc de líneas celulares similares como un control para la integridad de muestras. La expresión de actina es similar en las células SKVN3.3 tratadas y no tratadas.

0249 Figura 14. La transfección OBCAM en células SKVN3.3 suprime el crecimiento tumoral subcutáneo en ratones desnudos.

35 0250 Gráfico del volumen medio del tumor (cm³) de tumores en ratones desnudos después de la inyección subcutánea de sentido transfectado OBCAM y células SKVN3.3 de control. Se midieron volúmenes tumorales semanalmente durante 4 semanas. La diferencia en el crecimiento del tumor s.c. es estadísticamente significativa.

0251 Figura 15. Transfección de OBCAM en células SKVN aumenta la agregación celular.

40 0252 Gráfico del número de células individuales sobrantes en los cultivos OBCAM transfectado de sentido, OBCAM transfectado anti-sentido, y células SKNV3.3 progenitoras medidas con un hemocitómetro a intervalos temporizados. La expresión de OBCAM da lugar a un número reducido de células individuales que permanecen en el cultivo, que igualan a una tasa observada mejorada de agregación celular.

0253 Figura 16. Estructura de Exones Predicha del Gen OBCAM Humano.

45 0254 La secuencia exónica se resalta en negrita y la secuencia intrón que flanquea los exones está en texto normal. Las numeraciones de nucleótidos se refieren a las correspondientes a las secuencias de bases de datos del GenBank como sigue. Exón 1, se refiere a AC027631.4; Exón 2, se refiere a AC012234.6; Exones 3-7, se refiere a AP000843.3. La secuencia de nucleótidos para Exón 1 está incompleta en el área que abarca el límite exón/intrón 1

debido a la falta de la Secuencia del Proyecto del Genoma Humano disponible en el GenBank con Acceso AC027631.4. Los cebadores PCR sentido y anti-sentido para SSCPE se destacan con subrayados simples y dobles, respectivamente. Se dan tamaños de Exones previstos.

0255 Figura 17. PEO4 contiene una mutación somática para OBCAM en el Exón 2.

- 5 0256 Archivos de secuencias de trazas de productos F1/R1 SSCPE PCR de exón 2 de OBCAM de ADN de fibroblastos PEO4 y PEO4 obtenidos usando OBCAM EX2 F1 como cebador de secuencia. Fibroblastos PEO4 son homocigotos para un nucleótido C en la posición marcada (*); PEO4 es heterocigoto en esta posición y tiene dos alelos C y G.

0257 Figura 18. PEO4 contiene una mutación somática de sentido erróneo para OBCAM.

- 10 0258 La traslación ExPasy de los dos alelos identificados de la secuencia de nucleótidos de los productos F1/R1 SSCPE PCR de OBCAM EX2 de PEO4, predice una mutación de sentido erróneo de prolina (P) a arginina (R). Cambio somático de nucleótidos: c a g en la posición nucleotídica 75365 (AP000843.3) / 334 (NM_002545.2) da lugar a una sustitución de aminoácido: arginina (R) para prolina (P) en la posición 95 (numeración de proteína inmadura), dentro del primer dominio de inmunoglobulina de OBCAM.

- 15 0259 Fibroblastos PEO4 son homocigotos para el alelo prolina de tipo salvaje, mientras que PEO4 (y PEO1 y PEO1CDDP) son heterocigotos para la secuencia de tipo salvaje y mutada, ambos conteniendo la mutación de sentido erróneo prolina de tipo salvaje y arginina somática. Tipo salvaje se refiere a la secuencia de referencia como se encuentra en las secuencias del GenBank.

- 20 0260 La secuencia de nucleótidos de OBCAM de tipo salvaje y de la secuencia que contiene una mutación somática son mostradas cada una bajo sus respectivas traslaciones de proteína (código de una sola letra de aminoácidos). Nucleótidos y aminoácidos afectados se muestran en negrita. Tipo salvaje se refiere a la secuencia de referencia como se encuentra en la base de datos del GenBank (NM_002545.2 y AP 000843.3).

0261 Figura 19. Secuenciación de bisulfito de isla CpG de OBCAM.

- 25 0262 Se muestra la secuencia de nucleótidos de la isla CpG predicha de OBCAM, correspondiente a los nucleótidos 53134-54032 (GenBank No. de Acceso AC027631.4). Las ubicaciones de los cebadores PCR diseñados para amplificar especialmente un producto 529bp de ADN Metilado (M) o No metilado (U) modificado por bisulfito de sodio se muestran en cursiva, y sus secuencias detalladas abajo. El producto PCR amplificado está en negrita, con la secuencia circundante en texto normal. Los Nucleótidos metilables de CpGs están subrayados.

Cebadores:

- 30 0263 ADN metilado específico modificado por bisulfito de sodio:

OBCAM F1M: 5'-AGGCGTTTAGTGGAGGGGTACGGGC-3'

OBCAM R3M: 5'-TCCCGATACCGCCTCGAAACGAACG-3'

ADN no metilado específico modificado por bisulfito de sodio:

OBCAM- F1U: 5'-AGGTGTTTAGTGGAGGGGTATGGGT-3'

- 35 OBCAM R3U: 5'- TCCCAATACCACCTCAAAACAAACA-3'

0264 Figura 20. Isla CpG de OBCAM está metilada en los tumores de ovario y no metilado en ovarios normales.

0265 Figura 21. La expresión de OBCAM en SKNV3.3 suprime casi por completo la tumorigenicidad en ratones desnudos.

- 40 0266 La línea celular progenitora SKNV3.3 y dos ejemplos de líneas celulares que re-expresan SKNV3.3 transfectado con OBCAM I se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) en ratones desnudos: 3 inyecciones por línea celular con una inyección por ratón. Después de 65 días, los ratones fueron sacrificados y los tumores de la cavidad peritoneal retirados y fotografiados. La cantidad total de tumor presente en la cavidad i.p. está marcadamente disminuida en los ratones inyectados con células SKNV3.3 transfectadas con OBCAM en comparación con las células SKNV3.3 progenitoras. Esta Figura muestra el tumor total retirado de tres ratones inyectados con SKNV3.3 y d cinco ratones inyectados con células SKNV3.3 transfectadas con OBCAM: tres de una línea celular OBCAM-transfectada y dos de la segunda línea celular OBCAM-transfectada. Ningún tumor fue perceptible en el tercer ratón inyectado con la segunda línea celular SKNV3.3 OBCAM-transfectada. La propagación intraperitoneal de tumores que expresan OBCAM después de la transfección de OBCAM también se reduce considerablemente en comparación con las células SKNV3.3 progenitoras.

Ejemplo 1: El papel de OBCAM y NTM en la progresión del cáncer epitelial de ovario (EOC)Análisis LOH 11q24-q25 de ADN pareados de Sangre/Tumor Ovárico

0267 Marcadores de microsatélites polimórficos fluorescentemente marcados seleccionados de la región de cromosoma 11q24-q25 se amplificaron por PCR a partir de ADNs extraídos de tumores ováricos enteros y también a partir de sangre o de tejido ovárico normal como control normal acoplado. Los marcadores usados, en orden de centrómero a 11qter, fueron: 11cen- D11S910- D11S1320- D11S874- D11S4085- D11S969-11qter. Productos amplificados por PCR se separaron en un Analizador Genético ABI 310 usando el software GeneScan (PE Biosistemas). LOH se define como un desequilibrio de 30% o mayor diferencia entre alelos en el tumor en comparación con tejidos normales. La característica más destacada de LOH observado en D11S4085 es la integridad del LOH. Esto es inusual cuando uno considera que el ADN del tumor de ovario fue extraído de tumor entero en lugar de a partir de tejido microdisecado. El tejido tumoral podría normalmente considerarse que contiene una proporción de células normales contaminantes, ej., células estromales. Sin embargo, como la pérdida es tan completa en este caso, se puede inferir de la falta de tejido normal contaminante que la pérdida del alelo D11S4085 es un suceso extremadamente temprano en el proceso de la carcinogénesis ovárica.

Mapeo físico de la región OBCAM/NTM

0268 OBCAM y Neurotrimin son los genes 11q24-q25 asociados a LOH: Después de haber identificado las regiones de LOH, queríamos identificar a continuación los genes de esa región interrumpida por LOH en el cáncer de ovario. Con el fin de identificar los clones BAC de la región 11q24-q25 que contiene los marcadores usados en el estudio de LOH, sus secuencias de nucleótidos correspondientes fueron usadas para una búsqueda BLAST en la base de datos del GenBank HTGS en NCBI. De los marcadores usados, todos excepto D11S969 identificaron clones BAC en la búsqueda de homología de la base de datos HTGS. Las secuencias de nucleótidos de los clones BAC correspondientes fueron analizadas usando el algoritmo Nucleotide Identify X (NIX) en el Centro de Recursos del Proyecto de Mapeo del Genoma Humano de UK (HGMP-RC). NIX permite que se lleven a cabo de forma simultánea varios programas de bioinformática sobre una secuencia de nucleótidos, tales como las búsquedas BLAST contra múltiples base de datos, identificando homología de traslación de nucleótidos y proteínas, llevando a cabo predicciones de exones, predicciones de islas CpG etc. NIX nos ha permitido elaborar un mapa contig de la región incorporando clones BAC superpuestas, identificando los genes en la región y sus posiciones en relación a los marcadores en el estudio (Figura 1).

0269 NIX ha identificado que los dos genes altamente relacionados OBCAM y Neurotrimin son los únicos genes presentes en la región de LOH. El marcador de mayor LOH, D11S4085, está contenido dentro de OBCAM, mientras que Neurotrimin abarca dos de los marcadores: D11S1320 y D11S874. OBCAM y NTM están altamente relacionados, compartiendo 80% y 76% de identidad de nucleótidos y proteínas, respectivamente. En el ratón, sus homólogos respectivos están ubicados cercanos entre sí en una región del cromosoma 9 sinténica con el cromosoma humano 11q24-q25. Es probable, por tanto, que los dos genes han surgido como consecuencia de un suceso de duplicación de genes antes de la divergencia del hombre y el ratón. En un hombre, los dos genes están dispuestos en una orientación 3'-3', con direcciones transcripcionales convergentes (Figura 1).

OBCAM y NTM están expresados en el Epitelio Superficial del Ovario Normal (OSE) pero no en las Líneas Celulares del Cáncer de Ovario

0270 Se extrajo ARN del OSE (HOSE) cultivado humano normal, HOSE principal preoperatoriamente desnudo, y del total del ovario normal entero. RT-PCR mostró que OBCAM y NTM están expresados en el epitelio principal preoperatoriamente desnudo, mientras que sólo la expresión de NTM y no de OBCAM es detectable en HOSE cultivado. La expresión de ambos fue detectable del ovario entero, a pesar de que OSE sólo comprende un componente menor del órgano total.

0271 En contraste, la expresión de uno ni otro gen no era evidente en grado sustancial en un panel de ARNs aislado de las líneas celulares de cáncer de ovario, mama, pulmón, colon y pancreático. Por Northern blot, la expresión fue completamente indetectable en todas las líneas celulares con dos excepciones: CaOv3 (ovario) y WX330 (cáncer de pulmón de células pequeñas), en los que la expresión de NTM fue fácilmente detectable. Curiosamente, el tamaño de transcripto de NTM en CaOv3 es más pequeña que el esperado para el NTM de longitud completa. El análisis RT-PCR indicó que el transcripto es más pequeño que el esperado debido a un ARNm truncado 5', el alcance exacto del cual es indeterminado, y posiblemente surge como un resultado de mutación 5' acoplada con el uso de un promotor alternativo intrónico.

Islas CpG OBCAM y NTM son Metiladas en Líneas Celulares y se Correlaciona con la Falta de Expresión

0272 El estado de metilación de las islas CpG de OBCAM y NTM fue evaluado por MS PCR con pares de cebadores para detectar alelos metilados y no metilados en un rango de líneas celulares de cáncer de origen ovárico, de mama, de pulmón, de colon y de próstata. Los resultados se presentan en las Tablas 1 y 2. Ensayamos el mismo rango de líneas celulares para el nivel de la expresión de OBCAM y NTM por RT-PCR y se compararon los resultados con el estado de metilación determinado en el ensayo MS PCR. Se encontró una correlación entre metilación de las islas CpG respectivas y la falta de expresión detectable; A la inversa, la falta de metilación se correlaciona con la

ES 2 395 121 T3

expresión génica. Una excepción a esta correlación es la línea celular del cáncer de ovario OAW28, que a pesar de no metilación aparente, no muestra expresión de ninguno de los genes. Esto puede ser atribuible a metilación no detectable por este ensayo en particular: se encuentra ya sea fuera de la región siendo amplificada o alternativamente entre los cebadores MS PCR ya que MSP solo detecta la presencia/ausencia de metilación en el sitio de unión del cebador en sí.

Tabla 1: Estado de metilación de NTM en líneas celulares de cáncer como se determina por análisis MS-PCR.

FM=totalmente metilado

HM=semimetilado

U=no metilado

10	PE016	FM
	PEA1	FM
	PEA2	FM
	OVCAR 4	FM
	OVCAR 5	FM
15	OAW 42	FM
	A2780	FM
	SKOV3	FM
	OVCAR 3	HM
	PE01	HM
20	PEO1 CDDP	HM
	PE04	HM
	PE06	HM
	PE014	HM
	PE023	HM
25	OAW28	U
	59 M	U
	CaOV3	U
	MDA.MB.2	FM
	31	
30	ZR75.1	FM
	MCF7	FM
	T47D	HM
	LoVo	FM
	HT-29	FM
35	HRT-18	FM
	HCT-15	FM
	SW48	FM
	DU145	FM

	PC-3	FM
	LNCaP	HM
	PANC1	FM
	HELA	FM
5	K562	HM
	FATO	U
	WX330	U
	HL60	U

Tabla 2: Estado de metilación de OBCAM en líneas celulares de cáncer por el análisis MS-PCR.

- 10 FM=totalmente metilado
 HM=semimetilado
 FM/HM= totalmente o semi-metilado
 U=no metilado
 =no determinado

15	PE01	FM/HM
	PE01 CDDP	FM
	PE016	FM
	OVCAR 3	FM
	OVCAR 4	FM
20	OSCAR5	FM
	OAW 42	FM
	A2780	FM
	PEA1	-
	PEA2	FM
25	PE04	FM
	PE06	FM
	PE014	-
	OAW 28	U
	59 M	U
30	CaOV3	U
	MCF7	FM
	ZR75.1	FM/HM
	T47D	HM
	HT-29	FM
35	HRT-18	FM
	HCT-15	FM
	SW48	FM

	DU145	FM
	PC-3	FM/HM
	LNCaP	HM
	HELA	FM
5	K562	HM
	PANC1	HM
	FATO	U
	WX330	U
	HL60	U

10 OBCAM y NTM son Metilados en Tumores Principales de Ovario

0273 Realizamos PCR MS para detectar alelos metilados y no metilados para OBCAM y NTM en 13 pares correspondientes ováricos de ADN de tumor/normal (o sangre). Un conjunto representativo de ensayos MSP en 13 pares de sangre/tumor incluyendo muestras de control de ADN metilado (Intergen) y un ADN no metilado (línea celular HL60) se muestran en la Figura 3, y un resumen de los resultados se presenta en la Figura 6. Observamos que NTM acompaña frecuentemente la metilación de OBCAM y los dos pueden ser considerados concordantes. Esto es un acuerdo con la falta de asociación de supervivencia con LOH en OBCAM (D11S4085, que indica que la inactivación de OBCAM es un suceso temprano en este proceso).

Materiales y Métodos

Cáncer de Ovario que Coinciden con Muestras Pareadas de Sangre (normal)/Tumor

20 0274 ADN de 65 muestras apareadas de sangre (o tejido normal de ovario embebido en parafina) y de tumor de ovario embebidas en parafina se extrajo usando el minikit de ADN QIAamp según el protocolo del fabricante (QIAGEN).

Análisis de Pérdida de Heterocigosidad

25 0275 Se amplificaron productos PCR de 6 marcadores microsatélites polimórficos marcados con fluorescencia de la región 11q24-q25 a partir del panel de ADNs ováricos apareados normal/tumor: Productos PCR cen-D11S910-2- D11S1320- D11S874- D11S4085- D11S969- 11qter se separaron y analizaron en un Analizador Genético ABI 310 usando software Genescan (PE Biosistemas).

Análisis Bioinformático de la Región 11q24-q25 del Cromosoma Humano:

30 0276 Clones BAC que contienen los seis marcadores 11q24-q25 polimórficos usados para detectar LOH se identificaron de la base de datos de las Secuencias Genómicas de Alto Rendimiento (HTGS) in el GenBank por búsqueda BLAST con secuencias de marcadores. Las secuencias de clones BAC identificados fueron luego analizadas usando el algoritmo Nucleotide Identify X (NIX) (Centro de Recursos del Proyecto de Mapeo del Genoma Humano, Hinxton, Reino Unido). De esta manera, fue montado un mapa contig BAC de la región detallando posiciones de genes conocidos en relación con marcadores microsatélites.

35 PCR Transcriptasa Inversa (RT-PCR)

40 0277 Se llevó a cabo la extracción total de ARN de las líneas celulares usando Reactivo TRI (Sigma, Dorset, Reino Unido). La primera cadena de ADNc se preparó a partir 1µg DNaseI-tratada usando un kit de síntesis de ADN de primera cadena (Roche, Reino Unido), y alícuotas de 2µl luego usadas como plantilla en 25 µl de reacciones PCR. Alternativamente, para números de células más pequeños, se preparó ARN total tratado con DnaseI usando columnas Absolutely RNA Miniprep spin (Stratagene) y la primera cadena de ADN se preparó como se ha descrito.

Expresión del Tejido

45 0278 Se adquirieron Northern Blots de Tejido Múltiple (Humano I y Humano II) y paneles de ADNc de Tejido Múltiple (Humano I y Humano II) de BD Clontech, Basingstoke, Reino Unido. MTNs se hibridaron con sondas de ADNc OBCAM y NTM de longitud total amplificadas por PCR, usando tampón ExpressHyb (BD Clontech) como se recomienda. Los blots se re-hibridaron con una sonda de control de β-actina (BD Clontech). Los paneles MTC se analizaron por PCR con pares de cebadores OBCAM y NTM diseñados para amplificar los productos de ADNc de longitud completa.

PCR Específica de Metilación (MS PCR)

0279 ADNs genómicos aislados de los pares apareados normal/tumoral ováricos (arriba) y paneles de líneas celulares (cáncer de ovario, mama, pulmón, colon y pancreático) se modificaron por tratamiento de bisulfito usando el kit de Modificación CpG (Intergen) de acuerdo al protocolo recomendado. ADN metilado de control se adquirió de Intergen. El ADN modificado con bisulfito se amplificó por PCR con pares cebadores que reconocen específicamente los alelos metilados y no metilados, respectivamente, de las islas CpG de NTM y OBCAM humanos. Los pares cebadores y condiciones de amplificación fueron como sigue.

0280 Con el fin de determinar la extensión de la metilación de la isla CpG en las islas CpG de OBCAM y NTM, ADN tratado con bisulfito amplificado por PCR específica de metilación se subclonó en el vector de clonación pGEM-T Easy TA (Promega). Seis subclones correspondientes a cada producto de PCR fueron secuenciados usando química Big Dye (PE BioSystems) siguiendo métodos estándares.

Azacitidina y Re-expresión TSA

0281 En experimentos de desmetilación de la re-expresión, se sembraron 5x10⁶ células (MDAMB23.1 para OBCAM; MDAMB23.1 y T47D para neurotrimin) y se dejaron adherir durante 24 horas. Las células fueron incubadas en presencia de 10 µM de azacitidina (Sigma) y 0.3 µM TSA se añadió para las 24 horas finales de los 4 días. Las células fueron cosechadas, el ARN aislado, la primera cadena de ADNc sintetizada y las reacciones RT-PCR llevadas a cabo con cebadores PCR de OBCAM, NTM y actina.

Transfección de OBCAM en SKOV-3

0282 La secuencia de codificación total de OBCAM humano más la secuencia de consenso Kozak y la superposición 3'LTR fueron amplificadas por PCR a partir de ARN del epitelio superficial del ovario humano normal y subclonadas en el vector de clonación TA pGEM-T Easy (Promega). El par de cebadores de PCR usados para la amplificación fueron:

OPCML F1: 5'-AGTTGTGGCTGTGCGAGAATG-3'

nucs 34-53

OPCML R1: 5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3'

Nucs 1110-1091

Numeración de nucleótidos del GenBank con Acceso NM_002545 ARNm (Secuencia de Referencia NM_002454.2). El inserto OBCAM se escindió luego con NotI y re-subclonado en el vector de expresión mamífero Zeo ADNpc3 digerido con NotI.1 (Invitrogen). La secuencia del inserto fue luego verificada antes de su uso en la transfección. ADNs plásmidos que corresponden a constructos sentido y antisentido de OBCAM y el vector parental se prepararon mediante métodos estándar (QIAGEN) y digeridos con PvuI. 1µg y 2µg de constructos linealizados por PwI y el vector se transfectaron en la línea celular SKOV-3 resistente a la neomicina clonal SKNV3.3 en presencia de lipofectina.

Selección sobre Zeomicina (Invitrogen)

0283 40 horas después de la transfección, las células fueron divididas 1:6 y cultivadas en presencia de la selección de antibióticos Zeomicina. Las colonias individuales fueron luego seleccionadas para el análisis 3 semanas después de la imposición de selección de antibióticos.

0284 Las transfecciones indican que los transfectantes OBCAM anti-sentido y vectores de control crecen más virulentamente que los transfectantes OBCAM sentido sugiriendo que hay un efecto funcionalmente supresivo en el crecimiento.

Discusión

0285 Hemos realizado un análisis de LOH más refinado en EOC de la región 11q24-q25 en 65 muestras normales/tumores emparejadas e identificamos una tasa elevada de 56% de LOH en el gen OBCAM en el marcador D11S4085. En adición, también se detectó LOH de 40% dentro del gen homólogo, neurotrimin (NTM o NTM), en los marcadores D11S1320 y D11S874. El análisis de parámetros clínico-patológicos no muestra ninguna asociación de LOH con la supervivencia adversa del paciente, indicando que la pérdida de estos genes es un suceso temprano en la carcinogénesis de ovario. También prueba que tampoco es detectado el gen de supervivencia en nuestros estudios de LHO previos. PCR específica de metilación de ADN aislado de 43 pares de tumores normales/ováricos apareados y 6 ADNs sólo de tumor ha identificado tasa de metilación de isla CpG de 76% para ambos OBCAM y NTM, con 86% de concordancia entre genes. La secuenciación con bisulfito confirmó la presencia de metilación extensa en las islas CpG de ambos genes. De 12 líneas EOC, OBCAM fue totalmente metilado en 75% de las líneas celulares, 0% fueron parcialmente metilados y 25% fueron no metilados. Para HNT/NTM, en 13 líneas EOC, 54% fueron totalmente metilados, 23% parcialmente metilados, 23% no metilados. La re-expresión de ambos genes se

logró por tratamiento de azacitidina con Trichostatin A (TSA), proporcionando pruebas concluyentes de que la metilación de la isla CpG es el mecanismo que subyace bajo la falta de expresión de estos genes. Es evidente a partir de los estudios de MS-PCR que la metilación de la isla CpG OBCAM se encuentra con la de NTM, y puede ser un requisito previo para que ocurra metilación de NTM. Esto combinado con los datos de LOH sugiere que de los dos genes, OBCAM es el más importante en los sucesos tempranos de la enfermedad. Consecuentemente, hemos transfectado OBCAM en un derivado clonal de la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3, bajo el control del promotor CMV, y muestra los siguientes efectos. Tres observaciones sugieren función de NTM/OBCAM como supresores. En primer lugar hay evidencia de que algunos clones SKOV3 de sentido transfectados con NTM demuestran supresión de tumorigenicidad en comparación con los clones antisentido, pero la heterogeneidad clonal de SKOV3 hace estos datos difíciles de interpretar. Por otra parte, hubo algunas evidencias de que morfológicamente hubo inhibición por contacto asociada con los clones SKOV3 de sentido transfectados con NTM. Finalmente, hemos notado que el derivado clonal de SKOV3 (SKNV3.3) transfectado con OBCAM antisentido y vector de control demuestra un crecimiento más rápido en comparación con OBCAM sentido transfectado en la misma línea clonal SKOV3. Hay una reducción aparente del 50% en las tasas de crecimiento de los clones SKOV3 de OBCAM transfectados en comparación con las líneas celulares clonales transfectadas SKOV3 de OBCAM antisentido. Correlacionando los estudios LOH y de metilación, proporcionamos evidencia de la existencia de dos coincidencias de inactivación según el mecanismo Knudsen clásico de dos coincidencias de inactivación del gen supresor de tumores (Knudsen AG, 1971 Proc Natl Acad Sci 68(4) p820-823). También destacó las muestras de tumor en las que sólo un mecanismo de inactivación (ya sea LOH o metilación) se presentó, permitiéndonos objetivar estas muestras para la detección de mutaciones en el gen OBCAM.

0286 Esta es la primera descripción de la implicación de la familia IgLON, y en particular de OBCAM y Neurotrimin, en el desarrollo de cualquier forma de cáncer, o de hecho, en cualquier forma de enfermedad humana.

Ejemplo 2: SKNV3.3 es metilado para OBCAM y no expresa OBCAM

0287 La línea celular SKNV3.3 es un derivado clonal resistente a la neomicina de la línea celular de cáncer de ovario SKOV3. Hemos mostrado por RT-PCR cuantitativa que no expresa OBCAM y por MS-PCR que la isla CpG de OBCAM es metilada. Por otra parte, la desmetilación tras la exposición *in vitro* de SKVN3.3 a 5'-aza-2'-deoxicitidina da lugar a re-expresión de OBCAM. Fue por tanto seleccionado para los estudios funcionales de OBCAM.

0288 La isla CpG de OBCAM está totalmente metilada como se determina en el ensayo MS-PCR. Consecuentemente, la expresión OBCAM en SKNV3.3 es reprimida por este mecanismo epigenético. Con el fin de probar que la metilación de la isla CpG es el mecanismo de represión de la expresión de OBCAM, las células SKNV3.3 se expusieron a la 5-aza-2'-deoxicitidina y se ensayaron para re-expresión de OBCAM por RT-PCR, Southern blot e hibridación con una sonda específica de OBCAM.

0289 1×10^5 células SKNV3.3 (Pasaje 6) se sembraron en un matraz de cultivo de tejidos de 25cm^3 en 10ml de medio. El medio se reemplazó después de 24 horas y se añadió 5'-aza 2'-deoxicitidina (Sigma A3656) para dar una concentración final de $20\mu\text{M}$. Un matraz duplicado de células no recibió exposición de azacitidina (control). Después de 4 días las células de ambos matraces se cosecharon y se preparó ARN total tratado con DNaseI usando el kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene). La primera cadena de ADNc fue sintetizada usando el Kit de síntesis de primera Cadena de ADNc (Roche) y se usaron alícuotas de $2\mu\text{l}$ de ADNc por reacción RT-PCR.

0290 RT-PCR actina se llevó a cabo para confirmar la integridad de la primera cadena de ADNc a partir de células SKVN3.3 de control y tratadas con azacitidina. Iguales alícuotas de cada reacción PCR Actina separadas en gel de agarosa confirmaron la integridad de ambas muestras y la concentración igual de ADNc por muestra.

Reacción RT-PCR de OBCAM:

0291

OPCML F4/R6 RT-PCR (producto 474bp) realizado en una reacción $25\mu\text{l}$.

45 Cebadores PCR usados son (numeración de nucleótidos corresponde al Número de Acceso del GenBank NM_002545)

OPCML F4: 5'-TACCATAGATGACCGGGTAA-3'

nucs: 221-240

OPCML R6: 5'-TTCCGCACATCGGGCGCAGC-3'

50 nucs: 694-675

0292 Los productos de las reacciones PCR OBCAM se separaron en tamaño en un gel de agarosa de 2%, Southern blot durante la noche sobre membrana de nylon MSI, y el ADN luego reticulado por UV a la membrana.

0293 El producto PCR OBCAM Exon2 F2/ OPCML R6, purificado a través de una columna de purificación PCR QIAquick (QIAGEN), se etiquetó con PCR $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Los cebadores de PCR fueron las siguientes (numeración de nucleótidos correspondiente al Número de Acceso del GenBank NM_002545):

OBCAM Exon 2 F2: 5'-ATAGACCCTCGTGTGATCAT-

5 3' nucs 300-319

OPCML R6: 5'-TTCCGCACATCGGGCGCAGC-3'

nucs: 694-675

0294 Tras hibridación durante la noche, el blot fue lavado para eliminar la sonda no unida, y se expuso el blot a película de rayos X durante 1 hora a -70°C y luego se desarrolló.

10 0295 La re-expresión de OBCAM es claramente evidente en las células SKNV3.3 expuestas a 5'-aza 2'-desoxicitidina $20\mu\text{M}$ durante 4 días. Por el contrario, ninguna expresión de OBCAM es detectable en las células SKNV3.3 de control después de 4 días sin el tratamiento de 5'-aza 2'-desoxicitidina (Fig. 13). El producto PCR actina se amplificó a la misma intensidad de ambas células de control y tratadas, confirmando la integridad del ARN aislado y ADNc primera cadena sintetizado.

15 **Ejemplo 3: Estudios Funcionales de OBCAM en SKVN3.3 (derivado clonal de SKOV3)**

Transfección de OBCAM en SKNV3.3

0296 La secuencia completa de codificación de OBCAM humano más la secuencia de consenso Kozak y la superposición 3'UTR se amplificó con PCR a partir de ARN de epitelio superficial de ovario humano normal y subclonado en el vector de clonación TA p-GEM-T Easy. El par de cebadores PCR usados para amplificar nucleótidos 34-1110 (Secuencia de Referencia NM_002454.2) fue:

20

OPCML F1: 5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3'

nucs 34-53

OPCML R1: 5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3'

nucs 1110-1091

25 amplificando un producto PCR 1077bp. El inserto OBCAM fue luego extirpado con NotI y resubclonado en el vector de expresión mamífero ADNpc3.1 Zeo (zeomicina-resistente) digerido con NotI (Invitrogen) en ambas orientaciones sentido y antisentido. La secuencia de inserto fue luego verificada antes de su uso en la transfección. ADNs plásmidos que corresponden a las construcciones OBCAM sentido y antisentido y el vector parental se prepararon mediante métodos estándar (QIAGEN) y digeridos con PvuI.

30 0297 $1\mu\text{g}$ y $2\mu\text{g}$ de constructos linealizados con PvuI y el vector fueron transfectados en la línea celular derivada clonal de SKOV-3 etiquetada con neomicina, SKNV3.3.

0298 Las líneas celulares se mantuvieron en RPMI 1640 con Suero Fetal de Ternero al 10% inactivado por calor (FCS) y penicilina (100unidades/ml), estreptomycin (100 μg /ml) y G418 y Zeocin (Invitrogen) según sea apropiado.

35 0299 2×10^5 células de SKNV3.3 se sembraron por placa de 60 mm en 4 ml de medio. 24 horas más tarde cuando eran 50% confluentes, las células se transfectaron separadamente con $2\mu\text{g}$ de constructos linealizados: constructos OBCAM sentido o antisentido ADNpc3.1 zeo, o vector ADNpc3.1 zeo que no contiene inserto, usando reactivo LIPOFECTIN (Life Technologies GIRBO BRL) según los protocolos de los fabricantes. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, cada placa de células fue dividida una de cada seis y las células transfectadas fueron luego seleccionadas con $250\mu\text{g}$ /ml de zeocin. A las tres semanas las colonias fueron recogidas en placas de 24 pocillos y las líneas celulares clonales establecidas.

40

OBCAM suprime el crecimiento in vitro:

0300 La transfección de OBCAM en células SKNV3.3 da lugar a crecimiento suprimido en comparación con las células de control SKNV3.3 *in vitro* (figura no mostrada).

OBCAM Suprime el Crecimiento y la Propagación Tumoral *in vivo*

45 0301 Se cosecharon células de control SKNV3.3 fase de registro y células OBCAM transfectadas y se inyectaron 5×10^6 células bien por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.) en los flancos de ratones *desnudos*, con 6 inyecciones s.c. y 3 i.p. por línea celular. Las mediciones del tamaño de tumores s.c. fueron tomadas cada semana durante 4 semanas. Los ratones que recibieron las células vía inyección i.p. fueron sacrificados 65 días tras la inyección y los tumores extraídos de la cavidad peritoneal, pesados y fotografiados.

0302 La transfección de OBCAM en SKNV3.3 da lugar a crecimiento marcadamente suprimido del tumor subcutáneo (Fig. 14) comparando células SKNV3.3 transfectadas con el constructo OBCAM de expresión 'sentido' (transfectantes sentido) y células de control SKNV3.3 (Controles).

5 0303 La transfección de OBCAM en SKNV3.3 casi completamente eliminó el crecimiento del tumor y la propagación intraperitoneal, en comparación con el crecimiento tumoral y la propagación i.p. observados con las células SKNV3.3 parentales (Figura 21; ver Ejemplo 8).

La Transfección OBCAM Mejora la Agregación Celular:

10 0304 Las células de control SKNV3.3 fase registro y transfectadas por OBCAM se tripsinizaron y se resuspendieron en medio que contenía FCS 10%. 1×10^6 células se resuspendieron en 1ml de medio y pasado a través de una aguja de calibre 21 para asegurar la creación de una suspensión de células individuales. Las suspensiones de células se incubaron en CO₂ 5% a 37°C. En momentos definidos, se retiraron alícuotas con una pipeta de orificio amplio, y las células individuales se contaron con un hemocitómetro.

15 0305 La transfección OBCAM en SKNV3.3 (constructo expresando sentido) da lugar a una tasa mejorada de agregación de células comparadas con la observada para las células de control SKNV3.3 (Fig. 15). La transfección de constructo OBCAM que expresa antisentido da lugar a una tasa reducida de agregación de células en comparación con SKNV3.3 parental.

Ejemplo 4: Estructura de Exones del Gen OBCAM Humano

20 0306 La estructura de exones del gen OBCAM humano se determinó en un análisis bioinformático. El ARNm OBCAM humano secuencia de referencia NM_002545.2 se comparó con la secuencia del Proyecto del Genoma Humano disponible en la base de datos del GenBank HTGS usando una búsqueda de homología BLAST2. La comparación identificó que OBCAM consiste de al menos 7 exones. La estructura de exones derivada con la ubicación de límites intrón-exón se muestran en la Fig. 16. La secuencia exónica se resalta en amarillo y la secuencia de intrones que flanquean los exones está en texto normal. Las numeraciones de nucleótidos se refieren a las correspondientes a la base de datos del GenBank (números de acceso para los cuales están dadas). La secuencia de nucleótidos para Exón 1 está incompleta en el área que abarca el límite exón/intrón 1 debido a la falta de Secuencia disponible del Proyecto del Genoma Humano en el GenBank con Acceso AC027631.4.

Ejemplo 5: Detección de Mutación OBCAM mediante Electroforesis Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (SSCPE)

30 0307 Después de la predicción del análisis bioinformático de la estructura del gen OBCAM humano fueron diseñados cebadores para amplificar los 7 exones identificados del gen OBCAM. El exón 2 fue analizado con dos conjuntos de cebadores superpuestos debido a la limitación de tamaño del producto PCR útil para el análisis SSCPE. Fueron extraídas muestras de ADN usadas en el análisis SSCPE del tumor de ovario y se aparearon a tumores de ovario de archivo de tejido normal embebidos en parafina, y líneas celulares de cáncer de ovario.

35 0308 Los cebadores OBCAM específicos de exón usados fueron como sigue. Los tamaños del producto PCR se dan en paréntesis.

0309 En la Fig. 16, las ubicaciones de cebadores sentido y antisentido para SSCPE se destacan en subrayado simple y doble, respectivamente. Las secuencias intrónicas y exónicas están no resaltadas y en negrita, respectivamente.

Exón 1 (188bp)

40 OBCAM EX1 F3: 5'-GACCAGGACTGTGCGGCTGC-3'

nucs 54514-54533 AC027631.4

OPCML R3: 5'-CGTCACGTTGTCCATAGCTT-3'

nucs: 188-169 NM_002545.2

Exón 2/1 (175bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AC012234.6)

45 OBCAM EX2 F1: 5'-CACCCTCCCTGCCTCACTG-3'

nucs 75226-75245

OBCAM EX2 R1: 5'-CATCCACATTTTGGATCATG-3'

nucs 75400-75381

Exón 2/2 (180bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AC012234.6)

OBCAM EX2 F2: 5'-ATAGACCCTCGTGTGATCAT-3

nucs 75331-75350

OBCAM EX2 R2: 5'-TGGCAACCCCAGATCCAGCT-3'

nucs 75510-75491

- 5 Exón 3 (179bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AP000843.3)

OBCAM EX3 F1: 5'-CAGGTATTTCTTCTATCCTG-3'

nucs 37032-37051

OBCAM EX3 R1: 5'-GTCCTCCAGGTCAGCACCTT-3'

nucs 37210-37191

- 10 Exón 4 (214bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AP000843.3)

OBCAM EX4 F1: 5'-TGGTTACACAGTTTCCTGAT-3'

nucs 2881-2900

OBCAM EX4 R1: 5'-AGAACCCCCTGGCTGCAGGT-3'

nucs 3094-3075

- 15 Exón 5 (195bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AP000843.3)

OBCAM EX5 F1: 5'-GTGCGTGCATGCCTGTGCAT-3'

nucs 3466-3485

OBCAM EX5 R1: 5'-CAGAACTGTCCAGGTGTCAT-3'

nucs 3660-3641

- 20 Exón 6 (198bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AP000843.3)

OBCAM EX6 F1: 5'-TAGCAATGTCTTCCCTCTTG-3'

nucs 4028-4047

OBCAM EX6 R1: 5'-GCATCCAGGCTTCCAGCACT3'

nucs 4225-4206

- 25 Exón 7 (176bp): (numeración de nucleótidos del GenBank AP000843.3)

OBCAM EX7 F1: 5'-TCCTTGGGTGTATGCTAATG-3'

nucs 19945-19964

OBCAM EX7 R1: 5'-GCGTTGCTCAGAGGACCTAG-3'

nucs 20120-20101

- 30 0310 Se ha llevado a cabo SSCPE para cada exón OBCAM en ADN normales/tumorales, apareado de cáncer de ovario, ADN tumorales y líneas celulares. Manteniendo la alta tasa de LOH y metilación de islas CpG observadas para OBCAM, la frecuencia esperada de mutación somática es baja. Una mutación somática de sentido erróneo que ha sido detectada por SSCPE y la secuenciación se describe abajo.

Mutación OBCAM Somática en la Serie de Línea Celular de Cáncer de Ovario PEO

- 35 0311 SSCPE de productos PCR OBCAM Exon2 F1/R1 identificó un 'dsplazamiento de banda en el ADN de una serie de líneas celulares derivadas de un paciente con cáncer de ovario durante el curso de su enfermedad. PEO1 representa una línea celular de cáncer de ovario sensible al platino derivada del paciente tempranamente en el curso de su enfermedad. La línea celular resistente al platino PEO4 se derivó del mismo paciente en la recaída después de quimioterapia con cisplatino. La línea celular PEO1CDDP se derivó de PEO1 mediante la exposición *in vitro* a cisplatino y representa un modelo *in vitro* de la resistencia a platino. ADN de fibroblastos, que representa ADN normal, fue aislado del paciente al mismo tiempo que la línea celular PEO4 se estableció (PEO4 Fibroblastos).
- 40

0312 Los productos PCR Exon2 F1/R1 amplificados de Fibroblastos PEO1, PEO1CDDP, PEO4 y PEO4 fueron secuenciados con los mismos cebadores usados en el PCR original. Los archivos de rastreo de secuencias (Fig. 17) claramente indican un pico heterocigoto que corresponde a la presencia de un nucleótido C y un nucleótido G en la posición 334 (Número de Acceso del GenBank NM_002545, mostrado en la Figura 7) en los productos PCR de PEO1, PEO1CDDP, y PEO4. La posición 334 (NM_002545) es homocigótica para un C en el producto PCR del Fibroblasto PEO4 (macado por *). La secuencia de tipo salvaje (referencia de secuencia de nucleótidos NM_002545) contiene un residuo C en esta posición, alterando un codón CCA a CGA. La traslación (usando ExPasy) de la secuencia de nucleótidos que abarca esta posición predice que la prolina de aminoácido de tipo salvaje correspondiente (P) es alterada a una arginina (R), correspondiente al residuo aminoácido 95 de la secuencia de proteína OBCAM inmadura (Fig. 18). Se cree que este residuo está ubicado en el primer dominio de inmunoglobulina de OBCAM (Figura 7 y Número de Acceso del GenBank NP_002536).

0313 Fibroblastos PEO4 son de tipo salvaje homocigotos (prolina) mientras que PEO1, PEO1CDDP, y PEO4 son mutantes heterocigotos de tipo salvaje/de sentido erróneo (prolina/arginina). La sustitución de un residuo de arginina para una prolina en esta posición puede dar lugar a una confirmación estructural alterada de OBCAM, y por tanto función OBCAM alterada.

0314 Como todas las líneas celulares derivadas durante el curso temporal de la enfermedad de este paciente contienen esta mutación de sentido erróneo, podemos suponer que la mutación fue un suceso temprano en el curso de su enfermedad. Como los Fibroblastos PEO4, correspondientes al ADN normal, son de tipo salvaje, esta alteración es un suceso somático.

0315 Esta es la primera mutación somática identificada para OBCAM en el cáncer, incluyendo cáncer de ovario.

Ejemplo 6: OBCAM es no metilado en el ovario humano normal

0316 Extrajimos ADN y ARN de 5 muestras de de ovario humano normal. MS-PCR de OBCAM de estas muestras muestra que la isla CpG de OBCAM no está metilada. El producto 600bp amplificado por MS-PCR contiene 58 CpGs. La secuenciación a lo largo del producto MS-PCR de OBCAM a partir de estos ovarios normales no mostró evidencia de CpGs metilado en el producto.

0317 En contraste, la secuenciación del producto MS-PCR a partir de las líneas celulares de cáncer de ovario y tumores principales que son metilados en el ensayo MS-PCR, muestran metilación amplia en toda la región de la isla CpG amplificada.

Ejemplo 7: Isla CpG OBCAM es metilada en tumores de ovario y no metilada en ovario normal.

0318 Los ADN de dos ejemplos de tumores de ovario y de dos ejemplos de ovarios normales fueron modificados químicamente por tratamiento de bisulfito. PCR específica de metilación fue luego llevada a cabo con cebadores diseñados para discriminar ADN modificado por bisulfito de isla CpG de OBCAM Metilada (M) y No metilada (U). Un producto PCR 529bp metilado o no metilado específico se amplificó específicamente a partir de ADNs del tumor de ovario o del ovario normal, respectivamente, usando los cebadores detallados arriba (Secuenciación Isla CpG OBCAM). El producto PCR amplificado corresponde a nucleótidos 25-553 de la Fig. 19 (Secuenciación Bisulfito Isla CpG OBCAM). Los productos PCR fueron luego subclonados en pGEM-T Easy y subclones individuales, representando alelos individuales, fueron secuenciados luego y anotada la presencia o ausencia de nucleótidos C metilados en CpGs. Fig. 20 representa la extensión de CpG Cs metilados presentes en los ejemplos de tumores de ovario y de ovarios normales. La numeración de nucleótidos en esta ubicación de CPG Cs como se muestra en la Fig. 19, y el número de CpG es la numeración secuencial de los CpGs ubicados dentro de 526bp de la isla CpG de OBCAM secuenciada. Los resultados de secuenciación de seis alelos se muestran para cada uno de los dos ejemplos de tumor de ovario y dos alelos para cada uno de los ejemplos de ovario normal. El cuadrado negro relleno representa un CpG metilado, el cuadrado vacío representa un CpG no metilado, y el cuadrado que contiene líneas verticales representa casos donde el estado de metilación de la CpG no fue determinado. Fig. 20 muestra que la isla CpG está ampliamente metilada en tumores ováricos y no metilada en ovarios normales.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico del cáncer en un paciente que comprende los pasos de poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico del paciente con
 - (a) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc de OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (b) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc de NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (c) ambos (a) y (b).
2. Un método de predicción de las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente que comprende los pasos de poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico del paciente con
 - (a) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc de OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (b) un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida de forma selectiva al ADNc de NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (c) ambos (a) y (b).
3. Un método para determinar la progresión de una enfermedad cancerosa en un paciente que comprende los pasos de poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico del paciente donde el gen OBCAM del paciente se ha perdido o inactivado con un ácido nucleico que selectivamente hibrida al gen NTM o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que selectivamente hibrida al ADNc de NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos.
4. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones de 1 a 3 en el que se determina si el nucleótido correspondiente al nucleótido 334 como se numera en la Figura 7 en el ácido nucleico del paciente es el mismo que en la Figura 7 o no.
5. Un método según la Reivindicación 4 en el que la determinación implica un ácido nucleico según la Reivindicación 40.
6. Un método de diagnóstico de cáncer en un paciente que comprende los pasos de determinar el grado de metilación del gen OBCAM o NTM en una muestra que contiene el gen OBCAM o NTM del paciente; y comparar el nivel de metilación del gen OBCAM o NTM de la muestra del paciente con el nivel de metilación en una muestra de control; en el que si la muestra del paciente tiene un grado mayor de metilación del gen OBCAM o NTM comparada con la muestra de control esto es indicativo de cáncer.
7. Un método de predicción de la perspectiva relativa de un resultado particular de un paciente de cáncer que comprende los pasos de
 - (i) determinar el grado de metilación del gen OBCAM o NTM en una muestra que contiene el gen OBCAM o NTM del paciente;
 - (ii) comparar el nivel de metilación del gen OBCAM o NTM de la muestra del paciente con el nivel de la metilación en una muestra de control; y
 - (iii) si la muestra del paciente tiene un grado mayor de metilación del gen OBCAM o NTM en comparación con la muestra de control esto es indicativo de una menor probabilidad de un resultado exitoso.
8. Un método para determinar la progresión de una enfermedad cancerosa en un paciente que comprende los pasos de
 - (i) determinar el grado de metilación del gen NTM en una muestra del paciente que contiene el gen NTM del paciente;
 - (ii) comparar el nivel de metilación del gen NTM de la muestra del paciente con el nivel de metilación en una muestra de control;

y si el nivel de metilación de NTM está aumentado en comparación con la muestra de control esto es indicativo de una progresión en la enfermedad.
9. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8 en el que se analiza la metilación de la isla CpG de OBCAM o NTM.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el cáncer o tumor es un cáncer o tumor de ovario o un cáncer o tumor de colon.
11. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-2 donde el ácido nucleico es contactado con un ácido nucleico según la opción (a) y el cáncer es cáncer de ovario.
12. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-2 donde el ácido nucleico es contactado con un ácido nucleico según la opción (b) y el cáncer es cáncer colorrectal.
13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la muestra es una muestra del tejido en el que se sospecha cáncer o en el que el cáncer puede ser o ha sido hallado.
14. Un método según las Reivindicaciones 1 a 11 donde la muestra es una muestra de ovario y el cáncer es cáncer de ovario.

15. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones de 1 a 9, 12 o 13 donde la muestra es una muestra de colon y el cáncer es cáncer colorrectal.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que selectivamente hibrida al ADN de dicho gen OBCAM o NTM o dicha secuencia ADNc de OBCAM o NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos, comprende además una etiqueta detectable.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que selectivamente hibrida como se dijo es monocatenario.
18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que selectivamente hibrida como se dijo tiene menos de 10000 pares de bases cuando el ácido nucleico es bicatenario o de bases cuando el ácido nucleico es monocatenario.
19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que selectivamente hibrida como se dijo tiene menos de 1000 pares de bases cuando el ácido nucleico es bicatenario o de bases cuando el ácido nucleico es monocatenario.
20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que hibrida como se dijo tiene de 10 a 100 pares de bases cuando el ácido nucleico es bicatenario o de bases cuando el ácido nucleico es monocatenario.
21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el ácido nucleico que hibrida como se dijo tiene de 15 a 30 pares de bases cuando el ácido nucleico es bicatenario o de bases cuando el ácido nucleico es monocatenario.
22. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 donde el ácido nucleico que hibrida como se dijo comprende una porción de ADNc de OBCAM.
23. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2 donde el ácido nucleico que hibrida como se dijo comprende una porción de ADNc de NTM.
24. Un método según la Reivindicación 22 o 23 donde la porción es una porción monocatenaria.
25. Un método según la Reivindicación 24 donde dicha porción es capaz de amplificar una porción del gen OBCAM o el gen NTM o el ADNc o ARNm de OBCAM o el ADNc o ARNm de NTM en una reacción de amplificación de ácido nucleico.
26. Un método de diagnóstico de cáncer en un paciente que comprende los pasos de
- (i) determinar en una muestra que contiene proteína derivada del paciente
 - (a) la cantidad o actividad del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la cantidad o actividad del polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b); y
 - (ii) comparar:
 - (a) la cantidad o actividad del polipéptido OBCAM de la muestra del paciente con la cantidad o actividad respectiva del polipéptido OBCAM de una muestra de control; o
 - (b) la cantidad o actividad del polipéptido NTM de la muestra del paciente con la cantidad respectiva o actividad del polipéptido NTM de una muestra de control; o
 - (c) ambos (a) y (b); en el que
- si la muestra del paciente tiene una menor actividad o cantidad del polipéptido OBCAM y/o NTM en comparación con la muestra de control, esto es indicativo de cáncer.
27. Un método de predicción de las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente que comprende los pasos de
- (i) determinar en una muestra que contiene proteína derivada del paciente
 - (a) la cantidad o actividad del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la cantidad o actividad del polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b); y
 - (ii) comparar:
 - (a) la cantidad o actividad del polipéptido OBCAM de la muestra del paciente con la cantidad o actividad respectiva del polipéptido OBCAM de una muestra de control; o
 - (b) la cantidad o actividad del polipéptido NTM de la muestra del paciente con la cantidad respectiva o actividad del polipéptido NTM de una muestra de control; o
 - (c) ambos (a) y (b); donde
- si la muestra del paciente tiene una menor actividad o cantidad del polipéptido OBCAM y/o NTM en comparación con la muestra de control, esto es indicativo de un resultado menos favorable.
28. Un método de diagnosticar cáncer en un paciente que comprende los pasos de
- (i) determinar en una muestra que contiene proteína derivada del paciente
 - (a) la secuencia del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la secuencia del polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b); y
 - (ii) determinar la presencia de diferencias entre
 - (a) dicha secuencia del polipéptido OBCAM y la secuencia del polipéptido OBCAM de tipo salvaje; o

- (b) dicha secuencia del polipéptido NTM y la secuencia del polipéptido NTM de tipo salvaje; o
- (c) ambos (a) y (b); donde

5 si la secuencia del polipéptido OBCAM y/o NTM en la muestra del paciente es diferente a la secuencia del polipéptido OBCAM o NTM de tipo salvaje, respectivamente, esto es indicativo de cáncer.

29. Un método de predicción de las perspectivas relativas de un resultado particular de un cáncer en un paciente que comprende los pasos de

- (i) determinar en una muestra que contiene proteína derivada del paciente
 - 10 (a) la secuencia del polipéptido OBCAM; o
 - (b) la secuencia del polipéptido NTM; o
 - (c) ambos (a) y (b); y
- (ii) determinar la presencia de diferencias entre
 - 15 (a) dicha secuencia del polipéptido OBCAM y la secuencia del polipéptido OBCAM de tipo salvaje; o
 - (b) dicha secuencia del polipéptido NTM y la secuencia del polipéptido NTM de tipo salvaje; o
 - (c) ambos (a) y (b); donde

20 si la secuencia del polipéptido OBCAM y/o NTM en la muestra del paciente es diferente a la secuencia del polipéptido OBCAM o NTM de tipo salvaje respectivamente, esto es indicativo de un resultado menos favorable.

30. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26 a 29 donde el cáncer es cáncer de ovario o cáncer colorrectal.

31. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26 a 30 en el que la muestra es una muestra del tejido en el que se sospecha cáncer o en el que el cáncer puede ser o ha sido hallado.

25 32. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26 a 30 en el que la muestra es una muestra de ovario y el cáncer es cáncer de ovario.

33. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26 a 30 en el que la muestra es una muestra de colon y el cáncer es cáncer colorrectal.

30 34. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26, 27 y 30 a 33 en el que la cantidad del polipéptido OBCAM se determina usando una molécula que se une selectivamente al polipéptido OBCAM.

35. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26, 27 y 30 a 33 en el que la cantidad del polipéptido NTM se determina usando una molécula que se une selectivamente al polipéptido NTM.

36. Un método según la Reivindicación 34 o 35 en el que la molécula que se une selectivamente al polipéptido OBCAM o NTM es un anticuerpo anti-OBCAM o anti-NTM.

35 37. Un método según la Reivindicación 36 en el que el anticuerpo OBCAM reacciona con un polipéptido OBCAM mutante, donde dicho OBCAM mutante es un mutante encontrado en una célula cancerosa, por ejemplo con una arginina en el residuo 95 como se numera en la Figura 7 en vez de una prolina, y/o donde dicho OBCAM mutante comprende una secuencia insertada de aminoácidos mostrada en la Figura 9, y

donde dicho anticuerpo no reacciona con el polipéptido OBCAM de tipo salvaje.

40 38. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 34 a 37 en el que la molécula que se une selectivamente a OBCAM o NTM comprende una etiqueta detectable.

39. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 26, 27 y 30 a 33 en el que la cantidad del polipéptido OBCAM o NTM se determina mediante ensayo o detección de la actividad del polipéptido OBCAM o NTM.

- 45 40. El uso de un ácido nucleico que hibrida selectivamente a:
- (a) el gen OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc de OBCAM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (b) el gen NTM, o un alelo mutante del mismo, o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc de NTM, o un alelo mutante del mismo, o sus complementos; o
 - (c) ambos (a) y (b)

50 en la fabricación de un reactivo para diagnosticar cáncer.

41. Uso de una molécula que se une selectivamente a:

- (a) polipéptido OBCAM; o
- (b) polipéptido NTM

en la fabricación de un reactivo para el diagnóstico del cáncer.

55 42. Uso de un ácido nucleico según la Reivindicación 40 en un método para diagnosticar cáncer.

43. Uso de una molécula que se une selectivamente a:

- (a) polipéptido OBCAM; o
- (b) polipéptido NTM

en un método de diagnóstico de cáncer.

44. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 41 o 43 en el que la molécula se une selectivamente a un polipéptido OBCAM en el que la prolina en el residuo 95 como se numera en la Figura 7 es una arginina.
- 5 45. Uso de un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc de OBCAM o NTM en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
46. Un ácido nucleico que hibrida selectivamente al gen OBCAM o NTM o un ácido nucleico que hibrida selectivamente al ADNc de OBCAM o NTM para su uso en el tratamiento del cáncer.
47. Uso del polipéptido OBCAM o NTM o una fusión del mismo, o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido OBCAM o NTM o fusión del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.
- 10 48. Un polipéptido OBCAM o NTM o una fusión del mismo, o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido OBCAM o NTM o fusión del mismo, para su uso en tratar el cáncer.
49. Un uso según la Reivindicación 40 en el que el gen o ácido nucleico es un alelo mutante de OBCAM con una guanina en el nucleótido 334 como se numera en la Figura 7 en lugar de una citosina.
50. Un método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13 o 16 a 25 en el que la muestra es sangre.

Región 11q25 NTM/OBCAM

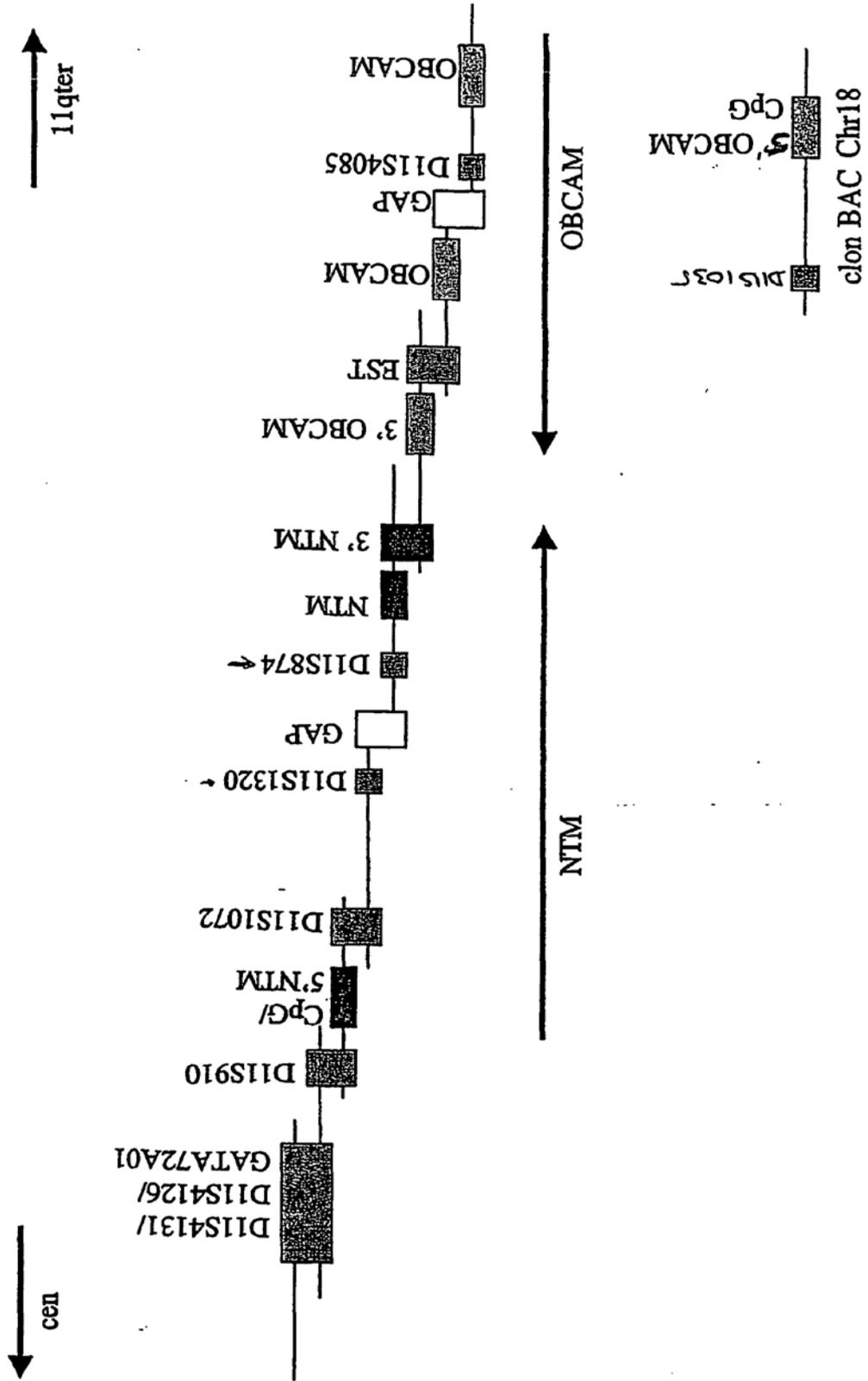
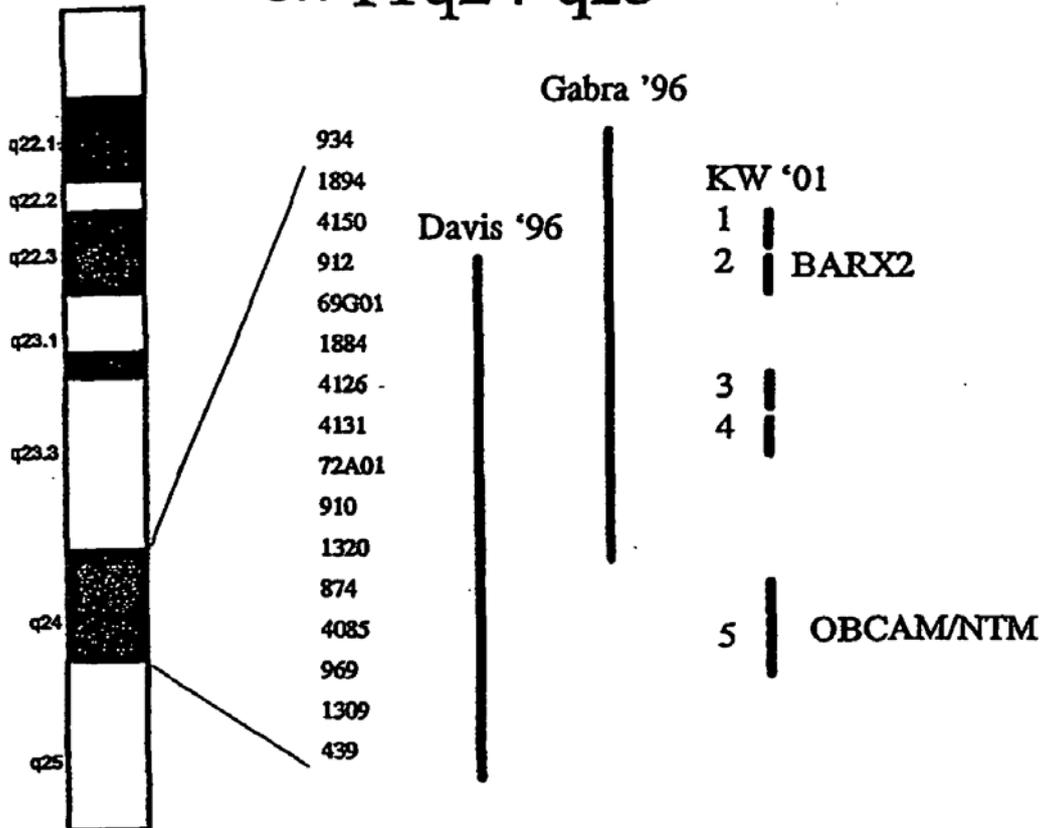


Figura 2

Perfeccionamiento de las Regiones LOH en 11q24-q25



Tasas LOH de Ovario:

	no analizado	No.informativa	No.LOH	%LOH
D11S1894	58	44	11	25
D11S4150	54	50	18	36
D11S912	60	53	18	34
GATA69G01	64	24	8	33
D11S1884	54	26	9	35
D11S4126	63	30	11	37
GATA72A01	62	24	6	25
D11S4131	65	52	17	33
D11S910	59	38	10	26
D11S1320	60	39	11	28
D11S874	65	38	11	29
D11S4085	62	43	24	56

Tasas LOH Colorrectal:

	no analizado	No.informativa	No.LOH	%LOH
D11S1894	39	12	7	58
D11S4150	38	25	9	36
D11S912	39	26	11	42
GATA69G01	38	9	3	33
D11S1884	38	9	5	56
D11S4126	39	28	7	25
GATA72A01	39	16	7	44
D11S4131	39	28	13	46
D11S910	39	19	5	26
D11S1320	39	20	10	50
D11S874	39	19	10	51
D11S4085	39	25	8	32

RESULTADOS

ANÁLISIS MOLECULAR

66% (43/65) de los tumores de ovario y 69% (27/39) de los tumores colorrectales tenían LOH que implican al menos 1 locus en la región 11q24. 8 tumores en cada grupo tenían LOH en todos los loci informativos.

La figura abajo muestra como los marcadores han sido reordenados y documenta el número de casos con LOH como un porcentaje del número de casos informativo para cada marcador.

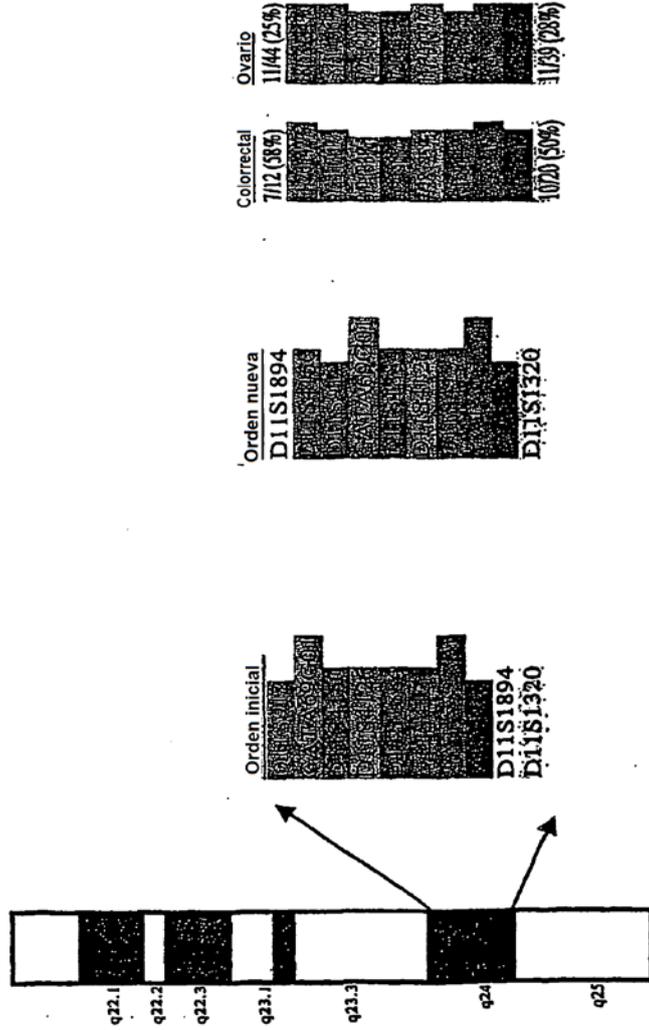
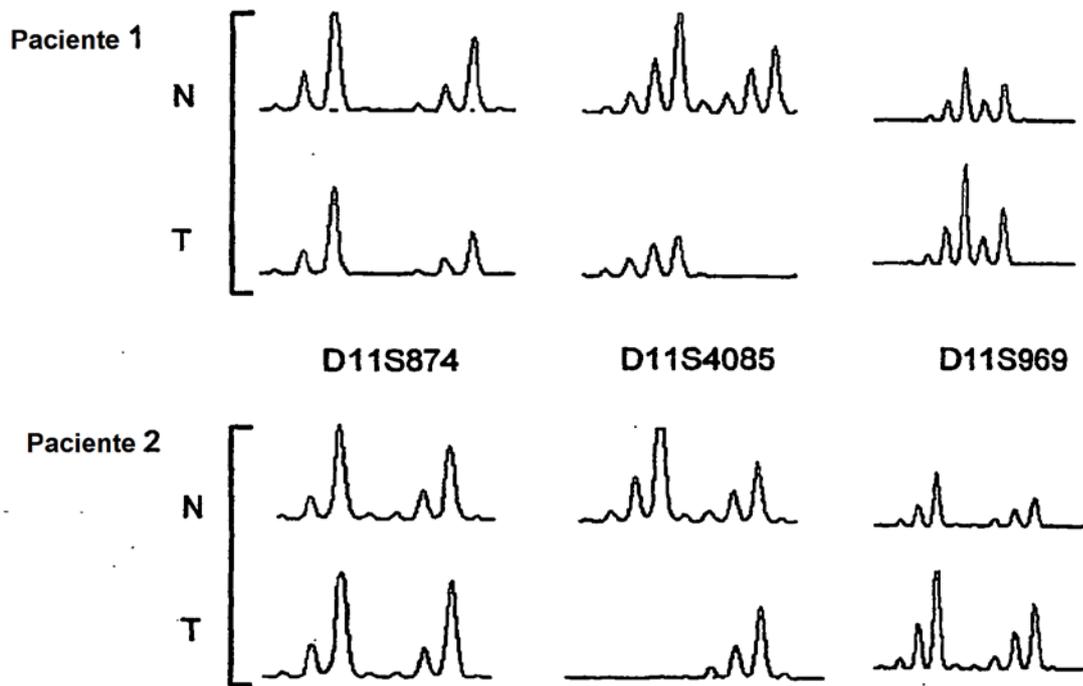


Figura 5

LOH completa en D11S4085 esta flanqueado por la retención de la heterocigosidad



Caso	Neurotrimin	OBCAM	Total
295	M	M	C
303	M	U	D
300	M	M	C
290	U	U	C
269	M	M	C
296	U	U	C
393		M	
311		M	
386	M	M	C
304	M	M	C
307	M	M	C
308	U	M	D
389	M	M	C
TOTAL	8/11=73%	11/13 = 85%	9/11=82%

TASA DE METILACIÓN TOTAL = $11/13 = 85\%$

M = metilado

U = No Metilado



[PubMed](#) · [Nucleotide](#) · [Protein](#) · [Genome](#) · [Structure](#) · [PopSet](#) · [Taxonomy](#) · [OMIM](#)
 Search

1: NM_002545 Homo sapiens [PubMed](#), [Proteína](#), [Secuencias Relacionadas](#), [Taxonomía](#), [OMIM](#), [LinkOut](#)
 opioides vinulante
 adhesión
 proteína/célula
 similar a la molécula
(OPCML), ARNm

DEFINICIÓN NM_002545 3110 bp ARNm FRI 02-ABR-2001
LOCUS Homo sapiens opioides vinulante de adhesión proteína/celula similar a la molécula (OPCML), ARNm.
ACCESO NM_002545
VERSION NM_002545.2 GI:13518022
KEYWORDS
FUENTE humano
ORGANISMO Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Butheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCIA 1 (bases 1 a 3110)
AUTORES Smith, M.W., Clark, S.P., Hutchinson, J.S., Wei, Y.H., Churukian, A.C., Daniels, L.B., Diggle, K.L., Gen, M.W., Romo, A.J., Lin, Y. et al.
TITULO Un mapa del sitio de secuencia etiquetada del cromosoma humano 11
REVISTA Genomics 17 (3), 699-725 (1993)
MEDLINE 94063915
PUBMED 8244387
REFERENCIA 2 (bases 1 to 3110)
AUTORES Struyk, A.F., Canoll, P.D., Wolfgang, M.J., Rosen, C.L., D'Eustachio, P. y Salzer, J.L.
TITULO Clonación de neurotrimin define una nueva subfamilia de moléculas neurales de adhesión celular expresados diferencialmente.
REVISTA J Neurosci 15 (3), 2141-2156 (1995)
MEDLINE 95198094
PUBMED 7891157
REFERENCIA 3 (bases 1 a 3110)
AUTORES Shark, K.B. y Lee, N.M.
TITULO Clonación, secuenciación y ubicación del cromosoma 11 de un ADNc que codifica una molécula de adhesión celular opioide vinulante humano (OBCAM)
REVISTA Gen 155 (2), 213-217 (1995)
MEDLINE 95237612
PUBMED 7721093
COMENTARIO REVISIÓN REFSEQ: Este registro ha sido realizado por el personal de NCBI. La secuencia de referencia fue derivado de L34774.1, U79251.1.
 El 3 de Abril de 2001 esta versión de secuencia reemplazo gi : 4505504.
 Resumen: Este gen codifica un miembro de la subfamilia IgLON en la superfamilia de proteínas de inmunoglobulina. La proteína codificada esta ubicada en la membrana plasmática y puede tener un papel accesorio en la funcion del receptor de opioides. Este gen tiene un ortólogo en la rata y bovino. La molécula de adhesión de opioides celular vinulante codificado por el gen de la rata une alcaloides opiáceos en presencia de lípidos ácidos, exhibe selectividad para los logandos mu y actúa como una proteína GPI anclada. Ya que la proteína codificada es altamente conservada en espacios durante su evolución, puede tener un papel fundamental en sistemas de mamíferos.
COMPLETITUD: completo en el extremo 3'.
CARACTERISTICAS Ubicación/Calificadores
FUENTE 1..3110
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"

```

/Chromosome="11"
/map="11"
gen      1..3110
         /gene="OPCML"
         /note="OBCAM; OPCM"
         /db_xref="LocusID:4978"
         /db_xref="MIM:600632"
CDS      51..1088
         /gene="OPCML"
         /note="opiate binding-cell adhesion molecule"
         /codon_start=1
         /db_xref="LocusID:4978"
         /db_xref="MIM:600632"
         /product="opioid-binding cell adhesion molecule precursor"
         /protein_id="NP_002536.1"
         /db_xref="GI:4505505"
         /translation="MGVCGYLFPLPWKCLVVVSLRLLFLVPTGVPVRSGDATFFPKAMDN
VTVRQGESATLRCITDDRVTTRVAVLNRSTILYAGNDKWSIDPRVILVNTPTQYSIMI
QNVDDVYDEGPYTCVQTDNHPKTSRVHLIVQVPPQIMNISSDITVNEGSSVTLCLAI
GRPEPTVTRHLSVKEGQGFVSEDEYLEISDIKRDQSGEYECALNDVAAPDVRKVKI
TVNYPPYISKAKNTGVSVGQKILSCEASAVPMAEFQWFKETRLATGLDGMRIENKG
RMSTLTFNFVSEKDYGNVTCVATNKLQNTNASITLYGPGAVIDGVNSASRALACLWLS
GTLLEHFFIKF"
sig peptide 51..131
mat peptide 132..1016
         /product="opioid-binding cell adhesion molecule"
misc feature 180..449
         /note="IG_like; Region: Immunoglobulin like"
misc feature 474..671
         /note="IG_like; Region: Immunoglobulin like"
misc feature 495..668
         /note="IG; Region: Immunoglobulin"
misc feature 750..986
         /note="IG_like; Region: Immunoglobulin like"
misc feature 759..944
         /note="ig; Region: Immunoglobulin domain"
misc feature 759..959
         /note="IG; Region: Immunoglobulin"
polyA signal 3074..3079
polyA site   3092
BASE COUNT  844 a   751 c   661 g   854 t
ORIGIN
1 gaccaggact gtgcggtcgc cggagtcctg ggaagtgtg gctgtcgaga atgggggtct
61 gtgggtacct gttcctgccc tggaaagtgc tegtgtcgt gtctctcagg ctgctgttcc
121 ttgtaccacac aggagtgcgc gtgcgagcg gagatgccac ctccccaaa gctatggaca
181 acgtgacggg ccggcagggg gagagcgcca ccctcaggtg taccatagat gaccgggtaa
241 cccgggtggc ctggctaaac cgcagcacca tcctctacgc tgggaatgac aagtgtcca
301 tagccctcgc tgtgatcctc ctggtcaata caccaacca gtacagcagc atgatccaaa
361 atgtggatgt gtatgacgaa ggtccgtaca cctgctctgt gcagacagac aatcatccca
421 aaacgtcccg ggttcaccta atagtgaag ttcctcctca gatcatgaat atctcctcag
481 acatcactgt gaatgagggg agcagtgtga ccctgctgtg tcttgtctatt ggcagaccag
541 agccaactgt gacatggaga cacctgtcag tcaaggaagg ccagggttt gtaagtgagg
601 atgagtacct ggagatctct gacatcaagc gagaccagtc cggggagtag gaatgcagcg
661 cgttgaacga tgtcgtcgcg cccgatgtgc ggaaagtaaa aatcactgta aactatcctc
721 cctatatctc aaaagccaag aacctgggtg ttccagtggg tcagaagggc atcctgagct
781 gtyaagcctc tgcagtcccc atggctgaat tccagtgggt caaggaagaa accaggttag
841 cactggtctt ggatggaatg aggatgaaa acaaaggccg catgtccact ctgactttct
901 tcaatgtttc tgaaaaggat tatgggaact atacttgtgt ggcacgaaac aagcttggga
961 acaccaatgc cagcatcaca ttgtatgggc ctggagcagt cattgatggt gtaaactcgg
1021 cctccagagc actggcttgt ctctggctat cagggaccct cttagccac ttcttcatca
1081 agttttgata agaaatccta ggtcctctga gcaacgcctg cttctcatat cacagacttt
1141 aatctacact gcggagagca aaccagcttg ggcttcttt tgttttttc tgttattcta
1201 gatttgtttt cttttgttt ttgtttattt gtttgtttgc ttttatttcc agcttgaatg
1261 agtgggggtg ggggagggtt gggcaggggt ctaccacgtg taggataatc attcattggt
1321 gtgtccaaaa atgggggtctg ctcctgtctg cttgacctt ccttttctc tgcttctctc
1381 ctcatcatca ttcccaaca cctcctctgc cacacacaa aacacgtaag tttcatttgg
1441 gcaaaaattg agcctcaca taaacaccct gaagacacaa cttgacttat aacatagtgc
1501 acagcaagag ctacatccaa gtgtcctatt atctgtgatt attttcttaa tgacaatgta
1561 catatgcccc catccatggt aattattatc taattccatt agggttcacg tcttttcttt
1621 ctgggacact atcctactat atccatatct atagatttca atatagatga ttgtgccatc

```

```

1681 ttctgtagcc tctccgctct actcattcct tccaccatct gcagagattt gaagtcggg
1741 gctatgcatg aaaccaca ctaaattttg caagtcaagt gaccaaaaaa gggggaggca
1801 ttttgaagat agaacctcta ttttaaaaag agaagttcaa ctcataaacg tgattgatag
1861 gtggctgatt tatttaggtt ttgtcaagct atctatcaa gtaatggtag agttacccat
1921 ctactcaaat atctgattta tctcaccatc caattatcta cccacctgtc ttcctctcta
1981 gcaatctatt tactgtttat caatctatca atgtaattgt ctaaacctcc tttctattct
2041 ctccctacta ctactatca attcacccc atatgaatct ctaaccatât tgtatctctc
2101 ccactgtatt catttataca ccactcagcag acattggcat cttcaaaatt atctttcaac
2161 ttctgtgaaa gccaacgac tccacaggta acaaaatata aaagcaatac cctgtgttgt
2221 ggactcttta aatctggta tccatccac ccaagggaga cactaacaga taggccaaag
2281 tagcaagcta atgatcagtc actcactatt cccggaagag cctgtgtttt ctaaaacact
2341 ttcttgggaa gcagatcagc ctagaaaagt tttgattagc actgtggttt tccttttgca
2401 cttgaaggac aaagtgcca gcctttatgc ttctctcaac cttcaagaa agtacatgtc
2461 aggaacctat ggctggcttt ccttagcagc aagaacttga gagaaaaaca catctgtctc
2521 tgcaatgcaa agtgaagagt ccaccgctc gagtgggatg acttcagcta gactcctt
2581 tctgctccag ttctggttta atctgtttga aaactatcca gtaaaaagct gatggaggcc
2641 aattacatgg cgggtgtatt gacaactctg gtatttgttt caggaagctc ttctaagctg
2701 agggcacttg agcaactgac ttaattttca agcacttgat taacacaaca ctgcaaacag
2761 aaggggagaaa gtgtcagtga cacagtttcc tctgatgcag ctgcttctcc aatggctttg
2821 gggagaact tcaccagctc ttcaggttca aagcagacc agcatacaaa caagagctga
2881 gccaccttg ctgtcttctc tctgggacg agaaggactc atccagcaaa gttgcctggg
2941 attcaaaata aaggcattgc agaccgcaca ggtgtgctgc agggactgat ccacagagag
3001 gatgagaatg cagcatcaat cgcagacctg ccctgcctca gttggaaaac cttttcaggc
3061 cctcagtcta aaaaataaaa aatatgagca ccaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```



[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PopSet](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)

[Search](#)
[PubMed](#)
[Nucleotide](#)
[Protein](#)
[Genome](#)
[Structure](#)
[PopSet](#)
[Taxonomy](#)
[OMIM](#)

[Display](#)
[Abstract](#)
[View](#)
[FASTA](#)
[HTML](#)
[BLAST](#)
[BLAST](#)
[BLAST](#)
[BLAST](#)

1: [NM_016522](#) **Homo sapiens neurotrimin** PubMed, Proteína, Secuencias Relacionadas, Taxonomía, Linkout (HNT), ARNm

LOCUS NM_016522 1839 bp ARNm PRI 02-NOV-2000
DEFINICION Homo sapiens neurotrimin (HNT), ARNm.
ACCESO NM_016522
VERSION NM_016522.1 GI:7705412
KEYWORDS .

FUENTE human.
ORGANISMO Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 1839)
AUTORES Struyk AF, Canoll PD, Wolfgang MJ, Rosen CL, D'Eustachio P y Salzer JL.

TITULO Clonación de neurotrimin define una nueva subfamilia de moléculas de adhesión celular neurales diferencialmente expresadas

REVISTA J. Neurosci. 15 (3 Pt 2), 2141-2156 (1995)

MEDLINE 95198094

PUBMED 7891157

REFERENCIA 2 (bases 1 to 1839)
AUTORES Li, G., Jin, J., Tan, X., Hu, S., Yuan, J. y Qiang, B.
TITULO Clonación e identificación de ADNc de longitud amplia neurotrimin humano
REVISTA No publicado

COMENTARIO **PROVISIONAL REFSEQ:** Este registro no ha sido sujeto aun a una revision NCBI final. La secuencia de referencia se derivó de [AF126426.1](#).

CARACTERISTICAS

Fuente Ubicación/Calificadores
 1..1839
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="11"
 /map="11q25"

gen 1..1839
 /gene="HNT"
 /db_xref="LocusID:50863"

CDS 265..1299
 /gene="HNT"
 /codon_start=1
 /db_xref="LocusID:50863"
 /product="neurotrimin"
 /protein_id="NP_057606.1"
 /db_xref="GI:7705413"
 /translation="MGVCGYLFPLPKLVVVSRLRLFLVPTGVPVRSQDATFPKAMDN
 VTVRQGESATLRCTIDNRVTRVAWLNRSITLYAGNDKWCLDPRVLLSNTQTQYSIEI
 QNVDVYDEGPYTCVQTDNHPKTSRVHLIVQVSPKIVRISSDISINEGNNISLTCIAT
 GRPEPTVTRHISPKAVGVFVSEDEYLEIQGITREQSGDYECASNDVAAPVVRVKVT
 VNYPFYISEAKGTGVPVQKGTLCRASAVPSABFQWYKDDKRLIEGKKGVKVENRPF
 LSKLIFPNVSEHDYGNVTCVASNKLGHETNASIMLFPGAVSEVSNGTSTRRAGCVWLLP
 LLVLHLLKPF"

misc función 409..630
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"

misc función 709..879
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"

misc función 970..1170
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"

BASE DE CONTEO 464 a 506 c 503 g 366 t
ORIGEN

1 ggggaagcag cgaggagggg gccccccttg gccgtectcc gtggaaccgg ttttcgagg
 61 ctggcaaaa cagaggctgg atttggggga ggaatattag actcggagga gtctgcgccc

```

121 ttttctctc cccggcctc cgggtcgccg cgggttcacc gctcagccu cgcgetcgt
181 cgcacccca cccacttct gtgctcgccc ggggggcgtg tgccgtgccc ctgcccggag
241 tcggggaagt tgggctgct gagaatgggg gtctgtgggt acctgttct gccctggaag
301 tgcctcgtgg tcgtgtctct caggctgctg ttcctgtac ccacaggagt gccctgccc
361 agcggagatg ccacctccc caaagctatg gacaacgtga cggtcggca gggggagagc
421 gccaccctca ggtgcaactat tgacaaccgg gtcaccggg tggcctggct aaaccgcagc
481 accatcctct atgctgggaa tgacaagtgg tgcctggatc ctgcgctggc cctctgagc
541 aacacccaaa cgcagtacag catcgagatc cagaacgtgg atgtgtatga cggggccct
601 tacacctgct cgggtgcagac agacaaccac ccaaagacct ctaggggtcca cctcattgtg
661 caagtatctc ccaaaattgt agagatttct tcagatatct ccattaatga agggaacaat
721 attagcctca cotgcatagc aactggtaga ccagagccta cggttacttg gagacacatc
781 tctcccaaag cggttggctt tgtgagtga gacgaatact tggaaattca gggcatcacc
841 cgggaacagt caggggacta cgagtgcagt gcctccaatg acgtggcccgc gccctggta
901 cggagagtaa aggtcaccgt gaactatcca ccatacattt cagaagccaa gggtagaggt
961 gtccccgtgg gacaaaaggg gacactgcag tgtgaagcct cagcagtcct ctcagcagaa
1021 ttcagtggtg acaagatga caaaagactg attgaaggaa agaaaggggt gaaagtggaa
1081 aacagacctt tcctctcaaa actcatcttc ttcaatgtct ctgaacatga ctatgggaac
1141 tacacttgcg tggcctccaa caagctgggc cacaccaatg ccagcatcat gctatttggg
1201 ccaggcgcgg tcagcgagggt gagcaacggc acgtcgagga gggcaggctg cgtctggctg
1261 ctgcctcttc tggcttgca cctgcttctc aaattttgat gtgagtgcca cttcccacc
1321 cgggaaaggg tgccgccacc accaccacca acacaacagc aatggcaaca ccgacagcaa
1381 ccaatcagat atatacaaat gaaattagaa gaaacacagc ctcatgggac agaaatttga
1441 gggaggggaa caaagaatac ttggggggga aaagagtttt aaaaaagaaa ttgaaattg
1501 ccttcagatg atttaggtac aatggagttt tcttttcca aacgggaaga acacagcaca
1561 cccggcttgg acccactgca agctgcatcg tgcaacctct ttggtgccag tgtgggcaag
1621 ggctcagcct ctctgccac agactgcccc cacgtggaac attctggagc tggccatccc
1681 aaattcaatc agtccataga gacgaacaga atgagacctt ccggccaag cgtggcgtt
1741 cgggcccaag cgtggcgtg cgggcacttt ggtagactgt gccaccacgg cgtgtgtgtg
1801 gaaacgtgaa ataaaaagag caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Isoformas NTM Traducidas

isoforma +33bp

atgggggtctgtgggtacctgttcctgcectggaagtgcctcgtgggtcgtgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgttccttgtacccacaggagtgcccggtgcgagcggagatgccacctccccaaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
gctatggacaacgtgacgggtccggcagggggagagcgcaccctcaggtgcactattgac
A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
aaccgggtcaccgggtggcctggctaaaccgcagcaccatcctctatgctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
aagtgggtgcctggatcctcgcgtggctccttctgagcaacacccaaacgcagtacagcattc
K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
gagatccagaacgtggatgtgtatgacgagggcccttacacctgctcgggtgcagacagac
E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
aaccacccaaagacctctaggggtccacctcattgtgcaagtatctccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
atttcttcagatatctccattaatgaagggaaacaattatgacctcacctgcatagcaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagagcctacgggttacttggagacacatctctcccaaagcgggttggtttgtg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
agtgaagacgaataacttggaaattcagggcatcacccgggaacagtcaggggactacgag
S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y E
tgcagtgccctccaatgacgtggccgcgcccggtggtagcgagagtaagggtcacctggaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccaccatacatttcagaagccaaggggtacaggtgtcccgtgggacaaaaggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcagtgatgaagcctcagcagtcacctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
L Q C E A S A V P S A E F Q W Y K D D K
agactgattgaaggaagaaaggggtgaaagtggaaaacagaccttctctcaaaactc
R L I E G K K G V K V E N R P P L S K L
atcttcttcaatgtctctgaacatgactatgggaactacacttgcgtggcctccaacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggccacaccaatgccagcatcatgctatttgaagtgaaaactacagccctgaccct
L G H T N A S I M L F E V K T T A L T P
tggaaagggtccaggcgcctcagcagaggtgagcaacggcacgtcgaggagggcaggctgc
W K G P G A V S E V S N G T S R R A G C
gtctggctgctgacctcttctgggtcttgcacctgcttctcaaatttga
V W L L P L L V L H L L L K F *

Figura 9

isoforma +69bp

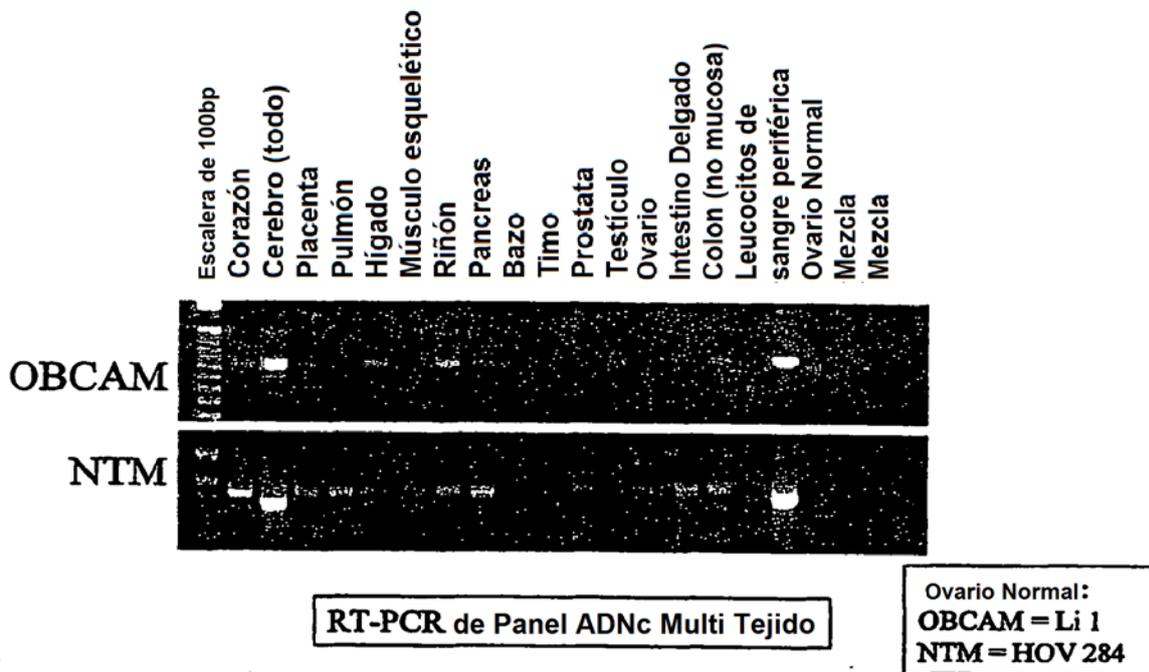
atgggggtctgtgggtacctgttcctgccctggaagtgcctcgtggcgtgtctctcagg
 M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
 ctgctgttccttgtacccacaggagtgcccggtgcgcagcggagatgccaccttccccaaa
 L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
 gctatggacaacgtgacgggtccggcagggggagagcgcaccctcaggtgcactattgac
 A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
 aaccgggtcaccgggtggcctggcctaaaccgcagcaccatcctctatgctgggaatgac
 N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
 aagtgggtgcctggatcctcgcgtgggtccttctgagcaacacccaaaacgcagtacagcatc
 K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
 gagatccagaacgtggatgtgtatgacgagggcccttacacctgctcgggtgcagacagac
 E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
 aaccacccaaagacctctaggggtccacctcattgtgcaagtatctcccaaaattgtagag
 N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
 atttcttcagatatctccattaatgaagggaaacaatattagcctcacctgcatagcaact
 I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
 ggtagaccagagcctacgggttacttggagacacatctctcccaaagcgggttggtcttggtg
 G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
 agtgaagacgaatacttggaaattcagggcatcaccgggaacagtcaggggactacgag
 S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y E
 tgcagtgctccaatgacgtggccgcgcccgtgggtacggagagtaaagggtcacctggaac
 C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
 tatccaccatacatttcagaagccaaggggtacaggtgtccccgtgggacaaaaggggaca
 Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
 ctgcagtggtgaagcctcagcagtcacctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
 L Q C E A S A V P S A E F Q W Y K D D K
 agactgattgaaggaaagaaaggggtgaaagtggaaaacagacctttcctctcaaaactc
 R L I E G K K G V K V E N R P F L S K L
 atcttcttcaatgtctctgaacatgactatgggaactacacttgcgtggcctccaacaag
 I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
 ctgggccacaccaatgccagcatcatgctatttgaactaaatgagcctacgagctcaact
L G H T N A S I M L F E L N E P T S S T
ttgttgcaagaagtgaaaactacagcctgacccttggaaaggtccagggcgcgtcagc
L L Q E V K T T A L T P W K G P G A V S
 gaggtgagcaacggcacgtcgaggagggcaggtgcgtctggctgctgctcttctggtc
 E V S N G T S R R A G C V W L L P L L V
 ttgcacctgcttctcaaatgtga
 L H L L L K F *

isoforma +108bp

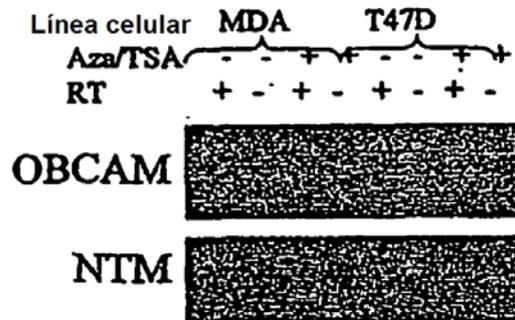
atgggggtctgtgggtacctgttcctgccctggaagtgcctcgtggctcgtgtctctcagg
 M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
 ctgctgttccttgtacccacaggagtgccctgctgcgagcggagatgccacctccccaaa
 L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
 gctatggacaacgtgacgggtccggcagggggagagcgcaccacctcaggtgcaactattgac
 A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
 aaccgggtcaccgggtggcctggctaaaccgcagcaccatcctctatgctgggaatgac
 N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
 aagtgggtgcctggatcctcgctgggtccttctgagcaaacccaaaacgcagtacagcatc
 K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
 gagatccagaacgtggatgtgtatgacgagggcccttacacctgctcgggtgcagacagac
 E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
 aaccacccaaagacctctagggccacctcattgtgcaagtatctcccaaaattgtagag
 N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
 atttcttcagatatctccattaatgaagggaaacaatattagcctcacctgcatagcaact
 I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
 ggtagaccagagcctacgggttacttggagacacatctctcccaaagcgggttggtttgtg
 G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
 agtgaagacgaataacttggaaattcagggcatcaccgggaacagtcaggggactacgag
 S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y E
 tgcagtgccccaatgacgtggccgcgcccgtggtagcgagagtaaagggtcaccgtgaac
 C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
 tatccaccatacatttcagaagccaagggtagcgggtgtccccgtgggacaaaaggggaca
 Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
 ctgcagtggaagcctcagcagtcacctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
 L Q C E A S A V P S A E F Q W Y K D D K
 agactgattgaaggaagaaaggggtgaaagtggaaaacagaccttctctcaaaactc
 R L I E G K K G V K V E N R P F L S K L
 atcttctcaatgtctctgaacatgactatgggaactacacttgcgtggcctccaacaag
 I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
 ctgggccacaccaatgccagcatcatgctatttgatggctcctaagctgactgtgggaa
 L G H T N A S I M L F * W L L S * L W E
tcataattggaactaaatgagcctacgagctcaactttgttgcaagaagtgaaaactaca
S * L E L N E P T S S T L L Q E V K T T
 gcctgaccttggaaaggtccagggcgcctcagcagaggtgagcaacggcagctcgagg
 A L T P W K G P G A V S E V S N G T S R
 agggcaggtgcgtctggctgctgcctcttctgggtcttgccacctgcttctcaaatttga
 R A G C V W L L P L L V L H L L L K F *

Figura 10

IgLONs son Altamente Expresados en Ovarios Normales



Re-Expresión IgLON



- Líneas Celulares : MDAMB23.1, T47D.
- Azacitidina + Trichostatin A
- Re-expresión de OBCAM y NTM
 - confirma la regulación epigenética de transcripción

Figura 11

Cebadores MS-PCR OBCAM

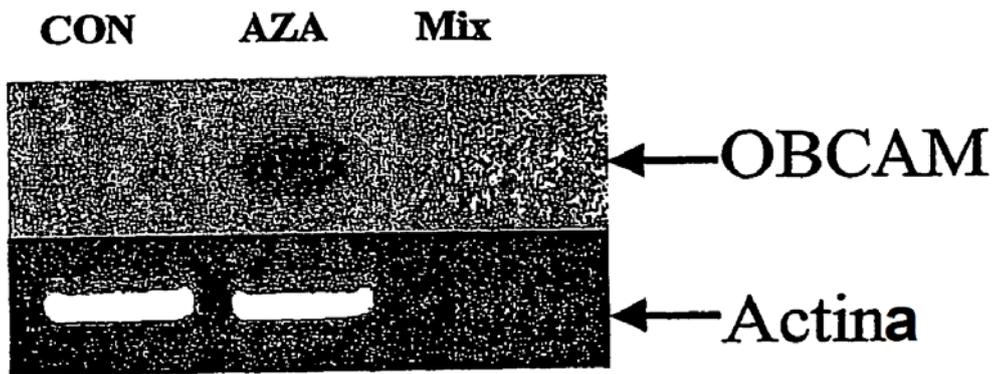
Conj. de Cebadores	Cebador Sentido 5'→3'	Cebador Antisentido 5'→3'	Tamaño Genómica Inicial	Posición Genómica Inicial	Tamaño Genómica Final	Posición Genómica Final
OBCAM1-W	AGGCGTCCAG TGGAGGGGCA CGGGC	CATCGCGCTG CAATCGGCTC CCGG	135	25	160	160
OBCAM1-M	AGGCGTTTAG TGGAGGGGTA CGGGC	CATCGCGCTA CAATCGACTC CCGG	135	25	160	160
OBCAM1-U	AGG ¹ GT ¹ TTAG TGGAGGGGTA TGGG ¹	CATC ¹ CA ¹ CTA CAATCA ¹ ACTC CCG ¹ A	135	25	160	160
OBCAM2A-W	CAGCGGATG GACAGGCACA CC	AACGGGGCGC CCCTCGCAGC G	229	151	380	380
OBCAM2A-M	TAGCGGATGGATA CGTATATC	AACGGGACGC CCCTCGCAAC G	229	151	380	380
OBCAM2A-U	TAG ¹ TG ¹ GATG GATA ¹ TGTA ¹ T ¹	AAC ¹ CA ¹ AC ¹ C CCCTCA ¹ CAAC ¹ A	229	151	380	380
OBCAM2B-W	CAACTTCTGC GCTGGCATCG GC	AACGGGGCGC CCCTCGCAGC G	154	226	380	380
OBCAM2B-M	TAATTTTTC GTTGGTATCG GC	AACGGGACGC CCCTCGCAAC G	154	226	380	380
OBCAM2B-U	TAATTTT ¹ TG ¹ GTTGGTAT ¹ G G ¹	AAC ¹ CA ¹ AC ¹ C CCCTCA ¹ CAAC ¹ A	154	226	380	380
OBCAM3A-W	GCGCGCGGT CTCCTCGCTG CCGC	TCCCGGTGCC GCCTCGGAGC GAGCG	182	371	553	553
OBCAM3A-M	GCGTCGCGT TTTTCGTTG GCGC	TCCCGATACC GCCTCGAAAC GAAACG	182	371	553	553
OBCAM3A-U	G ¹ G ¹ T ¹ G ¹ G ¹ T TTTT ¹ TG ¹ TG G ¹ G ¹	TCCCA ¹ ATA ¹ CC ACCTCA ¹ AAAC AAACA ¹	182	371	553	553
OBCAM3B-W	GCGCGGTGCG GGCATATCCC C	TCCCGGTGCC GCCTCGGAGC GAGCG	134	419	553	553
OBCAM3B-M	GCGCGGTGCG GGTATATTTT C	TCCCGATACC GCCTCGAAAC GAAACG	134	419	553	553
OBCAM3B-U	G ¹ G ¹ T ¹ G ¹ TG GGTATATTT ¹ T ¹	TCCCA ¹ ATA ¹ CC ACCTCA ¹ AAAC AAACA ¹	134	419	553	553

Cebadores MS-PCR NTM

Conj. de Cebadores	Cebador Sentido 5'→3'	Cebador Antisentido 5'→3'	Tamaño Genómica Inicial	Posición Genómica Inicial	Tamaño Genómica Final	Posición Genómica Final
--------------------	-----------------------	---------------------------	-------------------------	---------------------------	-----------------------	-------------------------

	π				
NTM1 1-W	CACAGCCTGG GCCCGGCGCG GC	160	TGGCAGCAGC TCCATCCCTG ACCG	30	190
NTM1 1-M	TATAGTTTGG GTTCGGCGCG GC	160	TAAACAACAAC TCCATCCCTA ACCG	30	190
NTM1 1-U	TATAGTTTGG GTTTGGTGTG GT	160	TAAACAACAAC TCCATCCCTA ACCA	30	190
NTM1 2-W	CACAGCCTGG GCCCGGCGCG GC	111	AGCGAGCGGG CGGGCTGGCG GCG	30	141
NTM1 2-M	TATAGTTTGG GTTCGGCGCG GC	111	AACGAAACGAA CGAACTAACG ACG	30	141
NTM1 2-U	TATAGTTTGG GTTTGGTGTG GT	111	AACAACAACA CAAACTAACA ACA	30	141
NTM2 1-W	GCCCGCTGAG CTGGCGTCC GCG	121	TGGCCGAGGA GGGAGAGGCC GGGCG	265	386
NTM2 1-M	GGTCGTTGAG TTTGGCGTTT GCG	121	TAAACGAAAA AAAAAAACCC GAACG	265	386
NTM2 1-U	GGTTGTTGAG TTTGGTGTG GTG	121	TAAACCAAAA AAAAAAACCAACA	265	386
NTM2 2-W	AGCGAGCTACCGAGCTTGGGCGCGC	65	TGGCCGAGGA GGGAGAGGCC GGGCG	321	386
	G				
NTM2 2-M	AACGAACTACCGAACTTAAACCGCC	65	TAAACGAAAA AAAAAAACCC GAACG	321	386
	G				
NRM2 2-U	AACAAACTACCAAACTTAAACCAACC	65	TAAACCAAAA AAAAAAACCAACA	321	386
	A				
NTM3 1-W	AGACTCGGAG GAGTCTGCGC	151	ACTTCCCCGA ACTCCGGCAG CCG	925	1076
NTM3 1-M	AGATTCGGAG GAGTTTGC	151	ACTTCCCCGA ACTCCGGCAG CCG	925	1076
NTM3 1-U	AGATTGGAG GAGTTTGTGT	151	ACTTCCCCAA ACTCCACAACA OCA	925	1076
NTM3 2-W	TCCCCGCGC TCCCGTCCG CCG	121	ACTTCCCCGA ACTCCGGCAG CCG	955	1076
NTM3 2-M	TTTTCGGGTTTTTCGGTCCGT CGC	121	ACTTCCCCGA ACTCCGACAA CCG	955	1076
NTM3 2-U	TTTTGTGTTTTTTTGGTGTGTGT	121	ACTTCCCCAA ACTCCACAACA OCA	955	1076

Figura 13



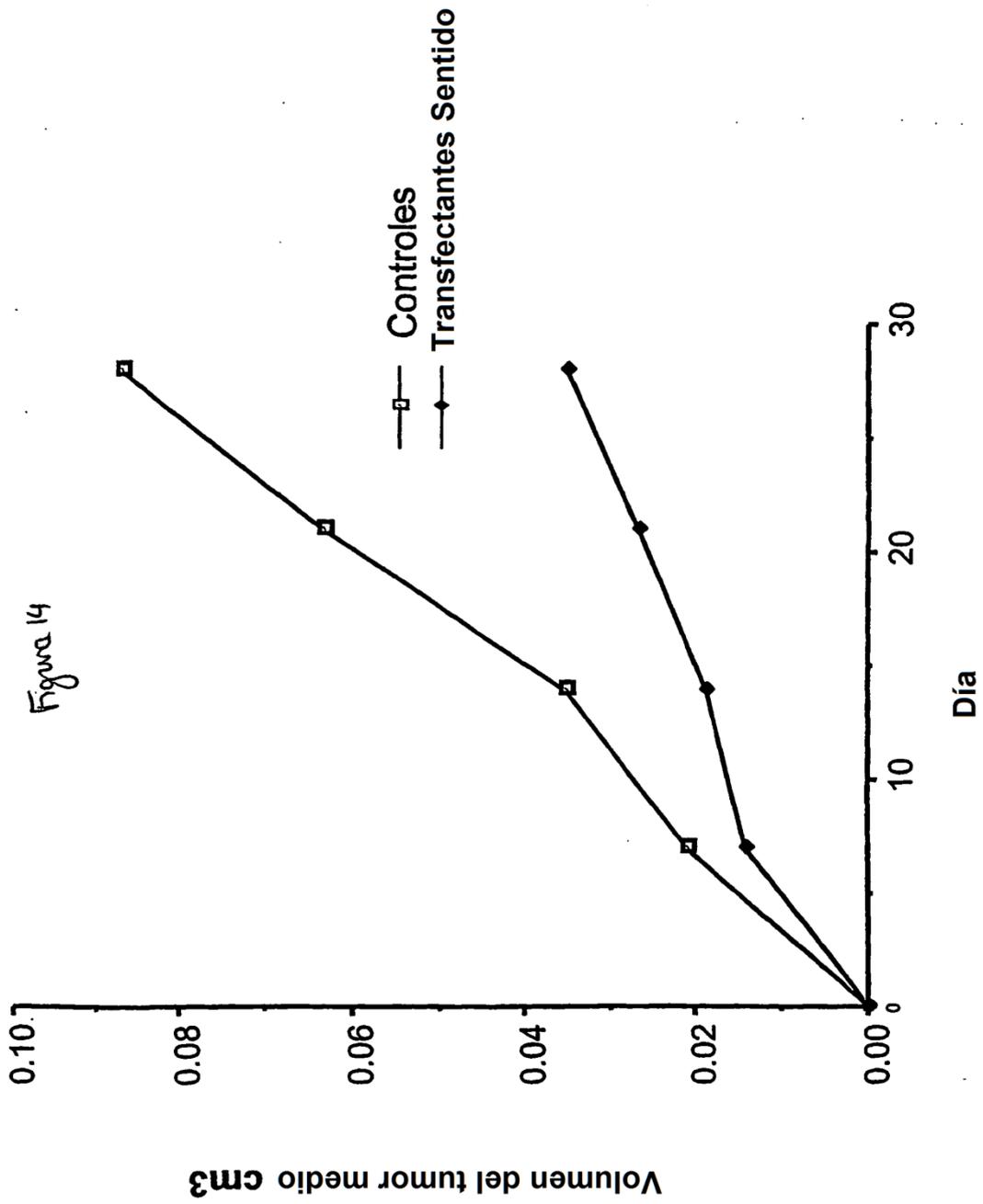


Figura 15

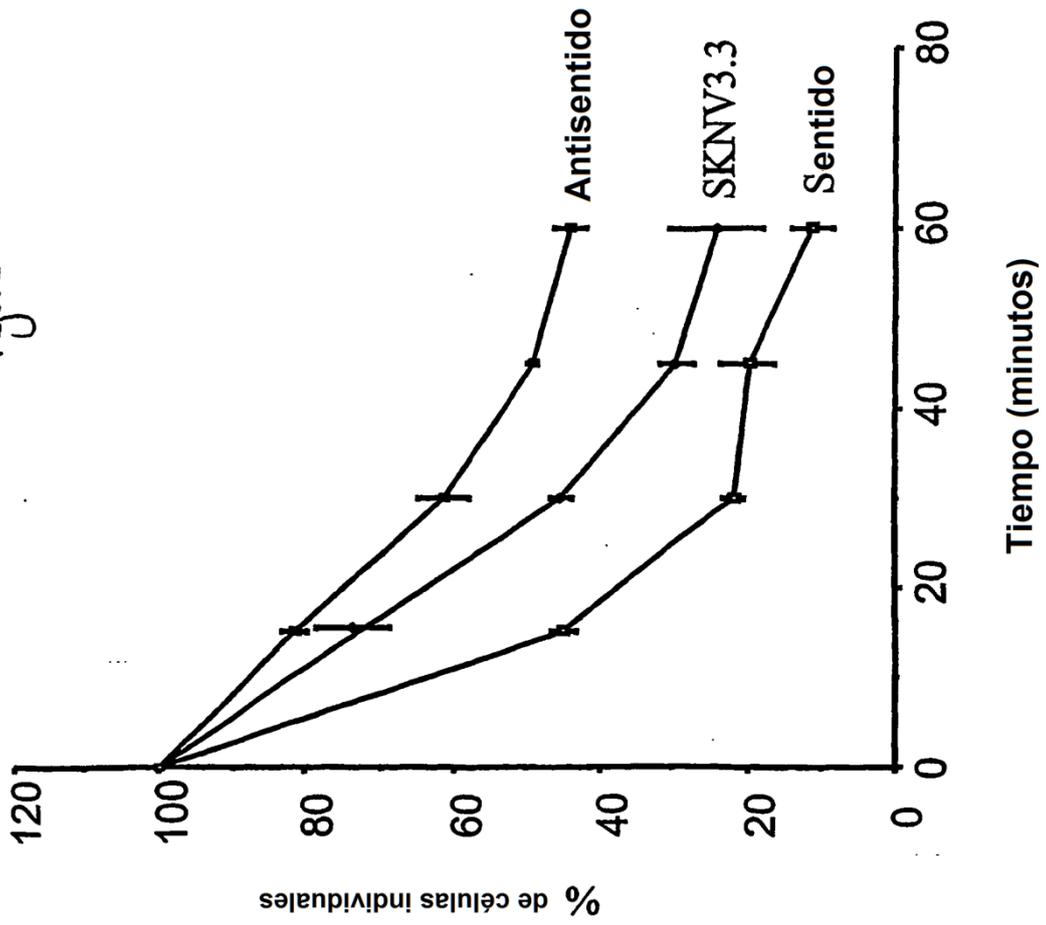


Figura 16 (pagina 1 de 4)

Exón 1 (Secuencia de Codificación) AC027631.4: 166bp**Exón 1 (Secuencia de Codificación) AC027631.4: 166bp**

54481, cgcttcccga gcccgctggt gcgcggggcg ggggaccagg actgtgccc tgccggagtc
 54541 ctgggaagtt gtggctgtcg agaattggggg tctgtgggta cctgttcctg ccctgggaagt
 54601 gcctcgtggt cgtgtctctc aggctgctgt tcctgtacc cacaggagct gcccgtgcgc
 54661 aggaagatgc cacctcccc aaagctatgg acaacgtgac ggtcccggcac cggcagagcg
 54721 ccactctcan nnnnnnnnn nnnnnnnnn nnnnnnnnn

Exón 2 AC012234.6: 233bp

75121 ttttagcact gtgttttggtt gtttcattta ctcccaaaa tgcaacgtct tatttaccat
 75181 attataaat ctctccactc tctctcttc ccttctctt cctccacca ctcccgcct
 75241 cactgcaggt gtaccataga tgaccgggta acccgggtgg cctgggctaaa ccgcagcacc
 75301 atcctctacg ctgggaatga caagtgtcc atagaccctc gtgtgatcat cctgggtcaat
 75361 acaccaacc agtacagoat catgatccaa aatgtggatg tgtagacga aggtcccgtac
 75421 acctgctctg tgacagacaga caatcatccc aaaacgtccc gggttcacct aatagtgcaa
 75481 ggtaagtccc agctggatct ggggtgcca ttcccgtcag tgatggagg gaagaacagt
 75541 gttgggtgtt gttctacctg tgtgcgaaga cacaaaagtc atcttctct actgaatcca
 75601 gagtttgact atatgtcttg gaatgtttcc catcgaatgg gtacttaact aagtgtctgaa

Figura 16 (pagina 2 de 4)

Exón 3 AP000843.3: 126bp

36961 atttattata aaaacatgct atacaaaaat ttgtaggcta acacctcctt ttaagtgcaa
 37021 agaattattc tcaggatttt cttctatcct gtttccttac agtctcctct **cagatcatga**
 37081 **atatctctc agacatcact gtgaatgagg gaagcagtgt gacctgctg tgtcttgcta**
 37141 **ttggcagacc agagccaact gtgacatgga gacacctgto agtcaagggt** agggtgctga
 37201 cctggaggac gttttcagag gtagtatgtt aaagtcttgg ctcttatgca caacagagct
 37261 tcaggaatca gaaaacatctt tgtaatccag tcatagaaaa tcaaacaggg aatatgcacc
 37321 aattgctggc tatttcattt caaaagaagg attcatagag gaaatttgct aaatgatggt

Exón 4 AP000843.3: 138bp

2821 tctgatggct tttttctctc ctctcctac aatctctaga tgtgaatatg gttctgtccc
 2881 tggttacaca gtttcctgat tgtttctctgt ctgcttcttt ctcccagaa **ggccagggct**
 2941 **ttgtaagtga ggatgagtac ctggagatct ctgacatcaa gcgagaccag tccggggagt**
 3001 **acgaatgcag cgcggtgaac gatgtcgtg cgccgatgt gcggaagta aaaatcactg**
 3061 **taaacgtga gtggacctgc agccagggg** ttctggggaa aagacggcac agggagtagg
 3121 tggacaatct ggtaatggca gtgccatttt ccaaaggacc caggttcttg ccaacaggaa
 3181 aatacttcat cagatggctt tgcccaccat ggcctccgtg ccatttgctc ctggaatctt

Figura 16 (pagina 3 de 4)

Exón 5 AP000843.3: 121bp

3361 **aaatgattat** **ttactggga** **aagagggtg** **tcacaagaaa** **tccattaca** **tagcaaatgg**
 3421 **ctggatgtgc** **ccttcattctc** **ttcacgaaa** **tcactctgtg** **tgtgctgcg** **tgcatgcctg**
 3481 **tgcatgtgtg** **tgtgtgtgtt** **tcccacagat** **cctcccctata** **tctcaaaagc** **caagaacact**
 3541 **ggtgtttcag** **tcggtcagaa** **gggcatcctg** **agctgtgaag** **cctctgcagt** **ccccatggct**
 3601 **gaattccagt** **ggttcaagga** **agaaaccagg** **taccttttaa** **atgacacctg** **gacagttctg**
 3661 **aagcagagct** **gatggtctat** **cccacatgg** **gagaaggatg** **aggatgaaga** **aaaggggaaa**
 3721 **gataaggcaa** **aacagaaaata** **tactatgccc** **tcttttgttaa** **caaagtctat** **ttttacaacg**
 3781 **agaaaaaaaa** **tggaggaggc** **tgggaagtgg** **agaaaaatgaa** **ctgaccatga** **ttctgaaatct**

Exón 6 AP000843.3: 152bp

3901 **ggcaagagca** **tcatttccct** **tctcctcctg** **ttggacactg** **aagtgcttag** **ggtttgagtt**
 3961 **tgaaggacga** **gattagttgg** **agaaaagagt** **ttggtgagga** **ggagggcctc** **tttgtagaat**
 4021 **gaattgatag** **caatgtcttc** **cctcttgag** **gtagccact** **ggtctggatg** **gaatgaggat**
 4081 **tgaaaacaaa** **ggccgcatgt** **ccactctgac** **tttcttcaat** **gtttcagaaa** **aggattatgg**
 4141 **gaactatact** **tgtgtggcca** **cgaacaagct** **tgggaacacc** **aatgccagca** **tcacattgta**
 4201 **tggtgagtgc** **tggaagcctg** **gatccagtgg** **gctcagccac** **atggggaagc** **ttgagggact**
 4261 **caggaggag** **gaagttgcaa** **tctgcttggc** **ctgtgtccat** **ccatcctact** **caaccacca**
 4321 **cctgtagata** **agacatactt** **ctcccctgca** **ttcccctagc** **atgccatgca** **gagatagtta**

Figura 16 (pagina 4 de 4)

Exón 7 (Secuencia de Codificación) AP000843.3: 101bp

19861 ttgttttagac ttggaatggt cagcggaagg gtggaagggtg ggaagcatgt atgtgtattt
 19921 gcttgtcagg gaagaactat ggtgtccttg ggtgtatgct aatgggtctg tctctctctc
 19981 cctacacag **ggcctggagc agtcattgat ggtgtaaact cggcctccag agcactggct**
 20041 **tgtctctggc taccagggac cctcttagcc cacttcttca tcaagttttg ataagaaatc**
 20101 ctaggtcctc tgagcaacgc ctgcttctcc atatacacaga ctttaatacta cactgcggag
 20161 agcaaacag cttgggcttc tttttgtttt tttctgttat tctagatttg ttttcttttt
 20221 gtttttgttt atttgtttgt ttgcttttat ttccagcttg aatgagtggg gttggggggcg

Figure 17

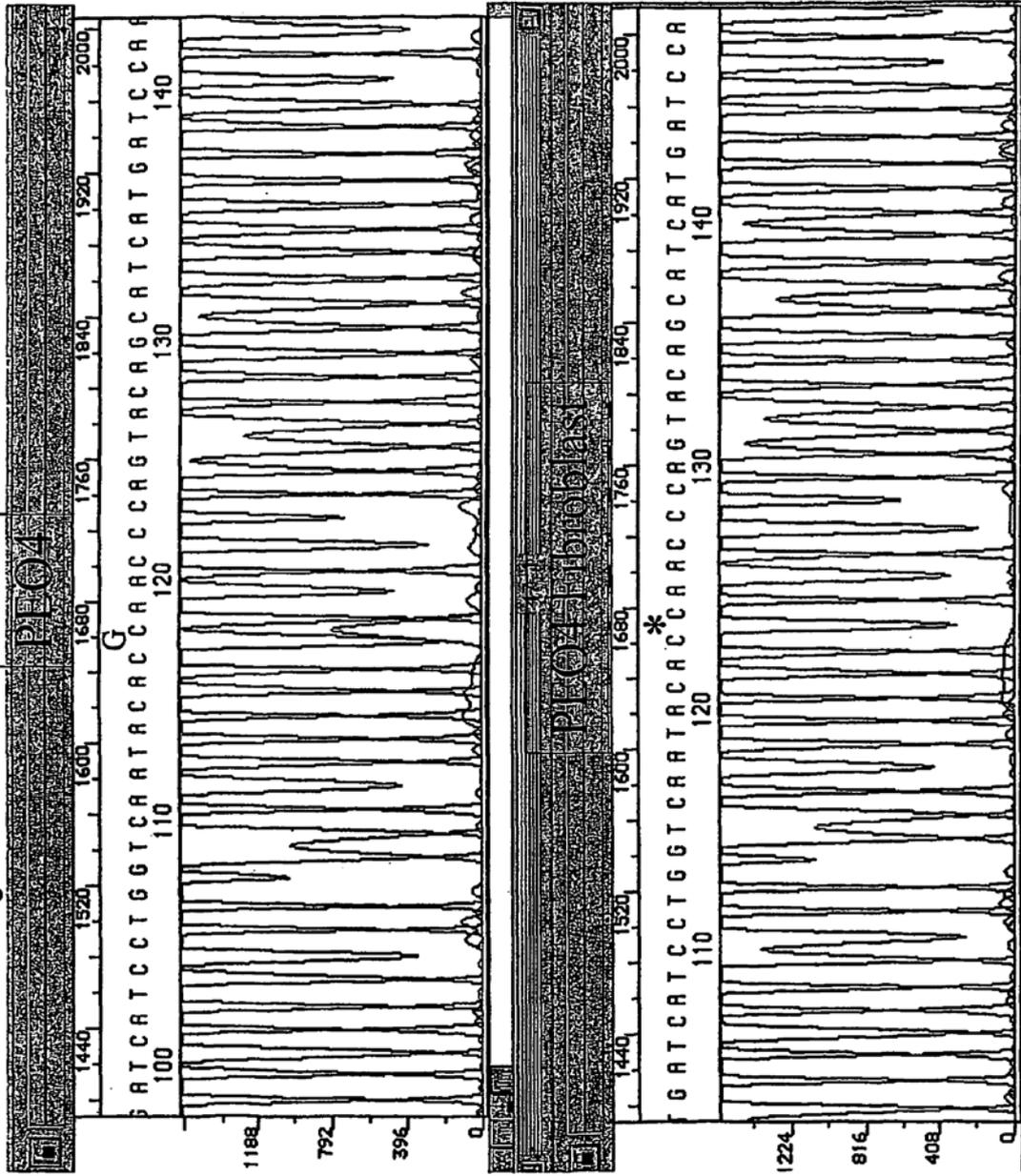


Figura 18

OBCAM de Tipo Salvaje Presente en el ADN de Fibroblastos PEO4 :

V I I L V N T P T Q Y S I M I Q
gtgtgatcatcctggtcaatacaccaacccagtacagcatcatgatccaaa

Mutación OBCAM Somática sin sentido en el ADN PEO1, PEO1CDDP,
PEO4 :

V I I L V N T R T Q Y S I M I Q
gtgtgatcatcctggtcaatacacgaacccagtacagcatcatgatccaaa

Figura 19 Isla CpG OBCAM de Secuenciación Bisulfito

1 ATTGAGATT GCCACTTTGG GGACAGGCGT CCAGTGGAGG GGCACGGGGCG
 51 TTTCCGAGGT GGGTCCTCGG AGGTGGGTGC ACTCCACCTC TCGCGGGGCC
 101 CAGGACACCG CGCCGTCAGG GCTGGACTTG GCTGGGCGGG GAGCCGATTG
 151 CAGCGCGATG GACACGCACA CCGGTGCCCC ATCTGGCGTG GGCAGGGTAG
 201 TTCAGCTCTC CAGGGCGGGG TTGTCAACT TCTGCGCTGG CATCGGCGGAG
 251 GGAAGGTGCC AGTGTCAGTT TTCAGTTTGC TGCTTTCCCC AGAACTCCCT
 301 CTCCTCGCCCT CCCCTCTCCC TCCC CGCTCC CCCACCCCG CCCCTCTGT
 351 AGGGGAAGCC GCTGCCGAGG GCGCCGCGTT CTCCTCCGTG GCGCGGGTGT
 401 CGGGACGGAG CGAAGTGGGC GCGGTGCCGG CTCATCCCCG CAGGCATCCC
 451 CAGCCCCTGT GCGCGCGCGG AGGTTAAGT GGGCGCCCGC CGTCGGGATG
 501 AGCGCGCAGT CCGCCCGCC CGCCAGCCCG CTCGCTCCGA GCGGCACCG
 551 GGAGAAAGTG GCGGTCAGGG ATGGAGCTGC TGCCATGACA ACCCCGGCGG
 601 TCCGGGCCCG CCGCGCTCGG GGTGCTCC GGGAGGAAGG CCGCGCGGAG
 651 CCGGGGGCGG CCGCTGAGCG TGGCGTCCGC GCGTCCCGC GTCTCGTGCC
 701 GCGTCCCGG AGGAAGCGGG GGCCGCCGTC CGCCAGCTC CCCGTGCGCC
 801 CGGAGTTCCT CCGGGCGGG GCTCCCCCG CTGGCCCGA GTCGCCGACC
 851 GGGCTGCAGA GGACGGCCAC CGACCGGACG ACCCTGCTGC GCCGGTGGCG
 901 TCCCCGCCTT GAACTTTT GCCGCCTTGG GGTCCAGAT GCGAGACCT

Figura 21

Expresión OBCAM en SKNV3.3 Casi Elimina Completamente la Tumorigenicidad en Ratones Desnudos

