

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-535806

(P2004-535806A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 C O 8 6
		(全 224 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-508729 (P2003-508729)	(71) 出願人	502418745
(86) (22) 出願日	平成14年6月20日 (2002.6.20)		キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リ
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		ミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/002928		イギリス・WC 2 A・3 P X・ロンドン・
(87) 国際公開番号	W02003/002765		リンカーンズ・イン・フィールズ・6 1
(87) 国際公開日	平成15年1月9日 (2003.1.9)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	0115673.6		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成13年6月27日 (2001.6.27)	(74) 代理人	100108578
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 高橋 詔男
(31) 優先権主張番号	60/305, 137	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成13年7月16日 (2001.7.16)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100101465
(31) 優先権主張番号	60/330, 792		弁理士 青山 正和
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)	(74) 代理人	100094400
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 鈴木 三義
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌

(57) 【要約】

本発明は、OBCAMおよびNTM遺伝子と関係がある癌の診断、予後および治療の方法を提供する。本発明の方法は、卵巣癌および結腸直腸癌に非常に適している。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

患者の癌を診断する方法であって、

(i)患者から核酸を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)前記核酸を

(a)OBCAM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、OBCAMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、それらの相補体、あるいは

(b)NTM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、NTMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、それらの相補体、あるいは

(c)(a)と(b)の両方

と接触させるステップを含む方法。

10

【請求項2】

患者の癌の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

(i)患者から核酸を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)前記核酸を

(a)OBCAM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、OBCAMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、それらの相補体、あるいは

(b)NTM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、NTMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、それらの相補体、あるいは

(c)(a)と(b)の両方

と接触させるステップを含む方法。

20

【請求項3】

患者の癌疾患の進行を判定する方法であって、

(i)患者のOBCAM遺伝子が失われているかあるいは不活性化している患者から、サンプルの核酸を得るステップ、

(ii)前記核酸を、NTM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、NTMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、または、それらの相補体と接触させるステップを含む方法。

30

【請求項4】

患者からの核酸中の図7に付番したヌクレオチド334に対応するヌクレオチドが、図7のヌクレオチドと同じであるかどうかを判定する、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

判定が請求項56に記載の核酸に関するものである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

(i)患者からのOBCAMまたはNTM遺伝子を含むサンプルを得るステップ、

(ii)OBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、

(iii)患者のサンプルからのOBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、および

(iv)対照サンプルと比較して、患者のサンプルがより高いメチル化度のOBCAMまたはNTM遺伝子を有する場合、これが癌を示すステップ

を含む患者の癌を診断する方法。

40

【請求項7】

癌患者の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

(i)患者からOBCAMまたはNTM遺伝子を含むサンプルを得るステップ、

(ii)OBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、

50

(iii)患者のサンプルからのOBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、および

(iv)対照サンプルと比較して、患者のサンプルがより高いメチル化度のOBCAMまたはNTM遺伝子を有する場合、これが良い結果の可能性が低いことを示すステップを含む方法。

【請求項8】

患者の癌疾患の進行を判定する方法であって、

(i)患者から、NTM遺伝子を含む患者からのサンプルを得るステップ、

(ii)NTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、

(iii)患者のサンプルからのNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、

および、対照サンプルと比較して、NTMのメチル化度が増加している場合、これが疾患の進行を示すステップ

を含む方法。

【請求項9】

OBCAMまたはNTMのCpGアイランドのメチル化を分析する、請求項6から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

癌または腫瘍が、卵巣癌または卵巣腫瘍、あるいは結腸癌または結腸腫瘍である、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

核酸をオブション(a)に記載の核酸と接触させ、癌が卵巣癌である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項12】

核酸をオブション(b)に記載の核酸と接触させ、癌が結腸直腸癌である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項13】

サンプルが、癌が疑われるか、あるいは癌が発見できるかまたはすでに発見されている組織のサンプルである、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

サンプルが卵巣のサンプルであり、癌が卵巣癌である、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

サンプルが結腸のサンプルであり、癌が結腸直腸癌である、請求項1から9、12または13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記OBCAMもしくはNTM遺伝子のDNA、または前記OBCAMもしくはNTMのcDNA配列、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはそれらの相補体が、検出可能な標識をさらに含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記選択的にハイブリダイズする核酸が一本鎖である、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記選択的にハイブリダイズする核酸が、二本鎖であるときは10000より少ない塩基対、または一本鎖であるときは10000より少ない塩基を有する、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記選択的にハイブリダイズする核酸が、二本鎖であるときは1000より少ない塩基対、または一本鎖であるときは1000より少ない塩基を有する、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

前記ハイブリダイズする核酸が、二本鎖であるときは10～100個の塩基対、または一本鎖であるときは10～100個の塩基を有する、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記ハイブリダイズする核酸が、二本鎖であるときは15～30個の塩基対、または核酸が一本鎖であるときは15～30個の塩基を有する、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記ハイブリダイズする核酸が、OBCAMのcDNAの一部を含む、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項 23】

前記ハイブリダイズする核酸が、NTMのcDNAの一部を含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 24】

一部分が一本鎖部分である、請求項22または23に記載の方法。

【請求項 25】

前記一部分が、OBCAM遺伝子またはNTM遺伝子、またはOBCAMのcDNAもしくはmRNA、またはNTMのcDNAもしくはmRNAの一部を、核酸増幅反応において増幅させることができる、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

患者の癌を診断する方法であって、

(i)患者に由来するタンパク質を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)(a)OBCAMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的性状、あるいはOBCAMポリペプチドの相対活性、または活性変化、または変化した活性、あるいは

(b)NTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的性状、あるいはNTMポリペプチドの相対活性、または活性変化、または変化した活性、あるいは

(c)(a)と(b)の両方

を判定するステップを含む方法。

20

【請求項 27】

患者の癌の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

(i)患者に由来するタンパク質を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)(a)OBCAMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的性状、あるいはOBCAMポリペプチドの相対活性、または活性変化、または変化した活性、あるいは

(b)NTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的性状、あるいはNTMポリペプチドの相対活性、または活性変化、または変化した活性、あるいは

(c)(a)と(b)の両方

を判定するステップを含む方法。

30

【請求項 28】

癌が卵巣癌または結腸癌である、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 29】

サンプルが、癌が疑われるか、あるいは癌が発見できるかまたはすでに発見されている組織のサンプルである、請求項26から28のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 30】

サンプルが卵巣のサンプルであり、癌が卵巣癌である、請求項26から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

サンプルが結腸のサンプルであり、癌が結腸直腸癌である、請求項26から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

OBCAMポリペプチドの相対量、または細胞内位置を、OBCAMポリペプチド、またはその天然

50

変異体もしくは断片に選択的に結合する分子を使用して決定する、請求項26から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

NTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置を、NTMポリペプチド、またはその天然変異体もしくは断片に選択的に結合する分子を使用して決定する、請求項26から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

OBCAMまたはNTMポリペプチド、またはその天然変異体もしくは断片に選択的に結合する分子が、抗OBCAMまたは抗NTM抗体である、請求項32または33に記載の方法。

【請求項35】

抗OBCAM抗体が請求項55で定義する抗体である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

OBCAMまたはNTMに選択的に結合する分子が、検出可能な標識を含む、請求項32から35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

OBCAMまたはNTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置を、OBCAMまたはNTMポリペプチドの活性をアッセイまたは検出することによって決定する、請求項26から31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

(a)OBCAM遺伝子、もしくはその変異対立遺伝子、またはOBCAMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、またはそれらの相補体、あるいは
(b)NTM遺伝子、もしくはその変異対立遺伝子、またはNTMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、またはそれらの相補体、あるいは
(c)(a)と(b)の両方
と選択的にハイブリダイズする核酸の使用であって、癌を診断するための試薬の製造における使用。

【請求項39】

(a)OBCAMポリペプチド、またはその天然の断片もしくは変異体、あるいは
(b)NTMポリペプチド、またはその天然の断片もしくは変異体
と選択的に結合する分子の使用であって、癌を診断するための試薬の製造における使用。

【請求項40】

癌を診断する方法における、請求項38で定義した核酸の使用。

【請求項41】

(a)OBCAMポリペプチド、またはその天然の断片もしくは変異体、あるいは
(b)NTMポリペプチド、またはその天然の断片もしくは変異体
と選択的に結合する分子の使用であって、癌を診断する方法における使用。

【請求項42】

図7で付番した残基95のプロリンがアルギニンである、OBCAMポリペプチドの変異体と、前記分子が選択的に結合する、請求項39または41のいずれか一項に記載の使用。

【請求項43】

組織サンプル中の異型接合性の消失を判定する方法であって、(i)組織に由来する核酸を含むサンプルを得るステップ、および(ii)前記核酸のマイクロサテライトのプロファイルと参照(同型接合性)組織のそれを比較するステップであって、マイクロサテライトを、

(a)OBCAM遺伝子、または

(b)NTM遺伝子、または

(c)(a)と(b)の両方

のいずれかを参照することによって選択するステップを含む方法。

【請求項44】

患者の癌を治療する方法であって、OBCAMまたはNTM遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはOBCAMまたはNTMのcDNAと選択的にハイブリダイズする核酸を、患者に投与

10

20

30

40

50

するステップを含む方法。

【請求項 4 5】

患者の癌を治療する方法であって、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの機能的変異体もしくは一部分もしくは融合体をコードする核酸を、患者に投与するステップを含む方法。

【請求項 4 6】

癌を治療するための薬剤の製造における、請求項44で定義した核酸の使用。

【請求項 4 7】

患者の癌を治療する方法であって、有効量のOBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体もしくは融合体を患者に投与して、癌を改善するステップを含む方法。 10

【請求項 4 8】

癌を治療するための薬剤の製造における、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体もしくは融合体の使用。

【請求項 4 9】

患者の癌を治療する方法であって、腫瘍細胞中に見られる変異OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能を阻害するか、あるいは野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現を上方制御する、有効量の化合物を患者に投与するステップを含む方法。

【請求項 5 0】

患者のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子がメチル化されている癌を治療する方法であって、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子のDNAのメチル化を低下させるか、あるいは阻害する、有効量の化合物を患者に投与するステップを含む方法。 20

【請求項 5 1】

細胞中のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子の発現を増大させるための方法であって、DNAのメチル化を低下させるか、あるいは阻害する、有効量の化合物を細胞に投与するステップを含む方法。

【請求項 5 2】

細胞が患者中に存在する、請求項51に記載の方法。

【請求項 5 3】

癌を治療するための薬剤の製造における、変異OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能を阻害する、あるいは野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現を上方制御する、化合物の使用。 30

【請求項 5 4】

変異OBCAMもしくはNTMポリペプチド、またはその断片と反応する抗体であって、前記変異OBCAMもしくはNTMポリペプチドが、癌細胞中に見られる変異体である、および/または図9 A ~ C に示す挿入アミノ酸配列を含む抗体。

【請求項 5 5】

変異OBCAMが、図7で付番した残基95において、プロリンではなくアルギニンを有する、請求項54に記載の抗体。

【請求項 5 6】

変異OBCAMまたはNTMポリペプチドをコードする核酸と選択的にハイブリダイズする核酸であって、前記変異OBCAMまたはNTMが、癌細胞中に見られる変異体である、および/または核酸が図9 A ~ C に示す挿入配列を含む核酸。 40

【請求項 5 7】

OBCAMもしくはNTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいは、OBCAMもしくはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、およびOBCAMまたはNTM遺伝子中の変異を検出するための手段であって、前記変異が、癌細胞中に見られるOBCAMまたはNTM中の変異である手段を含むパーツのキット。

【請求項 5 8】

遺伝子または核酸が、図7で付番したヌクレオチド334においてシトシンの代わりにグアニンを有するOBCAM変異体対立遺伝子である、請求項38に記載の使用、または請求項56に記載の核酸、または請求項57に記載のキット。

【請求項59】

(a)OBCAM遺伝子、もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、またはOBCAMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは

(b)重亜硫酸塩処理したメチル化OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは

(c)重亜硫酸塩処理した非メチル化OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは 10

(d)(a)および(b)、または(a)および(c)、または(b)および(c)、または(a)、(b)および(c)ならびに重亜硫酸塩の源を含むパーツのキット。

【請求項60】

(a)NTM遺伝子もしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、またはNTMのcDNAもしくはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは

(b)重亜硫酸塩処理したメチル化NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは 20

(c)重亜硫酸塩処理した非メチル化NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、あるいは

(d)(a)および(b)(a)および(b)、または(a)および(c)、または(b)および(c)、または(a)、(b)および(c)

ならびに重亜硫酸塩の源を含むパーツのキット。

【請求項61】

対照のメチル化DNAをさらに含む、請求項59または60に記載のキット。

【請求項62】

DNAポリメラーゼをさらに含む、請求項59から61のいずれか一項に記載のキット。 30

【請求項63】

哺乳動物細胞中において、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの機能的断片もしくは変異体もしくは融合体を発現させることができる遺伝子療法用ベクター。

【請求項64】

OBCAMもしくはNTMポリペプチド、またはそれらの機能的変異体もしくは一部分もしくは融合体をコードする核酸を含む遺伝子療法用ベクター、および薬剤として許容される担体を含む薬剤組成物。

【請求項65】

OBCAMもしくはNTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子、あるいはOBCAMもしくはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸を含む遺伝子療法用ベクター、および薬剤として許容される担体を含む薬剤組成物。 40

【請求項66】

OBCAMもしくはNTMポリペプチド、またはその断片もしくは変異体もしくは融合体、および薬剤として許容される担体を含む薬剤組成物。

【請求項67】

医薬品中に使用するための、請求項63から65のいずれか一項で定義した核酸。

【請求項68】

医薬品中に使用するための、OBCAMもしくはNTMポリペプチド、またはその断片もしくは変異体もしくは融合体。

【請求項69】

OBCAMの機能を調節する化合物を同定する方法であって、OBCAM遺伝子またはcDNA、またはポリペプチド、またはそれらの一部分を試験化合物と接触させること、およびその効果を決定することを含む方法。

【請求項70】

NTMの機能を調節する化合物を同定する方法であって、NTM遺伝子またはcDNA、またはポリペプチド、またはそれらの一部分を試験化合物と接触させること、およびその効果を決定することを含む方法。

【請求項71】

サンプルが血液である、請求項1から13、16から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項72】

癌を治療する際に有用である可能性がある化合物を同定する方法であって、請求項69または70のステップを含む方法。

【請求項73】

本明細書で開示する、癌の診断、予後または治療の任意の新規な方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は癌、特に卵巣癌および結腸直腸癌に関する。

【背景技術】

【0002】

癌は重大な疾患であり、主たる死因である。近年、いくつかの癌の診断および治療においては進展があるが、診断および治療を改善する必要性が依然として存在する。

【0003】

癌は遺伝性疾患であり、たいていの場合、1つまたは複数の遺伝子の変異と関係がある。ヒトゲノム中には約30~40,000個の遺伝子が存在すると考えられているが、これらの遺伝子の一握りのみが癌と関係があることが示されている。現在同定されている遺伝子よりも多くの遺伝子が、癌と関係があることが発見されるであろうことが推量されるが、分子の分析技法が利用可能であるにもかかわらず、この分野の進歩は依然として遅い。これは、今日までに同定されている遺伝子のさまざまな構造および機能のためである可能性があり、このことは、癌遺伝子が多くの形をとり、多くの異なる機能を有することができることを示唆している。

【0004】

卵巣癌は、西側の世界では婦人科学上の悪性腫瘍の最も頻度の高い死因であり、イングランドおよびウェールズでは5,500の新しい症例が毎年発生する。卵巣癌は、アメリカ人女性の癌による死亡の第4の最も一般的な原因である。上皮性卵巣癌を有する大部分の患者は、この疾患の進行段階にある。したがって、白金及びタクソールなどの新しい薬剤の導入にもかかわらず、十分な外科手術及び化学療法の後での、5年の生存率はわずか30%である(Advanced Ovarian Cancer Trialists Group(1991)BMJ 303, 884-893;Ozols(1995)Semin Oncol.22, 61-66)。しかしながら、第I段階の疾患(卵巣に限る)を有する患者は、5年の生存率が70%であり良い。したがって、生存に対する有意な影響を与えるために、転移前に癌を検出するための技法を有することが望ましい。

【0005】

上皮性卵巣癌は、卵巣癌の70~80%を構成し、局所的な良性腫瘍、および境界的な悪性の可能性の新生物から侵襲性腺癌の範囲に及ぶ、広範囲の病巣を含む。組織学的に、一般的な上皮性卵巣癌は、いくつかのタイプ、すなわち漿液性、ムチン性、子宮内膜性、明細胞、混合上皮性、および未分化腫瘍に分類される。組織学的なサブタイプの異質性は、腹膜および尿生殖器系の残り部分と共通な発生源を共有する、卵巣表面のミューラー型上皮の後形質の可能性を反映する。生殖細胞、性策/基質腫瘍、および肉腫は、卵巣癌の残りである。上皮性卵巣癌の組織発生的および生物学的性質は、このような腫瘍の分化またはそれらの進行に貢献する可能性がある分子遺伝学的変化と同様に、あまり理解されていない。

10

20

30

40

50

排卵に関する疫学的要因は重要であるようであり、卵巣上皮細胞は、分裂および増殖による成長のいくつかの過程を経て、上皮表面の傷を癒す。これらによって、上皮封入のう胞の分化がもたらされ、明白な悪性腫瘍がそれらから生じる可能性がある(Fathalla(1971)Lancet 2、163)。

【0006】

卵巣癌のスクリーニングの概要は、Bell et al(1998)Health Technology Assessment 2、1-50中に与えられている。

【0007】

腫瘍の遺伝的变化は、癌の分化に関して重要である。多くの染色体領域(染色体3、5、6、8、11、13、17、18、22およびX)は、突発性卵巣癌の腫瘍の進行と関連がある、腫瘍抑制遺伝子を含むことが示されてきているが、p53遺伝子(染色体アーム17p)のみが、頻繁に変異することが見出されてきている(Shelling et al(1995)Br.,T.Cancer 72、521-527)。それぞれ1994年および1996年に単離された、BRCA1遺伝子(染色体アーム17q)およびBRCA2遺伝子(染色体アーム13q)は、家族性乳癌/卵巣癌を有する一部分の患者で変異する(Ford & Easton(1995)Br.J.Cancer 72、805-812)。家族性の卵巣癌は、卵巣腫瘍全体のわずか5~10%を占める。突発性卵巣癌を有する患者からの腫瘍では、BRCA1遺伝子のわずか5つの変異体、BRCA2遺伝子の4つの変異体が報告されてきており(Takahashi et al(1995)Cancer Res .55、2998-3002;Takahashi et al(1996)Cancer Res.56、2738-2741)、これらは突発性卵巣癌においては珍しいことが示唆される。ミスマッチ修復遺伝子の変異は、10%の頻度で報告されてきている(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)。したがって、突発性卵巣癌の腫瘍の進行において、より重要である可能性がある遺伝子は、いまだ完全には特徴付けられていない。

【0008】

W096/05306、W096/05307およびW096/05308は、ヒトの乳癌および卵巣癌の素因である遺伝子(BRCA1)を単離および検出するために使用される、方法および物質に関するものであり、その遺伝子のいくつかの変異対立遺伝子は、癌、特に乳癌および卵巣癌に対する罹患性を引き起こすと言われている。

【0009】

腫瘍抑制活性は、染色体11上にコードされていることが示唆されてきている(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;EP0727486;Gabra et al(1998)Proc.AACR 39、Abstract#4236;and Gabra et al(1998)Br J.Cancer 78、Poster P185)が、これらの論文はいずれも、候補となる遺伝子を同定していない。

【0010】

大腸の結腸直腸腫瘍は、西側の世界ではヒトの癌による死亡率の頻度の高い死因であり、英国では1年当たり約19,000人が死んでいる。

【0011】

結腸直腸の大部分の癌は、腺癌である(Jass and Morson(1987)J.Clin.Pathol.40、1016-1023;Morson(1974)Proc.R.Soc.Med.67、451-457)。文献は、結腸直腸癌腫の真の起源に関して意見が分かれたままであり、癌腫が、既存の良性新生物(腺腫と呼ばれる)中、腺腫~癌腫配列と呼ばれているものの中(Muto et al(1975)Cancer 30、2251-2270)から、あるいは腺腫段階なしで(新しい)全身の異形成の領域を介して、生じる可能性があることが提案されてきている。いくつかの結腸直腸癌は腺腫に由来することが考えられるが、大部分の腺腫は、癌腫を進行させるために出現するわけではなく、実際退行させる可能性さえある(Knoernschild(1963)Surg.Forum XIV 137-138)。環境、食生活、年齢および性別に関する証拠によって、これらはすべて結腸直腸癌に関する危険因子であることが示唆されるが、いずれの場合もこれらの因子の関与が確認されていないため、結腸直腸癌腫の形成に関す

10

20

30

40

50

る根底の遺伝基盤が示唆される。大部分の結腸直腸癌は、明白な遺伝性症候群とは関連がないが、家族性大腸ポリポーシス(FPC)、ガードナー症候群、遺伝性非結腸直腸癌ポリポーシス(HNPCC)およびターコット症候群を含めた、遺伝形が存在する。

【0012】

いくつかの癌遺伝子、および腫瘍抑制遺伝子は、結腸直腸の腫瘍形成において明確な役割を果たすことが現在示されているが、一方で他の遺伝子座では、LOHと結腸直腸癌の間の相関関係は、充分には定義されていない。特に、Barx2遺伝子は、卵巣癌および結腸直腸癌と関連がある11q24-q25LOH領域において、候補となる腫瘍抑制物質であることが見出された(W000/77252)。

【0013】

IgLON(免疫グロブリンLAMP、OBCAM、およびニューロトリミン)は、免疫グロブリン(Ig)ドメイン含有細胞接着性分子のファミリー、Igドメイン含有タンパク質(IgSF)のIgスーパーファミリーの一部である。IgLOHはLAMP(膜タンパク質と結合した大脳辺縁系)、OBCAM/OPCML(オピオイド結合細胞接着性分子、以前はGP55Aと呼ばれた)、およびニューロトリミン(ヒトのNTMまたはHNT、またはヒヨコのCEPU-1)からなる。近年、IgLOHファミリーは、ラットのニューロトラクチンを含むことが示されてきている(LONのkilon-Kindredはヒヨコの相同体である)。IgLOHはすべてが細胞外タンパク質であり、それら自体は膜タンパク質ではなく、実際には細胞膜と直接接触さえする。その代わりにIgLOHは、タンパク質のC末端近くにアンカー結合した、GPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)によって細胞膜に結合し、次いでこれが細胞膜に挿入される。したがって、今だ同定されていないGタンパク質シグナル経路とのトランスおよびシス相互作用によって、核へのシグナリング、次にIgLOHの結合が行われると仮定される(Clarke and Moss(1997)Eur.J.Neurosci.9:334-41)。

10

20

30

【0014】

OBCAMおよびNTMをコードする遺伝子は、染色体11の11q24-q25領域に位置している。2つの遺伝子は、それぞれヌクレオチドおよびアミノ酸レベルで、約80%および76%の同一性を共有している。マウスでは、両方のタンパク質が異なる遺伝子によってもコードされており、これらの遺伝子は、マウス染色体9の近位端上、ヒト染色体11q24-q25と遺伝子が同じ染色体上にある領域に集まっているようである。したがって、これらの非常に関連した遺伝子は、ヒトとマウスの分岐よりも少なくとも前に起こった、先祖代々の遺伝子複製事象の結果として生じた可能性が最も高いようである(Struyk AF et al(1995)J.Neurosci 15(3):2141-56)。

【0015】

IgLONの機能は、ニューロン軸索の誘導、および脳の発達における細胞間の接触の脈絡において主に記載されてきている。IgLOHファミリーのメンバーは、1つの細胞タイプで同時に発現させることができ、細胞表面上のそれらの相対的なレベル、および結果として生じる異好性の相互作用、さらに同性の相互作用は、IgLOHの機能を説明する際に重要である可能性がある。膜の面でのホモダイマー化(三量体化も)は、NTMのシス相互作用の特徴である(Gil et al(1998)J.Neuroscience 18:9312-9325)。IgLOHファミリーのメンバーが癌と関連があることは、以前には示唆されておらず、特にIgLOHファミリーのメンバーが、腫瘍抑制遺伝子である可能性があることは、以前には示唆されていない。

40

【0016】

驚くことに、11q24-q25に位置するBarx2腫瘍抑制物質に加えて、この領域内の2つの他の遺伝子が、癌中でメチル化、変異および/または欠失することが現在見出されている。OBCAMおよびNTM遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子として、卵巣癌および結腸直腸癌と関連していると考えられる。

【0017】

この予期せぬ観察結果によって、癌、特に卵巣癌および結腸直腸癌を診断および治療する新しい方法が与えられる。

【非特許文献1】

50

- Advanced Ovarian Cancer Trialists Group(1991)BMJ 303、 884-893;Ozols(1995)Semin Oncol.22、 61-66
 【非特許文献 2】
- Fathalla(1971)Lancet 2、 163
 【非特許文献 3】
- Bell et al(1998)Health Technology Assessment 2、 1-50
 【非特許文献 4】
- Shelling et al(1995)Br.,T.Cancer 72、 521-527
 【非特許文献 5】
- Ford & Easton(1995)Br.J.Cancer 72、 805-812 10
 【非特許文献 6】
- Takahashi et al(1995)Cancer Res.55、 2998-3002
 【非特許文献 7】
- Takahashi et al(1996)Cancer Res.56、 2738-2741
 【非特許文献 8】
- Tangi et al(1996)Cancer Res.56、 2501-2505
 【非特許文献 9】
- Fujita et al(1995)Int.J.Cancer 64、 361-366
 【非特許文献 10】
- Orth et al(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91、 9495-9499 20
 【特許文献 1】
- W096/05306
 【特許文献 2】
- W096/05307
 【特許文献 3】
- W096/05308
 【非特許文献 11】
- Tanaka et al(1991)Nature 349、 340-342
 【非特許文献 12】
- Rimessi et al(1994)Oncogene 9、 3467-3474 30
 【非特許文献 13】
- Satoh et al(1993)Mol.Carcinogenesis 7、 157-164
 【非特許文献 14】
- Yoshida et al(1994)Mol.Carcinogenesis 9、 114-121
 【非特許文献 15】
- Gabra et al(1996)Int.J.Oncol.8、 625-631
 【非特許文献 16】
- Gabra et al(1996)CancerRes.56、 950-954
 【非特許文献 17】
- Gabra et al(1995)Br.J.Cancer 72、 367-375 40
 【特許文献 4】
- EP0727486
 【非特許文献 18】
- Gabra et al(1998)Proc.AACR 39、 Abstract #4236
 【非特許文献 19】
- Gabra et al(1998)Br J.Cancer 78、 Poster P185
 【非特許文献 20】
- Jass and Morson(1987)J.Clin.Pathol.40、 1016-1023
 【非特許文献 21】
- Morson(1974)Proc.R.Soc.Med.67、 451-457 50

- 【非特許文献 2 2】
Muto et al(1975)*Cancer* 30、2251-2270
- 【非特許文献 2 3】
Knoernschild(1963)*Surg.Forum* XIV 137-138
- 【特許文献 5】
W000/77252
- 【非特許文献 2 4】
Clarke and Moss(1997)*Eur.J.Neurosci.* 9:334-41
- 【非特許文献 2 5】
Struyk AF et al(1995)*J.Neurosci* 15(3):2141-56 10
- 【非特許文献 2 6】
Gil et al(1998)*J.Neuroscience* 18:9312-9325
- 【非特許文献 2 7】
Molecular Cloning、a laboratory manual、2nd edition、Sambrook他(eds)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、USA
- 【非特許文献 2 8】
Jacobs et al(1988)*Nucl.Acids Res.*16、4637
- 【非特許文献 2 9】
Tyagi & Kramer(1996)*Nature Biotechnology* 14、303-308
- 【特許文献 6】 20
米国特許第5,445,934号
- 【特許文献 7】
W096/31622
- 【特許文献 8】
W095/22058
- 【非特許文献 3 0】
「Laboratory Protocols for Mutation Detection」1996、ed.Landegren、Oxford University Press
- 【非特許文献 3 1】
PCR;Saiki et al(1988)*Science* 239、487-491 30
- 【非特許文献 3 2】
Compton(1991)*Nature* 350、91-92
- 【非特許文献 3 3】
AIDS(1993)、Vol 7(Suppl,2)
- 【非特許文献 3 4】
Walker et al(1992)*Nucl.Acids Res.*20、1691-1696
- 【非特許文献 3 5】
Balaguer et al(1991)「Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent」*Anal.Biochem.*195、105-110
- 【非特許文献 3 6】 40
Dilesare et al(1993)「A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation」*BioTechniques*15、152-157
- 【非特許文献 3 7】
Herman et al(1996)*Proc.Nad.Acad.Sci.USA* 93、9821-9826
- 【非特許文献 3 8】
Maekawa et al(2001)*Clin Chem Lab Med* Feb;39(2):121-8
- 【非特許文献 3 9】
Maekawa M et al(1999)*Biochem Biophys Res Commun* 262(3):671-6
- 【特許文献 9】
W000/61754 50

【特許文献 1 0】

W099/46281

【非特許文献 4 0】

Monoclonal Antibodies:A manual of techniques、H Zola(CRC Press、1988)

【非特許文献 4 1】

Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and applications、J G R Hurrell(CRC Press、1982)

【特許文献 9】

David他の米国特許第4,376,110号および第4,486,530号

【特許文献 1 0】

米国特許第5,252,479号

【特許文献 1 1】

PCT公開出願W093/07282

【非特許文献 4 2】

Feng et al(1997)Nature Biotechnology 15、866-870

【非特許文献 4 3】

Nabel(1992)Hum.Gene Ther.3、399-410

【特許文献 1 2】

1984年9月13日に公開された、Geysen、PCT公開出願W084/03564

【非特許文献 4 4】

Erickson et al(1990)Science 249、527-533

【非特許文献 4 5】

Wells(1991)Methods Enzymol.202、390-411

【非特許文献 4 6】

Knudsen AG、1971 Proc Natl Acad Sci 68(4)p820-823

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明の第1の態様は、

患者の癌を診断する方法であって、

(i)患者から核酸を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)前記核酸を

(a)OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはOBCAMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸、または

(b)NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸、または

(c)(a)と(b)両方と、接触させるステップを含む方法を提供する。

【0019】

本発明の第2の態様は、

患者の癌の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

(i)患者から核酸を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)前記核酸を

(a)OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはOBCAMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸、または

(b)NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸、または

10

20

30

40

50

(c)(a)と(b)両方と、接触させるステップを含む方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

OBCAMまたはNTMの変異、または活性の欠如の識別は、予後(すなわち結果と関連付けること)に関して、遺伝子療法またはアゴニスト/擬似治療(以下参照)による治療に、患者が適している可能性があるかどうか判定する際に、非常に有用であると考えられる。

【0021】

特に、異型接合性の消失によるOBCAMの活性の欠如は、たとえば卵巣癌の初期事象であると考えられる。NTMの異型接合性の消失は、卵巣癌中のOBCAMの消失より後に起こると考えられる。したがって、OBCAMの活性の欠如または変異を識別することによって、癌の発症の可能性に関して十分に情報を与えることができ、一方OBCAMおよびNTMの分析、および両方の遺伝子の活性の欠如または変異(欠失など)の識別(たとえばメチル化分析、またはLOH分析による)によって、疾患の進行の程度に関する結論を与えることができ、この場合、同じ患者に異なる回数で方法を行う。

【0022】

以下でさらに論じるように、OBCAMまたはNTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸は、ひとたび前記遺伝子を改変処理、たとえば以下でさらに論じるように、重亜硫酸塩またはメチル化感受性制限酵素を用いた処理に曝すと、前記遺伝子とハイブリダイズすることができる。したがって、本発明の第1または第2の態様の方法は、患者からの前記核酸を試験核酸と接触させる前に、患者からの前記核酸を改変処理、たとえば重亜硫酸塩処理に曝すステップをさらに含むことができる。

【0023】

卵巣癌の早期検出は非常に有用である。なぜならこの癌タイプは、腫瘍発達の後期段階まで無症候性のままであるからである。

【0024】

患者はヒト患者であることが好ましく、一般に、OBCAMおよびNTMに関する参照は、ヒトOBCAMおよびヒトNTMをそれぞれ参照する。

【0025】

OBCAMまたはNTM遺伝子、またはそれらの一部分は、他の適切なヒト遺伝子ライブラリー、標準的なコスミドなど、または酵母菌人工染色体(YAC)またはP1-人工染色体(PAC)ライブラリーから容易に得ることができることは、当業者により容易に理解されるであろう。OBCAMまたはNTMのcDNAをプローブとして使用して、それぞれOBCAMまたはNTM遺伝子の、すべてまたは一部分を同定することができる。

【0026】

OBCAMのcDNA配列は、受託番号NM_002545でGenBankから公に入手可能である。この配列は、図7にも示す。ラットおよびウシ中のOBCAMに関する他の配列は、以下の受託番号M88711(*Rattus noevigicus*)およびX12672(*Bos taurus*)でGenBankから入手可能である。

【0027】

遺伝子のゲノム構造は、cDNA配列、たとえばGenBankのcDNA配列を、GenBankデータベースからのゲノムBACクローンの配列と比較することによって、決定することができる。以下のBACまたはPACクローンは、OBCAM遺伝子:AC027631(ただし、GenBankのこの配列は、染色体18を参照して誤って注釈を施されている;この配列中に含まれるマーカーは、すべて染色体11である)、AC027631、AC012234、AP000843およびAP000912を含む。HGSプロジェクトの一部として関連する配列決定センターから、これらを得ることができる。

【0028】

OBCAM遺伝子は、染色体11上にD11S4085遺伝マーカーを含むと考えられる。実施例中にさらに詳細に記載するように、D11S4085マーカーは、卵巣癌および結腸直腸癌中の染色体11の1つの対立遺伝子から失われたものとして同定されている(それぞれ56%(24/43)および32%(8/25)の症例)。D11S4085マーカーは、D11S1320マーカーとテロマー化して位置すること

が知られている。D11S4085マーカーはイントロンのためであり、OBCAMの第2のイントロン、約300~600kb、D11S1320とテロマー化している。したがって、本発明の第1または第2の態様の代替実施形態では、ステップ(ii)のパート(a)を、以下のように表すことができる：

「マイクロサテライトであるマーカーD11S4085を含むポリヌクレオチド、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸、または」

【0029】

この場合ポリヌクレオチドは、D11S4085マーカーを含む任意のポリヌクレオチドであってよい。ポリヌクレオチドはOBCAM遺伝子の少なくとも一部分を含むことが好ましく、OBCAM遺伝子全体を含むことがより好ましい。さらに好ましくは、ポリヌクレオチドは染色体11、またはその一部分であり、その一部分は少なくとも100、500、5000、10000または50000個のヌクレオチド長である。好ましくは、ポリヌクレオチド部分は、D11S4085マーカーのいずれかの側に、染色体11の少なくとも50、100、2500、5000または25000個の連続したヌクレオチドを含むものである。

10

【0030】

D11S4085は、OBCAMのイントロン2内のゲノム配列の側面に位置する。これはBACAC012234上にある。イントロン2の一部のヌクレオチド配列を、図16A~Dに示す。しかしながら、図16A~Dはイントロン/エクソン境界のみを示し、完全長のイントロンは示さないの

で、マーカーD11S4085はこの図中には示さない。

【0031】

したがって、以下の「OBCAM遺伝子」に関する参照事項は、前で定義したD11S4085マーカーを含むポリヌクレオチドに関する参照事項であることは理解されるであろう。

20

【0032】

NTMのcDNA配列は、受託番号NM_016522でGenBankから公に入手可能である。この配列は、図8にも示す。ラット中のNTMに関する他の配列は、受託番号NM-017354(*Rattus norvegicus*)でGenBankから入手可能である。

【0033】

遺伝子のゲノム構造は、cDNA配列、たとえばGenBankのcDNA配列を、GenBankデータベースからのゲノムBACクロンの配列と比較することによって、決定することができる。以下のBACまたはPACクロンは、NTM遺伝子:AC012134、AC018368およびAP0000912を含む。HGSプロジェクトの一部として関連する配列決定センターから、これらを得ることができる。

30

【0034】

他のNTMのcDNA配列は、W000/61754のクローン11753149.0.6および11753149.0.37、およびW099/46281のPR0337の配列を含むことができる。

【0035】

図9A~Cに示す他のNTMのcDNA配列を、我々は決定している。これらの配列は、たとえばヒト卵巣の表面上皮中に見られる。ヒト卵巣の表面上皮における主要な形は、「+33bp」形であるようである。「+69bp」形は、他の代替形である。両方の形は共に、図8に示す配列中、および前に参照したデータベースの項目中よりもヒト卵巣の表面上皮中に豊富であるようである。他の形は「+108bp」形であり、これは追加の108bpを含み、これによって未熟なタンパク質の翻訳停止がもたらされ、カルボキシ末端にGPIアンカー結合部位が欠けている切断型NTMタンパク質イソ型が生成すると予想される。したがって、切断型タンパク質は、GPIアンカーによって細胞膜に結合することはないと予想される。したがって、このイソ型はNTMの可溶性であってよく、これは細胞外に位置する可能性があり、GPI結合型NTMの正常な機能を害するかあるいは調節する可能性がある。

40

【0036】

したがって、本発明の第1または第2の態様に関しては、NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸は、+33bpおよび/または+69bpおよび/または+108bpのNTM遺伝子またはcDNA、またはその相補体とハイブリダイズする

50

ことが好ましい(特に卵巣の癌に関しては)。

【0037】

一実施形態では、前記核酸が、+33bpおよび/または+69bpおよび/または+108bp形のNTM遺伝子またはcDNA、またはそれらの相補体とハイブリダイズすることが好ましい。他の実施形態では、さらに前記核酸が、「正常な」またはデータベースのNTM遺伝子または図8のcDNA配列によって例示されるcDNA配列と、ハイブリダイズしないことが好ましい可能性がある。

【0038】

任意の事象において、OBCAMまたはNTMのcDNAは、よく知られている技法、およびそれぞれ図7および8または9にプローブとして示す、ゲノムクローン的一部分、またはOBCAMまたはNTMのcDNA配列的一部分を使用して、ヒトcDNAライブラリーから容易に得ることができる。適切なヒトcDNAライブラリーは、ヒト卵巣またはヒト卵巣組織、またはヒト脳またはヒトリンパ芽球状から単離したmRNAから作製したライブラリーであるが、異なる組織特異的なNTMのイソ型が、非卵巣組織中に存在してよい。ひとたびOBCAMまたはNTMのcDNAまたは遺伝子、またはその断片が前記のように同定されると、そのヌクレオチド配列は、たとえばサンガーのジデオキシ塩基配列決定法、または当分野でよく知られている他の方法を使用して、容易に決定することができる。

【0039】

OBCAMまたはNTM遺伝子は「野生型」遺伝子として存在する可能性があり、あるいはそれは、前述の野生型遺伝子と配列が異なる、変異対立遺伝子として存在する可能性があることは理解されるであろう。「変異対立遺伝子」によって、OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能または発現の変化をもたらす配列だけでなく、OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能または発現に対してまったく影響がないか、あるいはごくわずかな影響がある、アリアル型変異体(または多型)が含まれる。したがって、本発明の方法において選択的にハイブリダイズする核酸は、野生型OBCAMまたはNTM遺伝子の配列、または野生型OBCAMまたはNTMのcDNA配列(またはmRNA配列)と選択的にハイブリダイズする核酸、およびそれらの変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸を含む。さらに、本明細書でより詳細に記載するように、当業者がOBCAMまたはNTM遺伝子の変異対立遺伝子、およびそれらの多型を容易に同定することができることは容易に理解されるであろう。

【0040】

OBCAM遺伝子の変異対立遺伝子の一例は、実施例5に記載し、この場合エクソン2中のシトシンヌクレオチド(図7に示すGenBankの項目番号NM_002545の位置334におけるもの;図18中には変異体が示される)が、グアニンとして存在する。この変異体は、卵巣癌細胞株PE01およびPE04中で見られるが、PE01およびPE04として同じ患者から単離した繊維芽細胞のDNA中には見られない。変異によって、コードされているアミノ酸配列の変化が生じ、卵巣癌細胞株中では、「野生型」プロリン残基がアルギニンに置換される(図18)。

【0041】

「ポリペプチドOBCAMまたはNTM」によって、我々は、その配列がそれぞれ図7、または8または9に与えるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなり、あるいはその配列がそれぞれ図7、または8または9中でコード領域として示されるヌクレオチド配列、またはその天然変異体によってコードされている、ポリペプチドを含むことにする。OBCAMポリペプチドは、そのアミノ酸配列が図7に与える配列を含む、ポリペプチドであることが好ましい。NTMポリペプチドは、そのアミノ酸配列が図8または9に与える配列を含む、ポリペプチドであることが好ましい。

【0042】

「ポリペプチドOBCAMまたはNTM」によって、我々は、連続した50個のアミノ酸残基部分、またはそれぞれ図7、または図8または9に与えるポリペプチド配列の天然変異体を含む、任意の天然に存在するポリペプチドも含むことにする。ポリペプチドは、ヒトのポリペプチドであることが好ましい。

【0043】

10

20

30

40

50

「OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現の変化」によって、それぞれOBCAMまたはNTMポリペプチドの発現の変化をもたらす、OBCAMまたはNTM遺伝子の任意の変化が含まれる。たとえば、OBCAMまたはNTM遺伝子の転写の変化によって、それぞれOBCAMまたはNTMポリペプチドの発現の変化をもたらされるであろう。同様に、OBCAMまたはNTMのmRNAの翻訳の変化によって、それぞれOBCAMまたはNTMポリペプチドの発現の変化をもたらされるであろう。

【0044】

OBCAMまたはNTMのタンパク質コード配列の変異によって、それぞれOBCAMまたはNTMタンパク質の機能の消失をもたらされる可能性があり、同様に、機能の消失は、OBCAMまたはNTM遺伝子の転写サイレンシング、または優性ネガティブ変異の存在によるものである可能性がある。

10

【0045】

前に定義した本発明の方法は、試験サンプルからの結果と、対照サンプルから、たとえば、知られている非癌性(正常)サンプルなどから、あるいは知られている癌性サンプルからの結果を、直接的または間接的に比較することを含むことができることは理解されるであろう。

【0046】

本発明の方法において有用である核酸は、OBCAMまたはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸として、容易に定義することができることは理解されるであろう。さらに本発明の方法は、遺伝子またはcDNAの源が何であれ、OBCAMまたはNTMの遺伝子またはcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸を使用することを含む。変異OBCAM対立遺伝子の一例を図18に示し、前にさらに詳細に記載する。この変異体と選択的にハイブリダイズする核酸は、図7、16および18に示す配列を使用して、容易に決定することができる。

20

【0047】

「選択的にハイブリダイズする」によって、核酸が前記DNAまたはcDNAと十分なヌクレオチド配列類似性があり、したがってこの核酸は、適度あるいは非常に厳密な条件下でハイブリダイズすることができることが意味される。当分野でよく知られているように、核酸のハイブリダイゼーションの厳密度は、ハイブリダイゼーションが起こる核酸の長さ、ハイブリダイズする配列の同一性の程度などの要因、および温度、イオン強度、および配列のCGまたはAT含有率などの要因に依存している。したがって、前記選択的にハイブリダイズすることができる任意の核酸が、本発明を実施する際に有用である。選択的にハイブリダイズする核酸は、ヒトOBCAMまたはNTM遺伝子、またはcDNAに選択的にハイブリダイズすることが好ましい。

30

【0048】

前記DNAまたはcDNA(ヒトDNAまたはcDNAなど)に選択的にハイブリダイズすることができる核酸には、核酸の少なくとも一部および前記DNAまたはcDNAについて、95%を超える配列同一性、好ましくは98%を超える配列同一性、より好ましくは99%を超える配列同一性を有する核酸がある。よく知られているように、ヒト遺伝子は通常はイントロンを含み、したがって、たとえば前記ヒトDNA中の遺伝子に由来する、mRNAまたはcDNAは、その全長は前記ヒトDNAとは完全には一致しないと思われるが、それでもこれは前記ヒトDNAと選択的にハイブリダイズすることができる核酸であると思われる。したがって、具体的には本発明は、OBCAMまたはNTMcDNAに選択的にハイブリダイズするが、OBCAMまたはNTM遺伝子にはハイブリダイズすることができない、あるいはこの逆の核酸を含む。たとえば、OBCAMまたはNTM遺伝子のイントロン-エクソン境界に広がる核酸は、それぞれOBCAMまたはNTMcDNAに選択的にハイブリダイズすることができない。OBCAM遺伝子のイントロン-エクソン境界は図16A~Dに示し、すべてのイントロンのヌクレオチド配列は不完全である。

40

【0049】

選択的なハイブリダイゼーションをもたらす、典型的な適度あるいは非常に厳密なハイブリダイゼーション条件は当分野でよく知られており、たとえば、参照により本明細書に組み込んである、Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edition, Sambrook他(ed

50

s)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、USA中に記載された条件がある。

【0050】

核酸がナイロン膜上に固定され、プローブの核酸が500以上の塩基または塩基対であるときの、典型的なハイブリダイゼーション溶液の一例は以下のものである：

6×SSC(生理的食塩水、クエン酸ナトリウム)

0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)

100 μg/mlの変性、分画したサケ精液のDNA

【0051】

ハイブリダイゼーションは68 °Cで行う。核酸を固定したナイロン膜は68 °Cにおいて1×SSCで、あるいはさらに高い厳密度のために0.1×SSCで洗浄することができる。 10

【0052】

20×SSCは、以下の方法で調製することができる。175.3gのNaClおよび88.2gのクエン酸ナトリウムを800mlのH₂Oに溶かす。NaOHの10N溶液数滴を用いて、pHを7.0に調節する。H₂Oを用いて、体積を1リットルに調節する。等分試料に分配する。オートクレーブ処理によって滅菌する。

【0053】

核酸がナイロン膜上に固定され、プローブが15個と50個の間の塩基のオリゴヌクレオチドであるときの、典型的なハイブリダイゼーション溶液の一例は以下のものである：

3.0M塩化トリメチルアンモニウム(TMACI) 20

0.01Mリン酸ナトリウム(pH6.8)

1mM EDTA(pH7.6)

0.5%SDS

100 μg/mlの変性、分画したサケ精液のDNA

0.1脱脂粉乳

【0054】

ハイブリダイゼーションの最適温度は、通常は所与の鎖長のT_iより5 °C低い温度を選択する。T_iとは、プローブとその標的配列の間で形成されるハイブリッドの、不可逆的な融解温度である。Jacobs et al(1988)Nucl.Acids Res.16、4637は、T_iの決定を論じている。3 M TMACI中の17量体について奨励されているハイブリダイゼーション温度は48~50 °Cであり、19量体については、それは55~57 °Cであり、20量体については、それは58~66 °Cである。 30

【0055】

「選択的にハイブリダイズする核酸」によって、以下でより詳細に記載するシステム、特にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの、よく知られている任意の増幅システムにより、前記ヒトDNAの領域からDNAを増幅させる核酸も含まれる。PCR増幅に関する適切な条件は、以下の適切な1×増幅用緩衝液中での増幅を含む：

10×増幅用緩衝液は500mMのKClである；100mM Tris.Cl(室温でpH8.3)；15mM Mg Cl₂；0.1%ゼラチン。

【0056】

適切な変性剤または手順(95 °Cに加熱するなど)を使用して、二本鎖DNAの鎖を分離する。 40

【0057】

適切には、増幅のアニーリング部分は37 °Cと60 °Cの間、好ましくは50 °Cである。

【0058】

本発明の方法において有用である核酸はRNAまたはDNAであってよいが、DNAが好ましい。本発明の方法において有用である核酸は二本鎖または一本鎖であってよいが、核酸の増幅反応などのいくつかの条件下では、一本鎖の核酸が好ましい。

【0059】

本発明の方法において有用である核酸は、それが二本鎖である場合、100kbなど非常に大きくてよい。たとえば、このような大きな核酸は、FISH(蛍光in situハイブリダイゼーシ 50

ョン)分析で使用するための、プローブを作製するための鑄型として有用である。典型的には、FISHで使用する標識したプローブは、ニックトランスレーション、またはゲノムクローンからのランダムなプライマーの作製(適切なPACクローン中の挿入など)によって一般的には作製される。ひとたび作製されると、これらのプローブは、ヌクレオチド約50~1000個の長さである。前に記載したニックトランスレーションまたはランダムなプライマーの伸長用の、鑄型として使用することがより好ましい。しかしながら、核酸が10000個より少ない、より好ましくは1000個より少ない、さらに好ましくは10個から100個、さらに好ましくは15個から30個の塩基対(核酸が二本鎖である場合)または塩基(核酸が一本鎖である場合)である場合、いくつかの診断、プローブまたは増幅目的には、その核酸が好ましい。以下により詳細に記載するように、ポリメラーゼ連鎖反応において使用するのに適した、一本鎖DNAのプライマーが特に好ましい。

【0060】

本発明の方法において使用するための核酸は、OBCAMまたはNTM遺伝子、またはOBCAMまたはNTMのcDNAまたはmRNA、またはこれらの変異体にハイブリダイズすることができる核酸である。この遺伝子の断片および変形、およびこの遺伝子によってコードされているmRNAから誘導可能なcDNAも、本発明の方法において使用するための好ましい核酸である。

【0061】

遺伝子そのものと選択的にハイブリダイズする核酸、またはその変異体が非常に有用であることは明らかである。遺伝子の断片は、本発明の方法で使用するのに好ましい。大きな断片の酵素による分解または化学的分解によって、断片を作製することができ、あるいは断片を化学的に合成することができる。「遺伝子」によって、イントロンおよびエクソンだけでなく、イントロンおよびエクソンと関連があり、物理的に近い調節領域、特に5'領域~5'の大部分のエクソンも含まれる。「物理的に近い」によって、50kb以内、好ましくは10kb以内、より好ましくは5kb以内、さらに好ましくは2kb以内が意味される。OBCAMおよびNTM遺伝子の塩基プロモーターおよび調節要素には、転写開始部位またはコード領域の始点からの200~400までの塩基対が存在すると考えられる。しかしながら、組織特異的または誘導要素は、コード領域(エクソン)のいずれかの方向に50kbであってよく、あるいはイントロン中に存在してよい。OBCAMおよびNTM遺伝子のこのような要素は同定することができ、あるいは調節タンパク質の結合の部位を示す、DNAse過敏反応部位(サザンプロットで検出)の近くに位置することができる。

【0062】

あるいは、上流のゲノムDNA(すなわち、5'の大部分のエクソンの上流)、および、たとえば、レポーター酵素としてガラクトシダーゼを使用して、レポーター構築体を生成させることができる。一連の欠失およびフットプリント法を使用して、調節領域を同定することもできる。

【0063】

NTM CpGアイランドは、ATG翻訳開始部位と重複しており、約1.1kbの長さである。OBCAM CpGアイランドは、翻訳開始部位の約500bp上流であり、約900bpの長さである。NTMまたはOBCAM遺伝子のメチル化状態を調べるとき(以下でさらに論じるように)、選択した遺伝子のCpGアイランドと選択的にハイブリダイズする核酸が、非常に有用である可能性がある。

【0064】

遺伝子の「断片」によって、(一本鎖であろうと二本鎖であろうと)少なくともヌクレオチド15個の長さの遺伝子の任意の部分が含まれるが、より好ましくは、断片は少なくともヌクレオチド20個の長さ、最も好ましくは少なくともヌクレオチド50個の長さであり、少なくともヌクレオチド100個の長さであってよく、あるいは少なくともヌクレオチド500個の長さであってよい。断片は50kbを超えないことが好ましく、100kbを超えないことがより好ましい。

【0065】

遺伝子の「変異体」によって、一部分であれ完全長であれ、あるいはmRNAの任意の接合変異体からコピーされたものであれ、cDNAが具体的には含まれる。我々は、本来の遺伝子と

比較して、遺伝子またはその断片中あるいはcDNA中に、ヌクレオチドの置換(逆位を含む)、挿入および欠失が存在する、核酸も具体的には含める。変異体および断片の両方は、その意図する目的;探索、増幅または診断目的に従って選択し、短いが高度の配列同一性(たとえば、少なくとも80%、90%、95%または99%)を有する断片が、一般には必要とされるであろう。OBCAM遺伝子(および対応するcDNA)の変異体の一例には、図7で付番し図18に示すヌクレオチド334においてシトシンがグアニンに置換された変異体がある。

【0066】

本発明の方法で使用するための核酸が、遺伝子またはcDNAの一部を増幅させるために使用することができるオリゴヌクレオチドプライマーである場合、それが特に好ましい。

【0067】

本発明の方法で使用するための好ましい核酸は、OBCAMまたはNTM遺伝子またはcDNAと選択的にハイブリダイズし、他の遺伝子またはcDNAとはハイブリダイズしない核酸である。このような選択的にハイブリダイズする核酸は、たとえばそれぞれ図7および8または9に記載したように、核酸がOBCAMまたはNTMのcDNAとハイブリダイズするかどうかを参照することによって、容易に得ることができる。

10

【0068】

第1および第2の態様の方法を使用して、任意の前記遺伝子またはcDNAの変異の有無を検出することが好ましい。言い換えれば、変異体遺伝子またはcDNAが存在するかどうかである。患者からの核酸中の、図7で付番したOBCAMのヌクレオチド334に対応するヌクレオチドが、図7中のヌクレオチドと同じであるか、あるいはそうではないかを判定することが、

20

【0069】

本発明の方法は任意の癌に関して適しているが、癌が卵巣、結腸直腸の癌、または他の一般的な腺癌、乳、肺、前立腺および頸部の癌などである場合、本発明の方法が好ましい。さらに、OBCAMに関する方法は、白血病にも適しており、NTMに関する方法は脾臓および白血病に適している。これらの方法は、卵巣または結腸の癌に関して特に適しており、方法がOBCAM遺伝子またはcDNA、またはD11S4085マーカーを含むポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズする核酸に関するものであるとき、これらの方法は卵巣癌に関して最も適しており、方法がNTM遺伝子またはcDNAと選択的にハイブリダイズする核酸に関するもの

30

【0070】

患者は、癌または腫瘍が発見されているか、あるいはそれが疑われる任意の個人であってよい。特に好ましい患者は、超音波によって同定される骨盤付近の塊を有する患者、および/またはCA125のレベルがわずかに上昇した患者である。CA125は、Muc16として近年同定された血清中の糖ペプチドであり、卵巣癌用だけではなく、卵巣腫瘍の臨床管理において主に使用される腫瘍マーカーである。

40

【0071】

OBCAMまたはNTM遺伝子の変異は、突発性の癌だけではなく家族性の癌において起こる可能性があるので、患者に由来する核酸を含む任意のサンプルは、本発明の方法において有用であると考えられるが、しかしながら、癌が疑われるか、あるいは癌が発見される可能性があるか発見されている組織のサンプルに核酸が由来する場合は、それが好ましい。たとえば、癌が疑われるか、あるいは癌が発見される可能性があるか発見されている組織が卵巣である場合、核酸を含むサンプルが患者の卵巣に由来する場合は、それが好ましい。卵巣のサンプルは、外科手術による切除、腹壁切除および生検、内視鏡検査および生検、および画像誘導による生検によって得ることができる。超音波、またはテクネチウム-99標識抗体、または卵巣に選択的に結合または位置する抗体断片によって、画像を生じさせるこ

50

とができる。よく知られているモノクローナル抗体HMF1は、卵巣癌を画像化するための適切な抗体である。腹水/腹膜腔液、および腹膜サンプルは、外科手術または腹壁切除によって得ることができる。同様に、癌が疑われるか、あるいは癌が発見される可能性があるか発見されている組織が結腸である場合、核酸を含むサンプルが患者の結腸などに由来する場合、それが好ましい。結腸サンプルは、結腸切除によって得ることができる。

【0072】

OBCAMまたはNTMを分析するために、有益である可能性がある他のサンプルには、リンパ節、血液、血清、および転移の可能性がある部位、実際に転移した部位、たとえば骨がある。たとえば潜在性の疾患、たとえば無症候性の卵巣癌の早期診断のために、サンプルは血液またはリンパ節であることが、特に好ましい。

10

【0073】

サンプルは、たとえば組織の生検により、患者に直接由来するものであってよく、あるいは、たとえば組織からの細胞は組織から身体他の部分に移動しているので、患者の組織から離れた部位に由来するものであってよい。あるいは、たとえば患者からの組織または細胞は*in vitro*で培養することができ、あるいは異種移植モデルにおいて培養することができ、あるいは核酸サンプルは、患者からの起源の核酸から(*in vitro*または*in vivo*)複製されたサンプルであってよいという意味で、サンプルは患者に間接的に由来するものであってよい。したがって、患者に由来する核酸は、患者の内部に物理的に存在していた可能性はあるが、あるいは患者の内部に物理的に存在した核酸からコピーされた可能性がある。腫瘍組織は原発性腫瘍から、あるいは転移物から採取することができる。

20

【0074】

本発明の有用な方法は、任意の適切なサンプルにおける、OBCAMまたはNTM遺伝子の変異の分析、またはOBCAMまたはNTM遺伝子の有無の検出を含むことは理解されるであろう。適切にはサンプルは、患者から新鮮に得られたサンプルであってよく、あるいはサンプルは組織サンプル、たとえばサンプルのライブラリー中に保たれたサンプルであってよい。

【0075】

好都合には、前記ヒトDNAに選択的にハイブリダイズすることができ、本発明の方法において使用する核酸は、検出可能な標識をさらに含む。

【0076】

「検出可能な標識」によって、よく知られている方法を使用して核酸分子中に容易に取り込ませることができる、 ^{32}P 、 ^{33}P または ^{35}S などの任意の好都合な放射性標識が含まれる；核酸中に容易に取り込ませることができる、任意の好都合な蛍光または化学発光標識も含まれる。さらに、「検出可能な標識」という語は、他の部分(ストレプトアビジンとの結合によって検出することができるビオチンなど)との結合によって検出することができる部分；無色の化合物を有色の化合物に転換する能力、あるいはこの逆の能力によって検出することができる(たとえば、アルカリホスファターゼは無色の*o*-ニトロフェニルホスフェートを有色の*o*-ニトロフェノールに転換することができる)、酵素などの部分も含む。好都合には、核酸プローブは固定配列中のある位置を占めていてよく、核酸が前記ヒトDNAの領域にハイブリダイズするかどうかは、固定配列中のハイブリダイゼーションの位置を参照することによって判定することができる。検出可能な標識は、Tyagi & Kramer(1996)Nature Biotechnology 14、303-308中に記載されたような、蛍光体-発光抑制剤の対であってよい。

30

40

【0077】

癌の危険群に入る患者の前駆症状をスクリーニングするために、前述の方法を使用することができることは、理解されるであろう。スクリーニングするための危険度の高い患者は、50才を超える患者、または高い罹患性をもたらす遺伝子(たとえばBRCA1、BRCA2またはp53の素因型)を保有する患者、乳/卵巣癌の家族歴を有する患者、冒された血縁者がいる患者、未産婦、および初潮と閉経の間の長い時間間隔を有する女性を含む。同様に、卵巣腫瘍または結腸腫瘍などの腫瘍を病理学的に分類するために、本発明の方法を使用することができる。

50

【0078】

好都合には、本発明の第1、第2および第3の態様の方法では、前記選択的ハイブリダイゼーションが可能な核酸(検出可能な標識で標識したもの、または標識しないもの)を、ハイブリダイゼーション条件下で、患者に由来する核酸と接触させる。適切なハイブリダイゼーション条件は、前に記載した条件を含む。

【0079】

患者に由来する核酸を含むサンプルが、問題の組織または細胞タイプの実質的に純粋なサンプルではない場合、前記組織または細胞のサンプルを富裕化させることが好ましい。たとえば、血液サンプルなどのサンプル中の卵巣細胞の富裕化は、たとえば細胞選別法、卵巣細胞に選択的な抗体、または上皮細胞に選択的な少なくとも1つの抗体を使用する、蛍光活性化細胞選別(FACS)などを使用して行うことができる。たとえば、Cam 5.2、anticyokeratin7/8、from Becton Dickinson、2350 Qume Drive、San Jose、California、USAが有用である可能性がある。

10

【0080】

好ましい実施形態では、本発明は、初期の卵巣疾患または他の腫瘍タイプに関する、診断用血液検査を提供する。血液検査によって、OBCAMおよび/またはNTMに関して、たとえばこれらの遺伝子の片方または両方のメチル化状態に関して、少数の循環腫瘍細胞を分析することができる。

【0081】

前記サンプルの源は、固定パラフィン包埋標本、および新鮮または凍結組織も含めて、前に論じた生検物質および腫瘍サンプルも含む。患者からの核酸サンプルは、OBCAMまたはNTMと選択的にハイブリダイズする核酸と接触させる前に、処理することができる。たとえば、患者からの核酸サンプルは、選択的増幅、逆転写、固定(配列特異的な固定など)、または検出可能なマーカーの取り込みによって、処理することができる。

20

【0082】

本発明の方法が、OBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化、変異、またはその有無の検出を判定することを含む場合、それが特に好ましい。

【0083】

本発明の第1または第2の態様の方法は、直接的な塩基配列決定;PCR増幅させたエクソンの直接的な塩基配列決定;関連領域内の関連位置においてハイブリダイズさせるために設計した、オリゴヌクレオチドプローブのデファレンシャルハイブリダイゼーション(このハイブリダイゼーションは、当分野でよく知られているいわゆる「チップ」システムにおいて、固定型オリゴヌクレオチドプローブを使用することが好都合である);変性ゲル電気泳動、次に適切な制限酵素による消化、次に関連DNA領域を増幅させることが好ましい;S1ヌクレアーゼによる配列分析;非変性ゲル電気泳動、次に関連DNA領域を増幅させることが好ましい;従来のRFLP(制限断片の長さ多型)アッセイ;ヘテロ二本鎖分析;オリゴヌクレオチドを使用する選択的DNA増幅;分裂間期染色体の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH);特定の変異に関するARMS-PCR(増幅拒否性変異系-PCR);ハイブリダイズした核酸中のミスマッチ部位での切断(その切断は化学的または酵素によるものである);SSCP一本鎖の立体配座多型またはDGGE(不連続または変性勾配ゲル電気泳動);アニーリングした正常の/変異したPCRにより増幅させたDNA中の、ミスマッチを検出するための分析;および、タンパク質切断のアッセイ(エクソンの翻訳及び転写、変異により停止コドンが導入される場合、切断型タンパク質産物が生成すると思われる)を含めた、関連領域内の1つまたは複数の関連位置におけるDNAの塩基配列決定を含むことができる。たとえば切断I酵素を使用して、主要配列の変化から生じる一本鎖DNAの二次構造の変化を検出するなど、他の方法を使用することができる。このシステムは、Gibco BRL、Life Technologies、3 Fountain Drive、Inchinnan Business Park、Paisley PA49RF、Scotlandから市販されている。

30

40

【0084】

本発明の方法は、「DNAチップ」上で行うこともできることは理解されるであろう。このような「チップ」は、米国特許第5,445,934号(Affymetrix;プローブアレイ)、W096/31622

50

(Oxford;プローブアレイ、およびリガーゼまたはポリメラーゼによる伸長)、およびW095/22058(Affymax;オリゴマー基質、および検出するアレイ中の位置に結合する蛍光標識された標的)に記載されており、これらはすべて参照によって本明細書に組み込まれている。

【0085】

変異検出の詳細な方法は、HUGO(Human Genome Organisation)によって、「Laboratory Protocols for Mutation Detection」1996、ed.Landegren、Oxford University Pressに記載されている。

【0086】

非常に大きい(500bp以上)欠失または挿入を検出するために、RFLPが使用される場合、それが好ましい。本発明の方法用に、サザンプロットを使用することができる。

10

【0087】

小さな変化、3~4bpを超える欠失または挿入を検出するためには、小さな領域(最大300bp)のPCR増幅が、好ましい可能性がある。増幅させた配列は塩基配列決定用ゲル上で分析することができ、小さな変化(最少の大きさが3~4bp)は目に見える状態にすることができる。適切なプライマーは、本明細書に記載したように設計する。

【0088】

さらに、サザンプロット分析またはPCRを使用することによって、制限酵素変異部位を検出することができる。たとえば、ゲノムDNAの制限酵素による消化の変異部位を分析するために、ゲル電気泳動、サザンプロット、およびハイブリダイゼーション特異的プローブ(たとえば、OBCAMまたはNTMのcDNAまたは遺伝子に由来する任意の適切な断片)。

20

【0089】

たとえば、変異部位を分析するために、PCRによるDNA増幅、制限酵素による消化、臭化エチジウム、銀染色によるゲルの検出、またはPCRにおける放射性ヌクレオチドまたは蛍光プライマーの取り込みを使用する。

【0090】

他の適切な方法は、特定の変異事象用の対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)の開発を含む。同様の方法が、卵巣または結腸組織などの適切な組織の、RNAおよびcDNAに使用される。

【0091】

OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の任意の部分の、変異を検出することは有用であるが、遺伝子のエクソン中の変異が検出される場合、それが好ましく、変異がコードされている意味を変える変異である場合、それがさらに好ましい。これらの変異の検出は、本発明の好ましい態様である。OBCAM遺伝子のエクソン2(GenBankの項目番号NM_002545で付番したヌクレオチド334)における、シトシンからグアニンへの変異の一例は、実施例5に記載する。

30

【0092】

本発明の方法は、異型接合性の消失(LOH;1コピーの消失を示す)を調べることも含む。LOHは診断用の十分な指標である可能性があり;第2の対立遺伝子の変異/消失を調べることは、必要ではない可能性がある。遺伝子のLOHは、遺伝子のコード配列、およびイントロンの多型性を使用して検出することができる。腫瘍細胞のLOHは、どんな源からのものであれ、血液と比較すると、診断ツールとして有用である。たとえばそれは、腫瘍が進行し、より厳しい治療を必要とすることを示すことができる。

40

【0093】

本発明の前述の方法において使用するのに、特に好ましい核酸は、核酸を増幅させるのに適したプライマーからなる群から選択される核酸である。

【0094】

プライマーは、OBCAMまたはNTM遺伝子またはcDNA配列を示す図面のいずれかに示すヌクレオチド配列とハイブリダイズする、プライマーからなる群から選択することが適切である。プライマーがOBCAMまたはNTM遺伝子のイントロンとハイブリダイズする場合、あるいはプライマーが、他の遺伝子またはcDNAからではなくOBCAMまたはNTM遺伝子またはcDNAから

50

DNAの合成を引き起こすプライマーである場合、それが特に好ましい。OBCAM遺伝子のイントロン-エクソン境界は、図16A～Dに示す。

【0095】

ポリメラーゼ連鎖反応において使用するのに適したプライマー(PCR;Saiki et al(1988)Science 239, 487-491)が好ましい。適切なPCRプライマーは、以下の諸性質を有している:

【0096】

オリゴヌクレオチドの5'端の配列は、増幅させる標的配列と一致している必要はないことはよく知られている。

【0097】

PCRプライマーは、特にその3'端には、2塩基より長い任意の互いに相補的な構造を含まないことが普通である。なぜならこの特徴は、「プライマー二量体」と呼ばれる人工的産物の形成を促進する可能性があるからである。2つのプライマーの3'端がハイブリダイズすると、これらは「プライマー化された鑄型」複合体を形成し、プライマーの伸張によって、「プライマー二量体」と呼ばれる短い重複産物がもたらされる。

【0098】

プライマー中の内部二次構造は、回避すべきである。対称性PCRに関しては、いずれの塩基も長い伸張部を有していない両方のプライマーについて、40～60%のG+C含有率がしばしば勧められる。DNAプローブのハイブリダイゼーションの研究に関して使用される、古典的な融解温度の計算によって、所与のプライマーは特定の温度でアニールするはずであり、あるいは72 という伸張温度によってプライマー/鑄型ハイブリッドが時期尚早に解離するであろうことがしばしば予測される。実際ハイブリッドは、単純な T_m 計算によって一般的に予測するよりも、PCR法において効果的である。

【0099】

最適なアニリング温度は経験的に決定することができ、予測した温度よりも高くてもよい。Taq DNAポリメラーゼは37～55 の領域で活性があり、したがってプライマーの伸張がアニリングステップ中に起こり、ハイブリッドが安定化するであろう。プライマーの濃度は、従来の(対称性)PCRでは等しく、典型的には0.1～1 μ Mの範囲である。

【0100】

ポリメラーゼ連鎖反応、QBレプリカーゼおよびリガーゼ連鎖反応を含めた、任意の核酸増幅プロトコルを、本発明の方法において使用することができる。さらに、3SRとも呼ばれるNASBA(増幅に基づく核酸配列)をCompton(1991)Nature 350, 91-92およびAIDS(1993)、Vol 7(Suppl,2)に記載されたように使用することができ、S108またはSDA(鎖置換増幅)をWalker et al(1992)Nucl.Acids Res.20, 1691-1696に記載されたように使用することができる。その簡潔性のために、ポリメラーゼ連鎖反応が特に好ましい。

【0101】

本発明の1対の適切な核酸をPCRにおいて使用するとき、ゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって、その産物を検出することが好都合である。DNAのアガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色を使用し、DNA増幅の産物を検出するための代替方法として、増幅させたDNAにプローブとしてハイブリダイズすることができる、標識したオリゴヌクレオチド使用することが好都合である。増幅がPCRによるものであるとき、オリゴヌクレオチドプローブは、2つのプライマーによって定義される内部プライマー配列にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドプローブは、10個と50個の間のヌクレオチド長、より好ましくは15個と30個の間のヌクレオチド長である。プローブは、標準的な技法を使用して、 32 P、 33 Pおよび 35 Sなどの放射性核種で標識することができ、あるいは蛍光染料で標識することができる。オリゴヌクレオチドプローブを蛍光的に標識するとき、増幅させたDNA産物は溶液中で検出することができる(たとえば、Balaguer et al(1991)「Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent」Anal.Biochem.195, 105-110およびDilesare et al(1993)「A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product

10

20

30

40

50

quantitation」BioTechniques15、152-157を参照のこと)。

【0102】

PCR産物は、プローブを使用して検出することもでき、プローブは蛍光体と抑制物質の対を有してよく、または固形担体に結合してよく、またはピオチンタグを有してよく、あるいは捕獲プローブと検出プローブの組み合わせを使用して、PCR産物を検出することができる。

【0103】

蛍光体と抑制物質の対は、PCR反応(たとえばRT-PCR)の定量測定に特に適している。適切なプローブを使用する蛍光性の分極化を使用して、PCR産物を検出することもできる。

【0104】

オリゴヌクレオチドプライマーは、たとえば固相ホスホルアミダイトの化学的性質を使用する、当分野でよく知られている方法を使用して合成することができる。

【0105】

本発明は、癌を診断するかあるいは癌を予知する、あるいは癌に対する罹患性を判定する方法における、あるいはこれらの方法を行うための試薬の製造における、OBCAMまたはNTM遺伝子、または(前に記載した)マイクロサテライトD11S4085を含むポリヌクレオチド、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、またはOBCAMまたはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸の使用を提供する。

【0106】

さらに本発明は、前記OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の有無、または変異を判定する方法を提供する。この方法は、患者からの適切なサンプルを使用することが好ましい。適切な変異の一例は、実施例5に記載し図18に示す、OBCAM中のヌクレオチド334におけるシトシンからグアニンへの変異を含む。

【0107】

本発明の方法は、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子中の、変異を検出することを含む。

【0108】

本発明の方法は、変異によって引き起こされる制限酵素切断部位の違いを利用することができる。非変性ゲルを使用して、適切な制限酵素を用いた消化によって生じる、異なる長さの断片を検出することができる。

【0109】

「適切な制限酵素」は、変異した配列ではなく野生型の配列を認識し切断する、あるいはその逆の酵素である。制限酵素によって認識され切断される(あるいはそうではない場合もある)配列は、変異の結果として存在することができるか、あるいは配列は、PCR反応において mismatchesしたオリゴヌクレオチドを使用して、正常あるいは変異対立遺伝子に導入することができる。酵素がDNAのみをまれに切断する場合、言い換えると、酵素がごくまれに存在する配列を認識する場合、このことは好都合である。

【0110】

他の方法では、野生型の遺伝子型または変異した遺伝子型のいずれかと一致する(すなわちハイブリダイズする)が、両方とは一致しない、PCRプライマーの対を使用する。したがって、増幅されたDNAが生じるかどうかは、野生型または変異した遺伝子型(したがって表現型)を示す。しかしながら、この方法は、技術的な失敗によるものであると思われる負の結果(すなわち、増幅されたDNAが存在しないこと)を利用するものである。したがってこの方法は、あまり信頼性がなく、かつ/あるいは追加の対照実験を必要とする可能性がある。好ましい実施形態では、プライマー対の1つは、図7で付番したヌクレオチド334を含むOBCAM遺伝子の一部分、またはOBCAMのcDNAの対応する部分と選択的にハイブリダイズする。

【0111】

好ましい方法は、同様のPCRプライマーであるが、野生型または変異した配列の1つとだけハイブリダイズするプライマーを使用し、通常ではそこに存在しない制限部位を、野生型

10

20

30

40

50

または変異した配列中に導入する。

【0112】

前記選択的にハイブリダイズする核酸は、OBCAMおよびNTM遺伝子の両方と選択的にハイブリダイズすることができることは理解されるであろう。なぜなら、これら2つの遺伝子は、染色体11上で互いに比較的近位に位置するからである。図1に示すように、これら2つの遺伝子は、おそらく互いに隣接して位置している。

【0113】

OBCAMおよび/またはNTM遺伝子、またはOBCAMまたはNTMのcDNAと選択的にハイブリダイズする核酸は、いくつかの目的に有用である。

【0114】

ゲノムDNAとのサザンハイブリダイゼーションにおいて、前ですでに論じた点変異を検出するためのRNase保護法において、核酸を使用することができる。プローブを使用して、PCR増幅産物を検出することができる。プローブを使用して、他の技法を使用するサンプル中のOBCAMまたはNTM遺伝子またはmRNAとのミスマッチを検出することもできる。ミスマッチは、酵素(たとえば、S1ヌクレアーゼまたはリソルバーゼ)、化学物質(たとえば、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびピペリジン)、または完全に一致したハイブリッドと比較したミスマッチしたハイブリッドの電気泳動による移動の変化のいずれかを使用して、検出することができる。これらの技法は、当分野ではよく知られている。一般にプローブは、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子をコードする配列と相補的であるが、いくつかのイントロンのためのプローブも企図される。一式の核酸プローブを使用して、野生型OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の変異の消失を検出するための、キットを構成することができる。このキットにより、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子全体とのハイブリダイゼーションが可能である。プローブは互いに重複しているか、あるいは隣接してよい。好ましい実施形態では、プローブは、図7で付番したヌクレオチド334、またはOBCAMのcDNAの対応するヌクレオチドを含む、(たとえば、前に記載したように増幅させた後の)OBCAM遺伝子の一部分を検出する。

10

20

20

【0115】

リボプローブを使用してmRNAとのミスマッチを検出する場合、それはヒトOBCAMまたはNTM遺伝子のmRNAと相補的である。したがってリボプローブは、それがOBCAMまたはNTM遺伝子によってコードされているタンパク質をコードしていない点において、アンチセンスプローブである。なぜならそれは、センス鎖と正反対の極性であるからである。一般にリボプローブは標識、たとえば放射活性標識されており、標識は当分野で知られている任意の手段によって行うことができる。リボプローブを使用してDNAとのミスマッチを検出する場合、それはいずれかの極性、センスまたはアンチセンスであってよい。同様に、DNAプローブを使用してミスマッチを検出することもできる。

30

【0116】

核酸プローブは、OBCAMまたはNTM遺伝子の変異対立遺伝子とも相補的であってよい。ミスマッチではなくハイブリダイゼーションに基づいて、他の患者中の類似の変異を検出するために、これらの核酸プローブは有用である。前述のように、OBCAMおよびNTM遺伝子プローブを、ゲノムDNAとのサザンハイブリダイゼーションで使用して、欠失および挿入など全体的な染色体の変化を検出することもできる。

40

【0117】

本発明の診断および予後法に従って、野生型遺伝子の機能の消失、または変化を検出することができる。その消失は、挿入、欠失、または点変異事象のいずれかによるものである可能性がある。ただ1つの対立遺伝子の変異する場合、初期の新生物状態が示される可能性がある。しかしながら、両方の対立遺伝子の変異する場合は、したがって悪性状態が示される、すなわち悪性の確率が高まることが示される。したがって、このような変異を発見することによって、診断および予後の情報が与えられる。検出されていないOBCAMまたはNTM遺伝子の対立遺伝子(たとえば、姉妹染色体~遺伝子が欠失している染色体上のもの)を、挿入、わずかな欠失、および点変異などの他の変異に関して、スクリーニングする

50

ことができる。遺伝子の1つのコピー(対立遺伝子)の変異を検出することが有用であると我々は考えている。たとえば、GenBank受託番号NM_002545で付番したシトシン334における、OBCAM遺伝子の変異は、卵巣癌の発達の初期事象として観察される。第2の対立遺伝子の消失が、発癌のために必要である可能性がある。第2のコピーが全体的な機構によって常に失われる場合、これは検出するための有用な事象であると思われる。遺伝子のいくつかの変異は、残りの対立遺伝子に対して優性ネガティブ効果がある可能性がある。非機能遺伝子の産物をもたらす変異は、悪性状態すなわち悪性の確率の増大をもたらす可能性もある。変異事象(点変異、欠失、挿入など)は、遺伝子のプロモーター中などの調節領域で起こり、これによってmRNAの発現の消失または低下をもたらされる可能性がある。点変異も、正確なRNAのプロセッシングを無効にし、OBCAMまたはNTM遺伝子産物の発現の消失または変化、または非機能的であるかあるいは発現が変化したOBCAMまたはNTMポリペプチドをもたらす可能性がある。試験サンプル中のOBCAMまたはNTMのmRNAの量を定量化し、対照サンプル中に存在する量と比較する場合、それが好ましい。試験サンプル中のOBCAMまたはNTMのmRNAの接合型または構造を決定し、対照サンプル中に存在するものと比較する場合も、それが好ましい。しかしながら、OBCAMまたはNTMの発現を検出することは、あまり好ましくない。

10

【0118】

サンプル組織の単位質量当たりあるいはサンプル細胞の単位数当たりの、OBCAMまたはNTMのmRNAの量を決定し、これを知られている正常な組織の単位質量または正常な細胞の単位数当たりと比較することが適切である。たとえばノーザンブロットまたは定量RT-PCRを使用して、RNAを定量化することができる。

20

【0119】

遺伝子はそれぞれ2つの対立遺伝子を有しており、両方の対立遺伝子を改変することは、1つの対立遺伝子を改変するよりも、細胞の挙動に対して大きな影響がある可能性があることは理解されるであろう。少なくとも、1つの変異対立遺伝子が、改変されたコード配列をもたらす変異体を有することは予想される。コード配列以外の第2の対立遺伝子の改変は、調節領域の完全または部分的な遺伝子の欠失、および消失または変異を含んでよい。

【0120】

前述のように、OBCAMおよびNTMの対立遺伝子の消失または不活性化を判定することが、有用である可能性がある。なぜなら、OBCAMの消失または不活性化は、NTMの消失または不活性化より初期の事象である可能性があり、2つのうちのいずれかの消失または不活性化の有無を判定することによって、癌の進行の段階に関する情報を与えることができるからである。たとえば、NTM中ではなくOBCAM中で欠失(または他の消失または不活性化)が認められる患者は、OBCAMとNTMの両方で消失または不活性化が認められる患者よりも、初期の段階の癌を有する可能性がある。たとえば、後のNTMのLOHはOBCAMのLOHの場合ほぼ独占的に起こり、NTMのLOHのみが起こることはほとんどないと考えられる。高段階、または等級、または逆生存率と、相関関係がある可能性がある。結腸直腸癌に関しては、OBCAMとニューロトリミンLOHの比は、それぞれ約32%と50%であると考えられる。

30

【0121】

癌または前癌疾患の状態の進行は、NTMの消失または不活性化、さらにOBCAMの消失または不活性化を検出することによって示すことができるので、したがって、本発明の第1または第2の態様の方法を、同じ患者に2回以上行うことが有用である可能性がある。

40

【0122】

したがって、本発明は、患者の癌疾患の進行、たとえば腫瘍の進行を判定する方法であって、

(i)患者のOBCAM遺伝子が失われているかあるいは不活性化している患者から、サンプルの核酸を得るステップ、

(ii)前記核酸を、NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、あるいはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子、またはその相補体と選択的にハイブリダイズする核酸と接触させるステップを含む方法も提供する。

50

【0123】

サンプルは、癌が発見されているか疑われる組織からのサンプルであることが好ましく、サンプルは卵巣または直腸からのものであることがより好ましい。

【0124】

任意の癌または前癌疾患の状態の進行、または変化に関するこのような情報は、治療の有効性を監視する際に、正確な状態を診断する際に、あるいは患者の特定の結末の相対的な見通しを予後または予測する際に、内科医にとって有用である可能性がある。

【0125】

本発明は以下の方法も含む:切断型遺伝子産物、または基質の結合などの変化した性質を同定するために、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の *in vitro*での転写および翻訳;タンパク質の発現が低下/消失している、あるいはタンパク質の分布が細胞内または細胞表面で変化している、細胞を同定するために、組織切片の免疫組織化学法;および前に記載した領域の変異を検出する前の、ランダムなプライマーを使用するRT-PCRの使用。OBCAMまたはNTMポリペプチドの変化した分布をスクリーニングする場合、それが好ましい。

【0126】

検出することが有用である可能性がある変異の一例は、実施例5に記載するOBCAMポリペプチド中のプロリンからアルギニンへの変異である。変異する残基は第1の免疫グロブリンドメイン中に位置し、OBCAMポリペプチドの立体配座の変化をもたらす可能性がある。この変異は癌の指標、特に卵巣癌の初期の指標であると考えられる。OBCAMポリペプチドのこのような変異は、野生型(すなわち、プロリンからアルギニンへの変異がない)と変異体を区別することができる、抗体を使用して検出することができる。このような抗体は、以下でさらに詳細に記載する。

【0127】

本発明の方法は、OBCAMまたはNTM遺伝子の不活性化を、そのDNAのメチル化状態を調べることによって検出することも含む。OBCAMまたはNTM遺伝子のDNAのメチル化は、Herman et al(1996)Proc.Nad.Acad.Sci.USA 93、9821-9826中に記載された技法などの、標準的な技法を使用して評価することができる。OBCAMまたはNTM遺伝子のDNAの異常なメチル化は、それらの不活性化と関連している可能性がある。

【0128】

当業者には知られているように、CpGアイランドと呼ばれる、5'-グアニンに位置するシトシンの領域が、多くの遺伝子の調節領域中に存在する。これらのシトシンは、正常な条件下では一般に非メチル化状態である。しかしながらこれらのシトシンは、癌と関連があるいくつかの遺伝子中においてメチル化状態になる可能性がある。これらのメチル化遺伝子は、二対立遺伝子のメチル化によるこの両方の結果として、あるいは第2の不活性化機構(たとえばLOHまたは変異)と組み合わせさせて、抑制される可能性がある。メチル化特異的PCR(MS-PCR)は、重硫酸ナトリウムを使用する改変によって、ゲノムDNA中の非メチル化シトシンのウラシルへの脱アミノ化を含む。メチル化シトシンが、重硫酸ナトリウムによって脱アミノ化することはない。調査中のゲノムDNAのメチル化状態に応じて、ミスマッチが生じるようにプライマーを設計する。典型的な実験は、同じ鋳型を使用する2つのPCR反応を含む。1つの実験は、改変型メチル化DNAにアニーリングさせるプライマーを使用し、もう一方の実験は、改変型非メチル化DNAにアニーリングさせ、MS-PCRによりそれぞれメチル化および非メチル化DNAに関する、特異的な結合を生み出すように設計したプライマーを使用する。MS-PCR産物の塩基配列決定によって、試験中の遺伝子のCpGアイランドのメチル化度がさらに確認される。適切なプライマーの例を、実施例12に示す。

【0129】

以下の参照文献は、MS-PCRに関するものである: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。

【0130】

実施例は、OBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化状態とその発現レベルの間に相関関係があり、OBCAMまたはNTM発現の下方制御は、OBCAMまたはNTMのメチル化と相関関係があることを

示す。したがって本発明は、OBCAMまたはNTM遺伝子のメチル化度または程度を評価することによって、OBCAMまたはNTMの発現レベルを判定する方法、および患者の癌の特定の結末の相対的な見通しを診断または予測する際に、この情報を使用する方法を含む。

【0131】

本発明の他の態様は、患者の癌を診断する方法であって、

- (i)患者からのOBCAMおよび/またはNTM遺伝子を含むサンプルを得るステップ、
- (ii)OBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、
- (iii)患者のサンプルからのOBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、および
- (iv)対照サンプルと比較して、患者のサンプルがより高いメチル化度のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子を有する場合、これが癌を示すステップを含む方法を提供する。

【0132】

メチル化度を判定することによって、メチル化の有無、たとえば個々の残基または領域上のメチル化の有無を判定することが含まれる。したがって、たとえば、プライマー領域のメチル化は、前に記載したMS-PCRを使用して生成物の有無によって検出することができ、一方、生成物の塩基配列決定によって、介在(増幅)領域中の潜在的なメチル化部位がメチル化されるかどうか、あるいはどのくらいの数メチル化されるか(さらにそれゆえ、脱アミノ剤、またはたとえば重亜硫酸塩処理などの処理の結果として変異する)を示すことができる。

【0133】

患者のサンプルがOBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化を示すが、一方で対照サンプルは、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化を全く示さないかわずかに示す場合、これは癌を示す。メチル化は、本質的に「全か無か」方式で起こる可能性があると考えられる。

【0134】

本発明の他の態様は、癌患者の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

- (i)患者からのOBCAMおよび/またはNTM遺伝子を含むサンプルを得るステップ、
- (ii)OBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、
- (iii)患者のサンプルからのOBCAMおよび/またはNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、および
- (iv)対照サンプルと比較して、患者のサンプルがより高いメチル化度のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子を有する場合、これが首尾の良い結果の可能性が低いことを示すステップを含む方法を提供する。

【0135】

「対照サンプル」によって我々は、非腫瘍サンプル、または腫瘍性である可能性があるが、患者のサンプル中で疑われるものよりも発達の初期の段階にあるサンプルの意味を含ませることにする。

【0136】

対照サンプルは、非腫瘍サンプルであることが好ましい。腫瘍の進行を測定する場合、対照サンプルが発達の初期の段階からの、典型的には同じ患者からの腫瘍サンプルである場合、それが好ましい可能性がある。

【0137】

疾患または腫瘍の進行は、NTMのみのメチル化度を判定することによって確認することができ、あるいはNTMとOBCAMの両方のメチル化度を判定することによって確認することができる。メチル化度は、NTMとOBCAMの両方において判定することが好ましい。「進行」によって我々は、腫瘍が悪性になる可能性の増大を含ませることにする。

【0138】

明らかな進行経路を有する結腸直腸癌と異なり、卵巣癌には、検出可能な前悪性/悪性の変化がない。したがって、卵巣疾患の進行は、たとえば予後を悪化させ局所への広がりが増す一層攻撃的な腫瘍を指す。

【0139】

LOHは、NTMのLOHより前のOBCAMのLOHとは一時的に別のものであるようである。OBCAMおよびNTMに関してメチル化を一時的に定義することもできるが、実施例1で論じるように、メチル化が起こる場合は、それは両方の遺伝子中で同時に起こることがより一般的である。

【0140】

NTMにおける任意のメチル化、または事前にOBCAMのみがメチル化した、NTMにおける他のメチル化を確認することによって、NTMにおけるメチル化が確認されなかった段階からの、疾患または腫瘍の進行を示すことができる。

【0141】

したがって、本発明の他の態様は、患者の癌疾患の進行、たとえば腫瘍の進行を判定する方法であって、

(i)NTM遺伝子を含む患者からサンプルを得るステップであって、患者のOBCAM遺伝子がメチル化しているステップ、

(ii)NTM遺伝子のメチル化度を判定するステップ、

(iii)患者のサンプルからのNTM遺伝子のメチル化度を、対照サンプルのメチル化度と比較するステップ、

および、対照サンプルと比較して、患者のサンプルからのNTMのメチル化度が高い場合、これが疾患または腫瘍の進行を示すステップを含む方法を提供する。

【0142】

腫瘍は良性または悪性であってよい。前に記載したように、本発明の第1および第2の態様に関しては、腫瘍が卵巣または結腸直腸腫瘍である場合、それが好ましく、サンプルが、癌が疑われるか腫瘍は発見されている組織のサンプルである場合も、それが好ましい。

【0143】

核酸間のメチル化の違いを判定するための方法は当分野でよく知られており、(a)メチル化感受性である1つのヌクレオチドプライマー伸長剤(Ms-SNuPE)を使用すること;(b)ザンプロット分析による、メチル化感受性制限酵素を用いたゲノムDNAの消化、および(c)PCR増幅の前に、メチル化感受性制限酵素を用いたゲノムDNAの消化を利用する、PCR系メチル化アッセイを含む。前述の方法を行い、その後DNAを消化または重亜硫酸塩により転換することができる。重亜硫酸塩処理によって、核酸サンプル中において非メチル化シトシンのウラシルへの転換が引き起こされるが、メチル化シトシンの(チミンへの)脱アミノ化は引き起こされない。

【0144】

本発明の他の態様は、ヒトDNAの関連領域の有無、または変異を検出するためのシステム(あるいは、パーツのキットと名付けることも可能であると思われる)を提供し、このシステムはヒトDNAの関連領域、およびヌクレオシド三リン酸またはデオキシヌクレオシド三リン酸、またはこれらの誘導体と選択的にハイブリダイズすることができる核酸を含む。ヒトDNAの関連領域と選択的にハイブリダイズすることができる好ましい核酸は、前述の好ましい核酸と同じである。「ヒトDNAの関連領域」は、OBCAMまたはNTM遺伝子、またはOBCAMまたはNTMのcDNAを含む。ヒトDNAの関連領域は、本明細書で定義するOBCAMまたはNTM遺伝子であることが好ましい。

【0145】

したがって本発明は、OBCAMまたはNTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、およびOBCAMまたはNTM遺伝子中の変異体を検出するための手段であって、前記変異体が、癌細胞中で見られるOBCAMまたはNTMの変異体である手段を含むパーツのキットを提供する。

【0146】

「変異」によって、挿入、置換および欠失が含まれる。核酸が選択的にハイブリダイズすることができる変異の一例は、図7で付番したヌクレオチド334における、OBCAMのシトシンのグアニンへの変異である。

【0147】

10

20

30

40

50

「ヌクレオシド三リン酸またはデオキシヌクレオシド三リン酸、またはそれらの誘導体」によって、任意の天然に存在するヌクレオシド三リン酸またはデオキシヌクレオシド三リン酸、ATP、GTP、CTP、およびUTP、dATPdGTP、dCTP、TTPなど、および非天然誘導体、チオリン酸結合を含む誘導体(たとえば S誘導体)などが含まれる。

【0148】

ヌクレオシド三リン酸またはデオキシヌクレオシド三リン酸、またはそれらの誘導体は、たとえば³²P、³³Pまたは³⁵Sで放射標識されているか、あるいはで化学蛍光性化合物またはジゴキシゲニン標識されていることが、好都合である。

【0149】

デオキシヌクレオチドは、PCRで使用するための、希釈するのに適した濃度であることが好都合である。

【0150】

したがって本発明は、前記ヒトDNAの関連領域と選択的にハイブリダイズすることができる核酸、および前記領域の有無、または変異を検出するための手段を含むパーツのキットを含む。前記領域の有無、または変異を検出するための手段には、たとえば診断用制限酵素、または変異特異的核酸プローブなどがある。

【0151】

本発明の他の態様は、

(a)OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、またはOBCAMのcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(b)重亜硫酸塩処理したメチル化OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(c)重亜硫酸塩処理した非メチル化OBCAM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(d)(a)および(b)、または(a)および(c)、または(b)および(c)、または(a)、(b)および(c)および重亜硫酸塩の源を含むパーツのキットを提供する。

【0152】

本発明は、

(a)NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、またはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(b)重亜硫酸塩処理したメチル化NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(c)重亜硫酸塩処理した非メチル化NTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする少なくとも2つの核酸、または

(d)(a)および(b)(a)および(b)、または(a)および(c)、または(b)および(c)、または(a)、(b)および(c)

および重亜硫酸塩の源を含むパーツのキットをさらに提供する。

【0153】

本発明のキットは、以下でさらに論じるように、増幅反応(たとえばPCR反応)を行うための手段、および/または増幅産物の塩基配列を決定するための手段をさらに含むことができ、これらの手段によって増幅体、たとえばPCR産物中のメチル化CpGの有無を示すことができる。

【0154】

重亜硫酸塩の源を含むこれらのキットは、対照のメチル化DNAをさらに含むことが好都合である。このような対照のDNAは、少なくとも1つのシトシンにおいてメチル化することが知られており、試験DNAと陽性比較することができる。任意のメチル化させたヒトDNA、たとえば酵素による方法を使用して人工的にメチル化させたDNAを使用することができる。血液に由来するDNAは、有用である可能性がある。なぜならこれは、再生可能な源である

10

20

30

40

50

からである。メチル化させたヒトDNAは、Intergen(Purchase、New York、USA/Oxford、UK):CpGenome Universal Methylated DNA Cat.No.S7821から市販されている。

【0155】

これらのキットはDNAポリメラーゼも含むことも好都合である。DNAポリメラーゼは、配列分析の前に、重亜硫酸塩で改変させたDNAを増幅させるのに有用である。DNAの改変における重亜硫酸塩の使用、およびDNAのメチル化状態を調べる際の後のDNA増幅は、前および実施例中に記載する。

【0156】

本発明の他の態様は、DNAの関連領域の有無、または変異を検出するためのシステムを提供し、このシステムは、ヒトDNAの関連領域と選択的にハイブリダイズすることができる核酸、および核酸を改変する酵素を含む。ヒトDNAの関連領域と選択的にハイブリダイズすることができる好ましい核酸は、前述の好ましい核酸と同じである。

10

【0157】

「変異」によって、挿入、置換(塩基転換含む)および欠失が含まれる。

【0158】

「核酸を改変する酵素」によって、RNAまたはDNA分子を改変することができる任意の酵素が含まれる。

【0159】

好ましい酵素は、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼまたは制限エンドヌクレアーゼからなる群から選択される。特に好ましい酵素は、TaqDNAポリメラーゼなどの、熱安定性のDNAポリメラーゼである。二次構造、たとえばミスマッチを認識する、Cleavase Iなどのヌクレアーゼも、有用である可能性がある。

20

【0160】

遺伝子の変異を検出することは、患者のための適切な治療、たとえばOBCAMおよび/またはNTM遺伝子療法を決定するために有用であろう(以下参照)。遺伝子の変異を検出することは、腫瘍がこの共通の特性を有しており、さまざまな治療に対する予後または応答に関する群として分析することができる、患者の亜群を識別するために、有用である可能性がある。OBCAMの変異の一例を、実施例5に記載し図18に示す。

【0161】

遺伝子の変異は、いくつかの治療に対する応答または耐性と関連がある可能性があり、さまざまな療法に対する感度が知られている細胞株を使用して、あるいは臨床的な相関関係の研究によって、これを調べることができる。

30

【0162】

一群のマーカーおよび試験体の一部として、遺伝子を使用することが考えられ、その併せた結果が療法に向けられると思われる。片方または両方の遺伝子の変異を検出することは、疾患の広がりおよび重度を調べるために、有用である可能性がある。

【0163】

遺伝子の変異が1つの腫瘍では共通であるが、他の腫瘍ではそうではない場合、遺伝子の分析は、鑑別診断するために有用である可能性がある。たとえば、胃腸起源の二次的な腫瘍は卵巣中に頻繁に見られ、真の卵巣起源の腫瘍と区別することが困難である。

40

【0164】

本発明の他の態様は、

患者の癌を診断する方法であって、

(i)患者に由来するタンパク質を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)(a)OBCAMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀、あるいはOBCAMポリペプチドの相対活性、または活性の変化、または変化した活性、または

(b)NTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀、あるいはNTMポリペプチドの相対活性、または活性の変化、または変化した活性、または

(c)(a)と(b)両方を判定するステップを含む方法を提供する。

【0165】

50

本発明の他の態様は、

患者の癌の特定の結末の相対的な見通しを予測する方法であって、

(i)患者に由来するタンパク質を含むサンプルを得るステップ、および

(ii)(a)OBCAMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀、あるいはOB
CAMポリペプチドの相対活性、または活性の変化、または変化した活性、または

(b)NTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀、あるいはNTMポリ
ペプチドの相対活性、または活性の変化、または変化した活性、または

(c)(a)と(b)両方を判定するステップを含む方法を提供する。

【0166】

本発明の方法は、試験サンプル中のOBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはその変異体 10
の測定および検出、およびそれらを対照サンプルと比較することも含む。ポリペプチド
の変化した活性を検出することも、有用である可能性がある。試験サンプル中のOBCAM
および/またはNTMポリペプチド(またはその変異体)に関して得られる測定値と、知られて
いる非癌性(正常)細胞に由来するか、あるいは知られている癌性細胞に由来する可能性が
ある、対照サンプルの均等な測定値を比較することができることは理解されるであろう。

【0167】

患者に由来するタンパク質を含むサンプルは、癌が疑われるか、または癌が発見される可
能性があるかあるいは発見されている組織のサンプルであることが好都合である。これら 20
の方法は任意の癌に使用することができるが、卵巣の癌、結腸直腸癌、および他の一般的
な腺癌、乳、肺または上部胃腸管の癌などに関して特に適しており、これらの方法は卵巣
の癌または結腸直腸癌に関して特に適している。適切なサンプルを得る方法は、初期の方
法に関して記載されている。

【0168】

OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドを検出することを含む本発明の方法は、腫瘍サンプ
ルのパラフィン包埋切片を含むサンプルなどの、組織サンプルに関して特に有用である。

【0169】

OBCAMまたはNTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀は、任意の
適切な方法で決定することができる。

【0170】

OBCAMのポリペプチド配列は、受託番号NM_002545で、GenBankのデータライブラリー中に 30
与えられる(図7参照)。NTMのポリペプチド配列は、受託番号NM_016522で、GenBankのデー
タライブラリー中に与えられる(図8および9参照)。NTMのポリペプチド配列は、W000/6175
4のクローン11753149.0.6および11753149.0.37、およびW099/46281のPR0337によってコー
ドされている、配列も含むことができる。

【0171】

「物理的形狀」の決定により我々は、ポリペプチドの配列の決定、たとえば図7に示す野
生型配列と患者からのサンプル中に存在するポリペプチドの配列の間の、挿入、欠失、置
換などの違いの存在を決定することを含ませることにする。OBCAMの場合、ポリペプチド
が変異体、実施例5に記載する変異体などであるかどうかを決定することは、有用である
可能性がある。なぜなら、このような変異体は、情報を与えることができるからである。 40
たとえば、患者からのサンプルが、残基95(図7に示す未熟ポリペプチドにおいて、および
GenBankの受託番号NP_002536の対応するタンパク質の参照配列において付番したもの)が
プロリンではなくアルギニンである、変異体OBCAMを含むことを判定することによって、
卵巣癌を示すことができる。この変異体は、卵巣癌の初期段階から検出可能であると考え
られるので、それを検出することによって、その患者の特定の結末の相対的な見通しの、
迅速な診断、予後および決定が可能であり、これらすべてによって、より適切な治療を選
択することができる、その患者の好ましい結末の確率が高まる。

【0172】

OBCAMまたはNTMポリペプチドの相対量、または細胞内位置、または物理的形狀を、OBCAM
またはNTMポリペプチドに選択的に結合するか、あるいはOBCAMまたはNTMポリペプチドの 50

変異形に選択的に結合する、分子を使用して決定する場合、それが好ましい。当業者に知られているように、OBCAMおよびNTMは両方ともに細胞外のものであり、分泌型細胞接着分子であり、したがって成熟した野生型分子は一般には細胞内に存在しない。OBCAMまたはNTMに選択的に結合するか、あるいはOBCAMまたはNTMの変異体に選択的に結合する分子は、抗体であることが適切である。抗体は、OBCAMまたはNTMポリペプチドの天然変異体または断片に結合することもできる。

【0173】

OBCAMまたはNTMに対する抗体は、当分野でよく知られている方法によって作製することができる。

【0174】

使用する抗体がOBCAMまたはNTMに選択的である場合、それが好ましい。「OBCAMまたはNTMに選択的である」によって我々は、それらはOBCAMまたはNTMには結合するが、他のポリペプチドには実質的に結合しないことを意味することにする。抗体はOBCAMまたはNTMポリペプチドのみに選択的に結合することが好ましく、抗体はOBCAMとNTMの片方にのみ結合し、両方には結合しないことがより好ましい。

【0175】

OBCAMまたはNTMの変異形に選択的に結合することができる抗体は、たとえばOBCAMまたはNTMの変化したアミノ酸あるいはそれ以外の場合は改変領域を含むペプチドを使用することによって、あるいはOBCAMまたはNTMポリペプチドの一部を発現し、変化したアミノ酸あるいはそれ以外の場合は改変領域を含む融合タンパク質を使用することによって、作製することができる。

【0176】

それに対する抗体を作製することが有用である可能性があり、選択的に結合することができる、変異OBCAM(すなわち、変異OBCAM)ポリペプチド配列の一例を実施例5に記載し、変異した残基のすぐ周辺のアミノ酸配列を、図18に示す。この変異したアミノ酸配列は、図7で付番した、未熟(すなわち、まだシグナルペプチドが結合している)ポリペプチドの残基95に対応する。残基95は、OBCAMの第1の免疫グロブリンドメイン中に位置すると考えられる。

【0177】

いずれの場合も、遺伝コードに基づいて、アミノ酸配列の変化を容易に推測することができる。本明細書で開示する、変異OBCAMまたはNTMポリペプチドに選択的である抗体は、本発明の他の態様を形成する。

【0178】

抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであってよい。適切なモノクローナル抗体は、知られている技法、たとえばMonoclonal Antibodies:A manual of techniques、H Zola (CRC Press、1988)中、およびMonoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and applications、J G R Hurrell(CRC Press、1982)中に開示された技法によって作製することができ、この両方は参照によって本明細書に組み込んである。

【0179】

「OBCAMポリペプチドの相対量」によって、知られている正常な組織の単位質量当たりあるいは正常な細胞の単位数当たりの、OBCAMポリペプチドの量と比較した、サンプル組織の単位質量当たりあるいはサンプル細胞の単位数当たりの、OBCAMポリペプチドの量が意味される。任意の適切なタンパク質定量法を使用して、相対量を決定することができる。特に、抗体を使用する場合、OBCAMの量は、定量ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着定量アッセイ(ELISA)、または定量免疫組織化学法を含めた方法を使用して決定することが好ましい。同様に、「NTMポリペプチドの相対量」によって、OBCAMに関して前に記載したように、サンプルなどの単位質量当たりのNTMポリペプチドの量が意味される。

【0180】

腫瘍状態の病巣を、野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの変化に基づいて、検出することもできる。このような変化は、従来技法に従って、配列分析により決定することができ

10

20

30

40

50

る。より好ましくは、抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)を使用して、OBCAMまたはNTMポリペプチド、またはそれに由来するペプチドの違い、または不在を検出する。抗体は、本明細書で論じるように作製することができる。

【0181】

抗体を産生または精製するための他の技法は、当分野ではよく知られており、任意のこのような技法を選択して、本発明で特許請求する調製物を得ることができる。本発明の好ましい実施形態では、抗体によって、OBCAMまたはNTMタンパク質を溶液から免疫沈降させ、かつポリアクリルアミドゲルのウエスタンまたは免疫プロットで、OBCAMまたはNTMタンパク質と反応させる。他の好ましい実施形態では、免疫細胞化学技法を使用して、抗体によって、パラフィンまたは凍結組織切片中のOBCAMまたはNTMタンパク質を検出する。

10

【0182】

OBCAMまたはNTMまたはその変異体を検出するための方法に関する、好ましい実施形態には、モノクローナルおよび/またはポリクローナルを使用するサンドウィッチアッセイを含めて、酵素結合免疫吸着定量アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、イムノラジオメトリックアッセイ(IRMA)、および免疫酵素アッセイ(IEMA)がある。代表的なサンドウィッチアッセイは、参照によってここに組み込んである、David他の米国特許第4,376,110号および第4,486,530号によって記載されている。

【0183】

OBCAMまたはNTMの細胞内位置は、免疫細胞化学などの分野で知られている方法を使用して、容易に決定することができる。これらの方法では、標識した抗体(たとえば、放射活性または蛍光標識した抗体)を使用して、OBCAMまたはNTMと結合させ、細胞内でのその位置を顕微鏡によって決定する。たとえば、この方法を使用して、OBCAMまたはNTMが細胞質または原形質膜中に位置するかどうか、あるいは両方の区分に位置する場合は、それぞれの区分に位置するOBCAMまたはNTMの比率を決定することができる。非癌性の、正常な対照サンプルと比較した、試験サンプル中のOBCAMまたはNTMの位置の変化は、癌状態を示す可能性がある。

20

【0184】

変化した細胞内の分布を検出するための方法には、免疫組織化学法(IHC;たとえば、一次抗体を認識する抗体、すなわち二次抗体を酵素、蛍光タグ、放射性同位体で標識する場合)、およびIHC染色した切片のコンピュータ支援の画像分析がある。

30

【0185】

OBCAMまたはNTMの相対活性は、サンプル組織の単位質量当たりあるいはサンプル細胞の単位数当たりの、OBCAMまたはNTMポリペプチドの活性を測定し、この活性を、知られている正常な組織の単位質量当たりあるいは正常な細胞の単位数当たりの、OBCAMまたはNTMポリペプチドの活性と比較することによって、決定することができる。相対量は、OBCAMまたはNTMの活性の任意の適切なアッセイを使用して、決定することができる。アッセイは、OBCAMまたはNTMポリペプチドの活性に選択的であることが好ましい。

【0186】

NTMおよびOBCAM遺伝子の活性には、腫瘍抑制活性、神経軸策の支持、細胞凝集の促進、およびまだ明確には定義されていない細胞シグナル機能がある。

40

【0187】

本発明は、変異OBCAMまたはNTMポリペプチド、またはその断片と反応する抗体であって、前記変異OBCAMまたはNTMポリペプチドが、癌細胞中で見られる変異体である抗体も提供する。抗体は、野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドとは反応しないことが好ましい。このような抗体は、診断アッセイおよび本発明の方法において有用であり、たとえばその配列が変異OBCAMまたはNTMポリペプチドに由来するペプチドを、免疫原として使用して、作製することができる。OBCAM変異体の一例は、実施例5に記載し図18に示す。

【0188】

本発明は、変異OBCAMまたはNTMポリペプチドをコードする核酸と選択的にハイブリダイズする核酸であって、その変異体が、癌細胞中で見られる変異体である核酸も提供する。こ

50

のような核酸は、診断アッセイおよび本発明の方法において有用である。

【0189】

罹患者の診断、決定、および結末の相対的な見通しの予想の、いくつかの核酸系の方法に関しては、これらの方法は、同等な組織、または正常すなわち疾患がないことが知られている他の源からのサンプルと比較して、試験するサンプル中で、OBCAMまたはNTM核酸の状態が(DNAであれmRNAであれ)、変わるかどうかを決定することを含むことは理解されるであろう。

【0190】

変異配列を基盤とするペプチドは、免疫応答を刺激する際に有用である可能性がある。

【0191】

本発明の他の態様は、患者の癌を治療する方法であって、OBCAMまたはNTM活性のアゴニストを患者に投与するステップを含む方法を提供する。アゴニストは、細胞膜の外側、たとえばGPIアンカーに結合すること、およびOBCAMまたはNTMの通常の標的と相互作用することによって機能することができる。アゴニストは、当業者知られているように、抗体または抗体断片であってよく、あるいはたとえば5000Da未満の小分子であってよい。

【0192】

OBCAMおよびNTMは細胞外分子であるので、細胞膜の細胞外部分で結合することによって、その機能が復元する擬似体によって、完全長のcDNAを形質導入する遺伝子治療と、同じ効果を得ることができると思われる。言い換えると、患者中での腫瘍抑制遺伝子の機能は、小分子治療剤を患者に投与することによって、復元させることができる。

【0193】

本発明の他の態様は、患者の癌を治療する方法であって、OBCAMまたはNTM遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸、またはOBCAMまたはNTMのcDNAと選択的にハイブリダイズする核酸を、患者に投与するステップを含む方法を提供する。

【0194】

本発明の他の態様は、患者の癌を治療する方法であって、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはその機能変異体、または一部分または融合体をコードする核酸を、患者に投与するステップを含む方法を提供する。

【0195】

本発明は、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子またはcDNAを、癌を有する患者に投与することも含む。治療される癌は、卵巣癌または結腸直腸癌であることが好ましい。

【0196】

患者に投与する核酸は、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはその機能変異体、または一部分をコードする核酸であることが適切である。OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドは、野生型ポリペプチド、または実質的に野生型である活性を有する変異ポリペプチドであることが好ましい。OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドが、卵巣癌細胞などの癌細胞中に見られる変異を有するポリペプチドである場合、それはあまり好ましくない。しかしながら、このようなポリペプチドは、抗癌細胞の免疫応答を誘発する際に有用である可能性がある。したがって、本発明によって、野生型OBCAMおよび/またはNTMの機能を、変異OBCAMおよび/またはNTM対立遺伝子を保有する細胞に与える方法も提供される。このような機能を与えることによって、レシピエント細胞の新生物の増殖が抑制されるはずである。野生型OBCAMおよび/またはNTM遺伝子、またはその遺伝子の一部分は、遺伝子が染色体外の状態であるように、細胞中、ベクター中に導入することができる。このような状況では、染色体外の位置から細胞によって遺伝子が発現されるであろう。遺伝子断片が導入され、それが変異OBCAMおよび/またはNTM対立遺伝子を保有する細胞中で発現される場合、その遺伝子断片は、細胞の非新生物の増殖に必要とされる、OBCAMおよび/またはNTMタンパク質の一部分をコードしているはずである。より好ましいのは、野生型OBCAMおよび/またはNTM遺伝子、またはその一部分を、それが細胞中に存在する内生変異OBCAMおよび/またはNTM遺伝子と組み換えを起こすように、変異細胞中に導入する状況である。このような組み換えは、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の変異の正確さをもたらす、二重の組

10

20

30

40

50

み換え事象を必要とする。組み換え用および染色体外での維持用の、遺伝子を導入するためのベクターは当分野で知られており、任意の適切なベクターを使用することができる。エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈殿、およびウイルス形質導入などの、DNAを細胞に導入するための方法は、当分野で知られており、方法の選択は当業者の能力範囲内のことである。野生型OBCAMおよび/またはNTM遺伝子でトランスフェクトした細胞をモデル系として使用して、癌の寛解、およびそのような寛解を助長する薬剤治療を研究することができる。

【0197】

前で概略的に論じたように、適用可能である場合は、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子または断片を遺伝子療法において使用して、癌細胞中のこのような遺伝子の発現産物の量を増大させることができる。このような遺伝子療法は、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドのレベルが、正常な細胞と比較して、存在しないかあるいは低下しており、あるいはそれ以外の場合は変化している、癌性細胞および非癌性細胞に使用するのに非常に適している。変異遺伝子が「正常な」レベルで発現される癌細胞中においても、OBCAMおよび/またはNTM遺伝子の発現のレベルを増大させることが有用である可能性もあるが、しかしながら遺伝子産物は完全に機能的であるわけではなく、変化した機能を有する。

10

【0198】

遺伝子療法は、一般に認められている方法に従って、たとえばFriedman、1991によって記載されたように行うことができる。患者の腫瘍からの細胞は、本明細書に記載した診断法によって最初に分析して、腫瘍細胞中のOBCAMおよび/またはNTMポリペプチドの生成、およびその物理的形狀(すなわち、どのような変異をそれが含むか)を確認することができる。発現調節要素と関連があるOBCAMおよび/またはNTM遺伝子のコピーを含み、腫瘍細胞内で複製することができる、ウイルスまたはプラスミドベクター(以下の詳細をさらに参照のこと)を作製する。米国特許第5,252,479号およびPCT公開出願W093/07282中に開示されたものなど、適切なベクターが知られている。したがってベクターを患者に、腫瘍の部位に局所的にあるいは全身に注射して、(他の部位に転移した可能性がある任意の腫瘍細胞に到達させる)。トランスフェクト遺伝子が、それぞれの標的腫瘍細胞のゲノムに常に取り込まれるわけではない場合、治療を周期的に繰り返さなければならない可能性がある。

20

【0199】

当分野で知られている遺伝子送達系は、本発明の遺伝子療法を実施する際に、有用である可能性がある。これらは、ウイルスおよび非ウイルス送達法を含む。いくつかのウイルスが遺伝子送達ベクターとして使用されてきており、パポバウイルス、たとえばSV40(Madzak et al、1992)、アデノウイルス(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)、ワクシニアウイルス(Moss、1992)、アデノ関連ウイルス(Muzyczka、1992;Ohi et al、1990)、HSVおよびEBVを含めたヘルペスウイルス(Margo Iskee、1992;Johnson et al、1992;Fink et al、1992;Breakfield and Geller、1987;Freese et al、1990)、および鳥類のレトロウイルス(Brandyopadhyay and Temin、1984;Petrooulos et al、1992)、ネズミ(Miller、1992;Miller et al、1985;Sorge et al、1984;Mann and Baltimore、1985;Miller et al、1988)、およびヒト起源のもの(Shimada et al、1991;Helseth et al、1990;Page et al、1990;Buchsachacher and Panganiban、1992)を含む。今日まで、大部分のヒト遺伝子療法プロトコルは、損傷したネズミのウイルスに基づくものである。

30

40

【0200】

特にOBCAMに関しては、遺伝子療法用ベクターがワクシニアウイルスベクターではないことが、好ましい可能性がある。

【0201】

当分野で知られている非ウイルス遺伝子送達法には、リン酸カルシウム共沈殿などの化学的技法(Graham and van der Eb、1973;Pellicer et al、1980);機械的技法、たとえばマイクロインジェクション(Anderson et al、1980;Gordon et al、1980;Brinster et al、1

50

981;Constantini and Lacy、1981);リポソームを介した膜融合仲介型の送達(Felgner et al、1987;Wang and Huang、1989;Kaneda et al、1989;Stewart et al、1992;Nabel et al、1990;Lim et al、1992);および直接的なDNA摂取および受容体仲介型のDNA送達(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)がある。ウイルス仲介型の遺伝子送達は、リポソーム送達を使用する直接的な *in vivo* の遺伝子送達と組み合わせることができ、ウイルスベクターを周囲の非分裂細胞ではなく腫瘍細胞に向けることができる。あるいは、レトロウイルスベクター生成細胞株を、腫瘍に注射することができる(Culver et al、1992)。したがって、生成細胞を注射することによって、ベクター粒子の連続的な源が与えられると思われる。手術不能な脳腫瘍を有するヒトにおいて使用するために、この技法が承認されてきている。

10

【0202】

他の適切な系には、Feng et al(1997)Nature Biotechnology 15、866-870によって記載された、レトロウイルス-アデノウイルスハイブリッド系、または適切な単鎖Fv断片などの標的リガンドを有するウイルス系がある。

【0203】

生物学的および物理的遺伝子送達法を組み合わせる手法では、任意の大きさのプラスミドDNAを、アデノウイルスヘキサノンタンパク質に特異的なポリリシン複合抗体と組み合わせ、生成した複合体をアデノウイルスベクターに結合させる。次いでこの三分子複合体を使用して、細胞を感染させる。アデノウイルスベクターによって、結合したDNAが損傷を受ける前に、エンドソームの効率の良い結合、内在化、および分解が可能である。

20

【0204】

リポソーム/DNA複合体は、直接的な *in vivo* の遺伝子送達を仲介することができることが示されてきている。標準的なリポソーム調製では、遺伝子送達のプロセスは非特異的であり、腫瘍堆積物の局所的な *in vivo* 摂取および発現、たとえば次に直接的な *in situ* 投与が報告されてきている(Nabel(1992)Hum.Gene Ther.3、399-410)。

【0205】

DNAを卵巣組織、たとえば卵巣の上皮細胞に直接向ける、遺伝子送達技法が好ましい。受容体仲介型の遺伝子送達は、たとえばDNA(通常は共有結合した超らせん型プラスミドの形)をポリリシンを介してタンパク質リガンドに複合させることによって行われる。リガンドは、標的細胞/組織タイプの細胞表面上の、対応するリガンド受容体の存在に基づいて選択される。これらのリガンド-DNA複合体は、望むならば血液中に直接注射することができ、標的組織に向けられ、受容体の結合およびDNA-タンパク質複合体の内在化が起こる。細胞内でのDNAの破壊という問題を克服するために、アデノウイルスによる同時感染体を含ませて、エンドソーム機能を害することができる。

30

【0206】

機能的に野生型であるOBCAMおよび/またはNTMを使用する、補充遺伝子療法を使用する場合、OBCAMおよび/またはNTMのmRNAまたはポリペプチド、または機能的OBCAMおよび/またはNTMの存在を、標的腫瘍、転移部位、血清、および身体分泌物/排泄物、たとえば尿を含めた、身体中のさまざまな部位で検出することによって、治療を監視することが有用である可能性がある。

40

【0207】

本発明の他の態様は、哺乳動物細胞中において、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの機能的断片、または変異体または融合体を発現させることができる、遺伝子療法用ベクターを提供する。典型的には、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドの機能的断片または変異体または一部分または融合体は、それぞれ野生型OBCAMまたはNTMの腫瘍抑制活性を有する。

【0208】

OBCAMの腫瘍抑制活性は図14に示し、実施例3により詳細に記載する。

【0209】

50

ベクターは、ヒト細胞中で複製することができるベクターであることが好ましい。ベクターは、本発明の遺伝子療法の態様と関係がある、前より詳細に記載したベクターであることが好ましい。

【0210】

本発明の他の態様は、患者の癌を治療する方法であって、有効量のOBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはそれらの断片または変異体または融合体(またはOBCAMおよび/またはNTM活性がある他のアゴニスト、前述のもの)を患者に投与して、癌を改善するステップを含む方法を提供する。

【0211】

OBCAMまたはNTM活性を有するペプチドを、変異を有するかあるいはOBCAMまたはNTMの対立遺伝子が欠けている細胞に与えることができる。OBCAMまたはNTMタンパク質の配列は、それぞれ図7および8または9に開示する。たとえば知られている発現ベクターを使用して、細菌中のcDNA配列を発現させることによって、タンパク質を生成させることができる。あるいは、OBCAMまたはNTMポリペプチドを、OBCAM生成またはNTM生成哺乳動物細胞から抽出することができる。さらに、合成化学の技法を使用して、OBCAMまたはNTMタンパク質を合成することができる。任意のこのような技法によって、OBCAMまたはNTMタンパク質を含む本発明の調製物を与えることができる。この調製物は、他のヒトタンパク質は実質的に含まない。これは、微生物中あるいはin vitroでの合成によって行うのが最も簡単である。

【0212】

OBCAMまたはNTM遺伝子またはcDNAは、任意の適切な方法によって、発現させることができる。一般にはDNAを、発現に関して適切な方向および正しい読み枠で、プラスミドなどの発現ベクターに挿入する。必要な場合は、所望の宿主によって認識される適切な転写および翻訳を制御調節するヌクレオチド配列に、DNAを連結させることができるが、このような調節は発現ベクター中で一般的に利用可能である。次いで標準的な技法によって、ベクターを宿主に導入する。一般に、すべての宿主がベクターによって形質転換されるわけではない。したがって、形質転換された宿主細胞を選択することが必要であろう。1つの選択の技法は、形質転換された細胞において、抗生物質耐性などの選択可能な性質をコードする、任意の必要な調節要素を有するDNA配列を、発現ベクターに取り込ませることに關するものである。あるいは、このような選択可能な性質の遺伝子は、他のベクター上にあつてよく、これを使用して所望の宿主細胞を同時に形質転換する。

【0213】

本発明の組み換えDNAによって形質転換された宿主細胞を、本明細書で開示する教示を鑑みて、十分な時間、当業者に知られている適切な条件下で、次いで培養して、次いで回収することができるポリペプチドの発現を可能にする。

【0214】

細菌(たとえば大腸菌および*Bacillus subtilis*)、酵母菌(たとえば*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌(たとえば*Aspergillus*)、植物細胞、動物細胞、および昆虫細胞を含めた、多くの発現系が知られている。

【0215】

ベクターは、ベクターが他の非原核細胞タイプにおける発現用に使用される場合でも、原核生物中で増殖させるためのColE1 oriなどの原核生物のレプリコンを含む。ベクターは、形質転換された大腸菌などの細菌宿主細胞中で、遺伝子の発現(転写および翻訳)を指示することができる、原核生物のプロモーターなどの適切なプロモーターを含むこともできる。

【0216】

プロモーターは、RNAポリメラーゼとの結合および転写の発生を可能にするDNA配列によって形成される、発現調節要素である。代表的な細菌宿主細胞と適合性があるプロモーター配列は、本発明のDNA断片を挿入するのに好都合な制限部位を含む、プラスミドベクター中に典型的には与えられる。

【0217】

典型的な原核生物のベクタープラスミドは、Biorad Laboratories(Richmond, CA, USA)から入手可能なpUC18、pUC19、pBR322およびpBR329、およびPharmacia、Piscataway, NJ, USAから入手可能なpTrc99AおよびpKK223-3である。

【0218】

典型的な哺乳動物細胞ベクタープラスミドは、Pharmacia、Piscataway, NJ, USAから入手可能なpSVLである。このベクターはSV40後期プロモーターを使用して、クローン遺伝子の発現、COS-1細胞などのT抗原生成細胞で見られる最高レベルの発現を誘導する。

【0219】

誘導性である哺乳動物の発現ベクターの一例はpMSGであり、これもPharmaciaから入手可能である。このベクターは、マウス乳癌腫瘍ウイルスの長端の繰り返し単位のグルココルチコイド誘導プロモーターを使用して、クローン遺伝子の発現を誘導する。 10

【0220】

有用な酵母菌プラスミドベクターは、pRS403-406およびpRS413-416であり、これらは一般にStratagene Cloning Systems、La Jolla, CA 92037, USAから入手可能である。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は、酵母菌組み込み型プラスミド(YIp)であり、酵母菌に選択的なマーカーHIS3、TRP1、LEU2およびURA3を取り込んでいる。プラスミドpRS413-416は、酵母菌動原体プラスミド(YCp)である。

【0221】

相補的な粘着端を介してベクターにDNAを動作可能に連結させるための、さまざまな方法が開発されてきている。たとえば、相補的なホモポリマー部位を、ベクターDNAに挿入するDNA断片に加えることができる。次いでベクターおよびDNA断片を、相補的なホモポリマー尾部の間の水素結合によって連結させて、組み換えDNA分子を形成する。 20

【0222】

1つまたは複数の制限部位を含む合成連結剤によって、DNA断片をベクターに連結させる代替法が与えられる。前に記載したエンドヌクレアーゼによる制限消化によって生成するDNA断片は、バクテリオファージT4DNAポリメラーゼ、または大腸菌DNAポリメラーゼI、突出部、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性を有する3'-一本鎖末端を除去し、重合活性を有する窪んだ3'-端を充填する酵素で処理する。

【0223】

したがって、これらの活性を組み合わせることによって、平滑末端型DNA断片が生成する。次いで平滑末端型断片を、平滑末端型DNA分子の連結を触媒することができる酵素、バクテリオファージT4DNAリガーゼなどの存在下において、非常にモル過剰の連結分子と共にインキュベートする。したがって、この反応の生成物は、その両端にポリマー連結配列を有するDNA断片である。したがって、これらのDNA断片は適切な制限酵素で切断され、DNA断片の末端と適合性がある末端を生成させる酵素で切断された発現ベクターに連結される。 30

【0224】

本発明の他の態様は、患者の癌を治療する方法であって、腫瘍細胞中に見られる変異OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能を阻害する、あるいは野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現を上方制御する、有効量の化合物を患者に投与するステップを含む方法を提供する。 40

【0225】

本発明の方法で使用するのに適した化合物には、変異OBCAMまたはNTMの活性を阻害する抗体または断片、またはその変異体、あるいは変異OBCAMおよび/またはNTMの発現を阻害するアンチセンス分子がある。

【0226】

メチル化阻害剤も適切である(あまり好ましくはないが);以下および実施例中に記載するように、OBCAMおよびNTM遺伝子が癌ではメチル化され、メチル化阻害剤を投与することにより、このメチル化を阻害することによって、野生型遺伝子または遺伝子群の発現を上方制御することができる。メチル化阻害剤は当分野で知られており、化合物アザシチジンを 50

含む。他のメチル化阻害剤には、5デオキシ-アザシチジン、またはDNAメチルトランスフェラーゼに対するアンチセンスオリゴがある。

【0227】

本発明の他の態様は、患者のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子がメチル化されている癌を治療する方法であって、DNAのメチル化を低下させるかあるいは阻害する有効量の化合物を、患者に投与するステップを含む方法を提供する。

【0228】

以下で論じるように、メチル化を阻害することによって、その発現の低下が癌を引き起こす可能性があるOBCAMおよび/またはNTM遺伝子の発現の低下を引き起こす、メチル基を除去することができる。したがって、癌細胞中のOBCAMおよび/またはNTMのメチル化の低下によって、OBCAMおよび/またはNTMの発現が増大し、癌細胞を除去し、癌細胞の制御不能な増殖の速度を低下させることができる。

10

【0229】

本発明の他の態様は、細胞中のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子の発現を増大させるための方法であって、DNAのメチル化を低下させるかあるいは阻害する、有効量の化合物を細胞に投与するステップを含む方法を提供する。

【0230】

本明細書に示す他の治療剤と組み合わせて化合物を投与することが、有益である可能性がある。

【0231】

好ましい実施形態では、細胞は患者内の細胞である。細胞が患者内の癌または腫瘍細胞である場合は、それがさらに好ましい。

20

【0232】

腫瘍細胞中に見られる変異OBCAMまたはNTMポリペプチドの機能を阻害する、あるいは野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現を上方制御する、あるいはそれ以外の場合はOBCAMまたはNTMのアゴニストとして作用する化合物は、スクリーニングによって得ることができる。

【0233】

OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドを使用すること、または任意のさまざまな薬剤スクリーニング技法においてそれらの断片を結合させることによって、スクリーニング化合物を使用することができる。

30

【0234】

このような試験で使用する、腫瘍細胞中に見られるOBCAMおよび/またはNTMポリペプチド、またはその断片または変異体は、溶液中に遊離しているか、固形担体に固定されているか、あるいは細胞表面上に付着しているか、あるいは細胞表面上に付着しているか、あるいは競合結合アッセイにおいて、ポリヌクレオチドまたは断片を発現する組み換えポリヌクレオチドによって安定して形質転換される、真核または原核宿主細胞を使用する。生存形または固定形のこのような細胞は、標準的な結合アッセイ用に使用することができる。たとえば、OBCAMまたはNTMポリペプチド、または断片と試験する物質の間の複合体の形成を測定することができ、あるいはOBCAMまたはNTMポリペプチド、または断片の間の複合体の形成の程度を調べることができ、知られているリガンドは試験する物質によって害される。

40

【0235】

したがって本発明は、薬剤をスクリーニングする方法であって、このような物質と、腫瘍細胞中に見られるOBCAMまたはNTMポリペプチド、またはその断片またはその変異体を接触させること、および当分野でよく知られている方法によって、(i)その物質とOBCAMまたはNTMポリペプチド、または断片または変異体の間の複合体の存在、あるいは(ii)OBCAMまたはNTMポリペプチド、または断片または変異体とリガンドの間の複合体の存在をアッセイすることを含む方法を提供する。このような競合結合アッセイでは、OBCAMまたはNTMポリペプチド、または断片または変異体を、典型的には標識する。遊離OBCAMまたはNTMポリペ

50

プチド、または断片または変異体は、タンパク質:タンパク質複合体中に存在するものから分離し、遊離(すなわち非複合体)標識の量は、それぞれ、試験する物質とOBCAMまたはNTMの結合、またはOBCAMまたはNTMとのその阻害:リガンド結合の指標である。

【0236】

変異OBCAMおよび/またはNTMの機能を正すことができる薬剤(したがって、野生型の機能が回復する)、またはその擬似野生型であるOBCAMおよび/またはNTMの機能を正すことができる薬剤は、有用であると考えられる。同様に、野生型OBCAMおよび/またはNTMの発現を促進する薬剤は、有用であると考えられる。

【0237】

野生型OBCAMおよび/またはNTMの発現は、発現の阻害剤を除去することによって、促進させることができる。たとえば、OBCAMおよびNTMの発現は、それぞれの遺伝子のCpGアイランドをメチル化することによって阻害される。アザシチジン、5デオキシ-アザシチジン、またはDNAメチルトランスフェラーゼに対するアンチセンスオリゴなどの、メチル化阻害剤を投与することによって、CpGアイランドのメチル化が妨げられ、これによって遺伝子の発現が促進される。したがって、患者の野生型OBCAMまたはNTMポリペプチドの発現を上方制御する方法は、メチル化阻害剤を投与することを含む。

【0238】

薬剤スクリーニングに関する他の技法によって、OBCAMまたはNTMポリペプチドに対して適切な結合親和性を有する化合物の、ハイスループットスクリーニングがもたらされ、これは1984年9月13日に公開された、Geysen、PCT公開出願W084/03564中に詳細に記載されている。簡潔に述べると、多数の異なる小さなペプチド試験化合物を、プラスチック製のピンなどの固形支持体上、あるいは何か他の表面上で合成する。ペプチド試験化合物は、OBCAMまたはNTMポリペプチドと反応させ、洗浄する。次いで結合したOBCAMまたはNTMポリペプチドを、当分野でよく知られている方法によって検出する。

【0239】

精製したOBCAMまたはNTMは、前述の薬剤スクリーニング技法において使用するために、プレート上に直接コーティングすることができる。しかしながら、ポリペプチドに対する非中和抗体を使用して抗体を捕らえ、OBCAMまたはNTMポリペプチドを固相上に固定することができる。

【0240】

本発明は、競合薬剤のスクリーニングアッセイの使用も企図するものであり、OBCAMまたはNTMポリペプチドに特異的に結合することができる中和抗体が、OBCAMまたはNTMポリペプチドまたはその断片への結合に関して、試験化合物と競合する。このようにして、抗体を使用して、OBCAMまたはNTMポリペプチドの1つまたは複数の抗原決定基を共有する、任意のペプチドの存在を検出することができる。

【0241】

薬剤スクリーニングに関する他の技法は、変異OBCAMおよび/またはNTM遺伝子を有する宿主真核生物の細胞株または細胞(前に記載したものなど)の使用に関するものである。これらの宿主細胞株または細胞は、OBCAMおよび/またはNTMポリペプチドのレベルで欠陥がある。宿主細胞株または細胞は、薬剤化合物の存在下で増殖させる。宿主細胞の増殖率を測定して、その化合物がOBCAMおよび/またはNTM欠陥細胞の増殖を調節できるかどうかを判定する。

【0242】

レポーター遺伝子に動作可能に連結したOBCAMまたはNTMのプロモーター配列を利用する、スクリーニングを誘導することもできる。レポーター遺伝子の発現を選択的に増大させる化合物を、有用に選択することができる。

【0243】

追加的あるいは代替的に、合理的な薬剤設計を使用することができる。合理的な薬剤設計の目的は、生物学的に活性がある当該のポリペプチド、相互作用して、たとえば、より活性がありあるいは安定した形のポリペプチドであるか、あるいは、たとえば、in vivoで

10

20

30

40

50

ポリペプチドの機能を高めるか害する薬剤を形成する小分子(たとえば、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤)の構造類似体を生成させることである。たとえばHodgson、1991を参照のこと。1つの手法では、当該のタンパク質(たとえば、OBCAMまたはNTMポリペプチド)、たとえばOBCAMまたはNTMリガンド複合体の三次元構造を、X線結晶解析法によって、コンピュータによるモデル化によって、あるいは最も典型的には手法の組み合わせによって最初に決定する。頻繁にはないが、ポリペプチドの構造に関する有用な情報を、相同タンパク質の構造に基づくモデル化によって、得ることができる。合理的な薬剤設計の一例は、HIVプロテアーゼ阻害剤の開発である(Erickson et al(1990)Science 249、527-533)。さらに、ペプチド(たとえば、OBCAMおよびNTMポリペプチド)は、アラニンスクランによって分析される(Wells(1991)Methods Enzymol.202、390-411)。この技法では、アミノ酸残基をAlaで置換し、ペプチドの活性に対するその影響を決定する。ペプチドのそれぞれのアミノ酸残基をこのように分析して、ペプチドの重要な領域を決定する。

10

20

30

40

50

【0244】

機能アッセイによって選択される、標的に特異的な抗体を単離して、次いでその結晶構造を解明することも可能である。原則として、この手法によって、後の薬剤設計の基となり得る薬理作用団(pharmacophore)がもたらされる。抗イディオタイプ抗体(anti-ids)を機能的な、薬理的に活性がある抗体にすることによって、タンパク質の結晶解析を完全に回避することが可能である。鏡像の鏡像として、anti-idsの結合部位は、元の受容体の類似体であると予想される。したがってanti-idを使用して、化学的または生物学的に生成させた群のペプチドの群から、ペプチドを同定および単離することが可能であると思われる。したがって選択したペプチドは、薬理作用団として作用すると思われる。

【0245】

したがって、たとえば改善されたOBCAMおよび/またはNTMポリペプチドの活性または安定性を有する薬剤、またはOBCAMおよび/またはNTMポリペプチド活性の阻害剤、アゴニスト、アンタゴニストなどとして作用する薬剤を設計することができる。クローンOBCAMおよびNTM配列を利用することによって、十分な量のOBCAMおよびNTMポリペプチドを利用して、X線結晶解析などの分析研究を行うことができる。さらに、本明細書で与えるOBCAMおよびNTMタンパク質配列の知識は、X線結晶解析法の代わりに、あるいはそれに加えて、コンピュータによるモデル化技法を使用する人を助けるであろう。

【0246】

変異OBCAMおよび/またはNTM対立遺伝子を保有する、細胞および動物をモデル系として使用して、治療剤としての可能性を有する物質に関して、研究および試験することができる。それらの細胞は、典型的には培養された上皮細胞である。これらの細胞は、OBCAMおよび/またはNTM変異体を有する個体、体細胞または生殖細胞のいずれかから単離することができる。あるいは、当分野でよく知られている方法を使用して、細胞株を工学処理して、OBCAMおよび/またはNTM対立遺伝子の変異を行わせることができる。試験物質を細胞に施した後に、新生物に形質転換された表現型の細胞を決定する。足場非依存性増殖、ヌードマウスの腫瘍形成、細胞の侵襲性、および増殖因子依存性を含めた、新生物に形質転換された細胞の任意の性質を評価することができる。これらの性質のそれぞれに関するアッセイは、当分野で知られている。

【0247】

治療剤の試験用の動物は、動物全体の変異誘発の後、あるいは生殖細胞または接合子进行处理した後に、選択することができる。このような処理は、通常は第2の動物種からの、変異OBCAMおよび/またはNTM対立遺伝子を挿入すること、および破壊された相同遺伝子を挿入することを含む。あるいは、動物の内生のOBCAMおよび/またはNTM遺伝子は、挿入または欠失変異、あるいは従来技法を使用する他の遺伝的改変によって、破壊することができる(Capecci、1989;Valancius and Smithies、1991;Hasty et al、1991;Shinkai et al、1992;Mombaerts et al、1992;Philpott et al、1992;Snouwaert et al、1992;Donehower et al、1992)。試験物質を動物に投与した後に、腫瘍の増殖を評価しなければならない。試験物質が腫瘍の増殖を妨げるかあるいは抑制する場合、したがって試験物質は、本明細

書で示す癌を治療するための、候補となる治療剤である。これらの動物モデルによって、潜在的な治療品用の非常に重要な試験用媒体が与えられる。

【0248】

活性OBCAMおよび/またはNTM分子を、たとえばマイクロインジェクションによって、あるいはリポソームを使用することによって、細胞に導入することができる。あるいは、いくつかの活性分子を、細胞によって活性的に、あるいは拡散によって摂取させることができる。OBCAMおよび/またはNTM遺伝子産物を細胞外に施すことは、腫瘍の増殖に影響を与えるのに充分である可能性がある。OBCAMおよび/またはNTM活性を有する分子を与えることによって、新生物状態の部分的な逆行がもたらされるはずである。OBCAMおよび/またはNTM活性を有する他の分子(たとえば、ペプチド、薬剤または有機化合物)を使用して、この

10

【0249】

本発明の他の態様は、OBCAMまたはNTMポリペプチド、またはそれらの機能変異体、または一部分または融合体をコードする核酸を含む遺伝子療法用ベクター、および薬剤として許容される担体を含む、薬剤組成物;OBCAMまたはNTM遺伝子、またはその変異対立遺伝子、またはOBCAMまたはNTMのcDNA、またはその変異対立遺伝子と選択的にハイブリダイズする核酸を含む遺伝子療法用ベクター、および薬剤として許容される担体を含む、薬剤組成物;OBCAMまたはNTMポリペプチド、またはそれらの断片または変異体または融合体、および

20

【0250】

適切な遺伝子療法用ベクターは、前に記載したものである。適切なOBCAMおよびNTMポリペプチドは、前に記載したものである。前述のように、特にOBCAMに関しては、遺伝子療法用ベクターがワクシニアウイルスベクターではないことが好ましい。

【0251】

「薬剤として許容される」によって、調合物が滅菌されており病原体を含まないことが含まれる。適切な薬剤担体は、薬の分野ではよく知られている。

【0252】

ここで本発明を、以下の非制限的な実施例および図面を参照しながら、より詳細に記載することにする。

30

【実施例1】

【0253】

上皮性卵巣癌(EOC)の進行におけるOBCAMおよびNTMの役割

卵巣血液/腫瘍対DNAの11q24-q25のLOHの分析

卵巣腫瘍全体から抽出したDNAから、および適合性のある正常な対照として血液から、あるいは正常な卵巣組織からの、染色体の11q24-q25領域から選択した、蛍光標識した多型性マイクロサテライトマーカーを、PCR増幅させた。動原体~11qterの順で使用したマーカーは、11cen-D11S910-D11S1320-D11S874-D11S4085-D11S969-11qterであった。PCR増幅産物を、GeneScanソフトウェア(PE Biosystems)を使用して、ABI 310 Genetic Analyzer上で分離させた。LOHは、正常な組織と比較した、腫瘍中の対立遺伝子間の30%以上の違いの不均衡として定義する。D11S4085で観察されるLOHの顕著な特徴は、LOHの完全性である。卵巣腫瘍のDNAが、ミクロ解剖した組織からではなく、卵巣全体から抽出されたと考えると、これは珍しい。腫瘍組織は、通常は汚染した正常細胞、たとえばストロマ細胞の一部を含むとみなされていると思われる。しかしながら、この場合は消失が非常に完全なものであるので、我々は汚染した正常細胞の欠如から、D11S4085対立遺伝子の消失は、卵巣癌形成の過程の、非常に初期の事象であると推測することができる。

40

【0254】

OBCAM/NTM領域の物理的な地図化

OBCAMおよびニューロトリンは、11q24-q25LOH関連遺伝子である。LOHの領域を同定したので、我々は次に、卵巣癌中のLOHによって破壊された領域からの遺伝子を同定しようと

50

した。LOHの研究で使用するマーカーを含む11q24-q25領域から、BACクローンを同定するために、それらの対応するヌクレオチド配列を使用して、NCBIのGenbank HTGSデータベースをBLAST検索した。使用したマーカーの中では、D11S969以外のすべてによって、HTGSデータベースの相同性検索において、BACクローンが同定された。次いで、対応するBACクローンからのヌクレオチド配列を、UK Human Genome Mapping Project Resource Centre(HGMP-RC)の、Nucleotide Identify X(NIX)アルゴリズムを使用して分析した。NIXによって、多数の生物情報プログラムを1つのヌクレオチド配列に同時に行うこと、多数のデータベースに対するBLAST検索など、ヌクレオチドおよびタンパク質翻訳の相同性を同定すること、エクソンの予想、CpGアイランドの予想などを行うことが可能である。NIXによって我々は、重複BACクローンを取り込んでいる領域の近辺の地図を編集し、研究中にその領域の遺伝子、それらのマーカーに対する位置を同定することができる(図1)。

10

【0255】

NIXによって、2つの非常に関連がある遺伝子OBCAMとニューロトリミンは、LOHの領域中に存在する唯一の遺伝子であることが確認されている。最高LOHのマーカー、D11S4085はOBCAM中に含まれ、一方ニューロトリミンは、2つのマーカー:D11S1320およびD11S874に広がる。OBCAMとNTMは非常に関連があり、それぞれ約80%および76%のヌクレオチドおよびタンパク質同一性を共有している。マウスでは、そのそれぞれの相同体は、ヒト染色体11q24-q25と遺伝子が同じ染色体上にある染色体9の領域上で、互いに近くに位置している。したがって、この2つの遺伝子は、人間とマウスの分岐よりも前に起こった、遺伝子複製事象の結果として生じた可能性がある。人間では、この2つの遺伝子は、3'-3'方向、相近の転写方向に配置されている(図1)。

20

【0256】

OBCAMおよびNTMは、正常な卵巣表面上皮(OSE)では発現するが、卵巣癌細胞株中では発現しない。

我々は、培養した正常なヒトOSE(HOSE)、主要な手術によって除去したHOSEから、および正常な卵巣全体から、RNAを抽出した。RT-PCRによって、OBCAMおよびNTMは、主要な手術によって除去した上皮中で発現し、一方培養したHOSEでは、OBCAMではなくNTMのみの発現が検出可能であることが示された。OSEは器官全体のわずかな成分しか含んでいないにもかかわらず、卵巣全体からは両方の発現が検出可能であった。

【0257】

対照的に、卵巣、乳、肺、結腸および膵臓癌細胞株から単離したRNA群では、いかなる実質的な程度でも、いずれの遺伝子の発現も明らかではなかった。ノーザンプロットによって、すべての細胞株で発現は完全に検出不能であったが、2つ:Ca0v3(卵巣)およびWX330(小細胞肺癌)は例外であり、これらではNTMの発現が容易に検出不能であった。興味深いことに、Ca0v3中のNTM転写物の大きさは、完全長NTMに関して予想されたものよりも小さかった。RT-PCR分析によって、5'切断型mRNAのために、転写物は予想されたものより短いことが示されており、その正確な程度は決定されておらず、イントロンの他のプロモーターを使用することによって結合する5'変異体の結果として、生じる可能性がある。

30

【0258】

OBCAMおよびNTMのCpGアイランドは、細胞株中でメチル化され、発現の欠如と相関関係がある。

40

OBCAMおよびNTMのCpGアイランドのメチル化状態を、プライマー対を用いるMSPCRによって評価して、卵巣、乳、肺、結腸および前立腺起源である癌細胞株の範囲の、メチル化および非メチル化対立遺伝子を検出した。その結果は、表1および2に表す。我々は、RT-PCRによってOBCAMおよびNTMの発現のレベルに関して、同じ範囲の細胞株をアッセイし、それらの結果をMSPCRアッセイで決定したメチル化状態と比較した。それぞれのCpGアイランドのメチル化と、検出可能な発現の欠如の間の、相関関係が見出された;逆に、メチル化の欠如は、遺伝子の発現と相関関係がある。この相関関係の1つの例外は卵巣癌細胞株0AW28であり、これは明らかなメチル化がないにもかかわらず、いずれの遺伝子の発現も示さない。これは、この特定のアッセイにより検出することができないメチル化に、原因がある可

50

能性がある。:それは増幅される領域の外側、あるいはMSPCRプライマーの間に存在する。
なぜなら、MSPは、プライマー結合部位そのもののメチル化の有無のみを検出するからである。

【 0 2 5 9 】

【表 1】

表1:MS-PCR分析によって判定した、癌細胞株中のNTMのメチル化状態

FM=完全にメチル化

HM=ヘミメチル化

U=非メチル化

PE016	FM	10
PEA1	FM	
PEA2	FM	
OVCAR 4	FM	
OVCAR 5	FM	
OAW 42	FM	
A2780	FM	
SK-OV-3	FM	
OVCAR 3	HM	
PE01	HM	20
PE01 CDDP	HM	
PE04	HM	
PE06	HM	
PE014	HM	
PE023	HM	
OAW 28	U	
59 M	U	
CaOV3	U	
MDA.MB.2	FM	30
31		
ZR75.1	FM	
MCF7	FM	
T47D	HM	
LoVo	FM	
HT-29	FM	
HRT-18	FM	
HCT-15	FM	
SW48	FM	40
DU145	FM	
PC-3	FM	
LNCaP	HM	
PANC1	FM	
HELA	FM	
K562	HM	
FATO	U	
WX330	U	
HL60	U	50

【 0 2 6 0 】

【 表 2 】

表2:MS-PCR分析によって判定した、癌細胞株中のOBCAMのメチル化状態

FM=完全にメチル化

HM=ヘミメチル化

FM/HM=完全またはヘミメチル化

U=非メチル化

-=判定せず

PE01	FM/HM	10
PE01 CDDP	FM	
PE016	FM	
OVCAR 3	FM	
OVCAR 4	FM	
OVCAR 5	FM	
OAW 42	FM	
A2780	FM	
PEA1	-	
PEA2	FM	
PE04	FM	20
PE06	FM	
PE014	-	
OAW 28	U	
59 M	U	
CaOV3	U	
MCF7	FM	
ZR75.1	FM/HM	
T47D	HM	
HT-29	FM	30
HRT-18	FM	
HCT-15	FM	
SW48	FM	
DU145	FM	
PC-3	FM/HM	
LNCaP	HM	
HELA	FM	
K562	HM	
PANC1	HM	40
FATO	U	
WX330	U	
HL60	U	

【 0 2 6 1 】

OBCAMおよびNTMは、原発性の卵巣腫瘍中でメチル化される

我々はMSPCRを行って、13の卵巣腫瘍/正常(または血液)と適合性がある対のDNA中の、OBCAMおよびNTMのメチル化および非メチル化対立遺伝子を検出した。メチル化DNA(Intergen)、および非メチル化DNA(HL60細胞株)対照サンプルを含めた、13の血液/腫瘍の対に関するMSPアッセイの代表的な組は、図3に示し、それらの結果の概要は図6に示す。NTMはOBCAM

のメチル化を伴うことが多く、この2つは一致すると考えることができることを、我々は観察した。これはOBCAM(D11S4085)のLOHと関連する生存性の欠如と一致し、OBCAMの不活性化は、このプロセスの初期事象であることが示される。

【0262】

物質および方法

卵巣癌と適合性がある血液(正常)/腫瘍対サンプル

65の適合性がある血液(またはパラフィン包埋正常卵巣組織)、およびパラフィン包埋卵巣腫瘍サンプルから、製造者のプロトコル(QIAGEN)に従いQIAamp DNAミニキットを使用して、DNAを抽出した。

【0263】

異型接合性の消失の分析

11q24-q25領域からの6つの蛍光標識した多型性マイクロサテライトマーカーからの、PCR産物を、適合性がある卵巣の正常/腫瘍DNA群から、増幅させた。cen-D115910-2-D11S1320-D11S874-D1154085-D11S969-11qterPCR産物を分離させ、Genescanソフトウェア(PE Biosystems)を使用してABI 310 Genetic Analyzer上で分析した。

【0264】

ヒト染色体11q24-q25領域の生物情報分析:

LOHを検出するために使用する6つの多型性11q24-q25マーカーを含むBACクローンを、マーカー配列を用いるBLAST検索によって、GenBankのHigh Throughput Genomic Sequences(HTGS)データベースから同定した。次いで、同定したBACクローンからの配列を、Nucleotide Identify X(NIX)アルゴリズム(Human Genome Mapping Project Resource Centre, Hinxton, UK)を使用して分析した。このようにして、マイクロサテライトマーカーに対する知られている遺伝子の位置を詳しく調べながら、領域のBAC近辺の地図を作製した。

【0265】

逆転写酵素PCR(RT-PCR)

細胞株からの完全なRNA抽出を、TRI Reagent(Sigma, Dorset, UK)を使用して行った。一本鎖cDNA合成キット(Roche, UK)を使用して、1μgのDNaseI処理物から一本鎖cDNAを調製し、次いで2μlの等分試料を、25μlのPCR反応混合物中で鋳型として使用した。あるいは、少ない細胞数に関しては、DNaseI処理したすべてのRNAは、Absolutely RNA mini prep スピンカラム(Stratagene)を使用して調製し、一本鎖cDNAは記載したように調製した。

【0266】

組織の発現

Multiple Tissue Northern(MTN)プロット品(Human IおよびHuman II)、およびMultiple Tissue cDNA群(Human IおよびHuman II)を、BD Clontech、Basingstoke、UKから購入した。MTNは、奨励されているようにExpressHyb緩衝液(BD Clontech)を使用して、完全長OBCAMおよびNTMのPCR増幅させたcDNAプローブとハイブリダイズさせた。プロット品を、³²P-アクトチン対照プローブ(BD Clontech)と再度ハイブリダイズさせた。完全長cDNA産物を増幅させるために設計した、OBCAMおよびNTMプライマー対を用いるPCRによって、MTC群をスクリーニングした。

【0267】

メチル化特異的PCR(MSPCR)

正常/卵巣腫瘍と適合性がある対(前述のもの)、および細胞株の群(卵巣、乳、肺、結腸および膵臓癌)から単離したゲノムDNAを、製造者のプロトコルに従いCpG Modificationキット(Intergen)を使用して、重亜硫酸塩処理によって改変させた。対照のメチル化DNAは、Intergenから購入した。重亜硫酸塩で改変させたDNAを、ヒトNTMおよびOBCAMのCpGアイランドのメチル化および非メチル化対立遺伝子を、それぞれ特異的に認識するプライマー対を用いて、PCR増幅させた。プライマー対および増幅条件は、以下の通りであった。

【0268】

OBCAMおよびNTMのCpGアイランド中の、CpGアイランドのメチル化度を決定するために、メチル化特異的PCRで増幅させ重亜硫酸塩処理したDNAを、pGEM-T Easy TAクローニングベク

10

20

30

40

50

ター (Promega) にサブクロニングした。それぞれのPCR産物に対応する6つのサブクロニングを、標準的な方法に従ってBig Dye (PE BioSystems) の化学物質を使用して塩基配列を決定した。

【0269】

アザシチジンおよびTSAによる再発現

脱メチル化再発現の実験では、 5×10^6 個の細胞 (OBCAMに関してはMDAMB23.1; ニューロトリミンに関してはMDAMB23.1およびT47D) をまき、24時間接着させたままの状態にした。細胞は10 μ Mのアザシチジン (Sigma) の存在下でインキュベートし、4日間の最後の24時間0.3 μ MのTSAを加えた。細胞を採取し、RNAを単離し、一本鎖cDNAを合成し、OBCAM、NTMおよびアクチンPCRプライマーを用いてRT-PCR反応を行った。

10

【0270】

OBCAMのSKOV-3へのトランスフェクション

Kozakコンセンサス配列および3'UTR重複部を含む、ヒトOBCAMの完全なコード配列を、正常なヒト卵巣表面上皮のRNAからPCR増幅させ、pGEM-T Easy TAクローニングベクター (Promega) にサブクロニングした。増幅用に使用したPCRプライマー対は以下のものである:

OPCML F1:5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3'nucs34-53

OPCML R1:5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3'nucs1110-1091

Genbank受託番号NM_002545のmRNA (NM_002545.2参照配列) からの、ヌクレオチド番号。次いでOBCAM挿入体を、NotIで切除し、NotIで消化したpcDNA3.1Zeo哺乳動物発現ベクター (Invitrogen) に再度サブクロニングした。次いで挿入配列を、トランスフェクションで使用する前に確認した。OBCAMのセンスおよびアンチセンス構築体に対応するプラスミドDNA、および親ベクターを、標準的な方法 (QIAGEN) によって作製し、PvuIで消化した。1 μ gおよび2 μ gのPvuI-線状構築体およびベクターを、リポフェクチンの存在下で、クローンSKOV-3ネオマイシン耐性細胞株SKNV3.3にトランスフェクトした。

20

【0271】

Zeomycin (Invitrogen) の選択

トランスフェクションの48時間後に、細胞を1:6に分け、Zeomycin抗生物質選択品の存在下で培養した。次いで個々のコロニーを、3週間の分析用に選択し、次に抗生物質の選択を行った。

【0272】

トランスフェクションによって、OBCAMアンチセンスおよびベクター対照トランスフェクタントは、OBCAMセンストランスフェクタントより早く増殖することが示され、増殖に対する機能的な抑制効果が存在することが示唆される。

30

【0273】

考察

我々は、65対の正常/腫瘍サンプル中の11q24-q25領域のEOCに、より高度なLOH分析を行い、OBCAM遺伝子内のマーカーD11S4085で、高率である56%のLOHを確認した。さらに、相同遺伝子、ニューロトリミン (NTMまたはNTM) 内の、マーカーD11S1320およびD11S874で、40%のLOHも検出した。臨床病理学的なパラメータを分析することによって、LOHと患者の低い生存率の関係が示されることはなく、これらの遺伝子の消失は、卵巣の発癌の初期事象であることが示される。いずれも、我々の以前のLOHの研究において検出された、生存遺伝子ではないことも証明される。43の適合性がある正常/卵巣腫瘍対から単離したDNA、および6つの腫瘍のみのDNAのメチル化特異的PCRによって、OBCAMおよびNTMの76%というCpGアイランドのメチル化率、遺伝子間の86%の一致を確認した。重亜硫酸塩による塩基配列決定によって、両方の遺伝子からのCpGアイランド内で、広範囲のメチル化の存在を確認した。12のEOC株の中では、OBCAMが75%の細胞株で完全にメチル化状態であり、部分的にメチル化状態であるものは0%であり、25%は非メチル化状態であった。HNT/NTMに関しては、13のEOC株の中で、54%が完全にメチル化状態であり、23%が部分的にメチル化状態であり、23%が非メチル化状態であった。トリコスタチンA (TSA) を用いたアザシチジン処理によって、両方の遺伝子の再発現が行われ、CpGアイランドのメチル化は、これらの遺伝子の

40

50

発現の欠如の根底にある機構であることの、決定的な証拠が与えられた。MS-PCRによる研究から、OBCAMのCpGアイランドのメチル化は、NTMのCpGアイランドに関して見られ、NTMメチル化が起こるための必須条件である可能性があることは明らかである。これをLOHデータと組み合わせると、2つの遺伝子の中では、疾患の初期事象において、OBCAMがより重要であることが示唆される。したがって我々は、CMVプロモーターの調節下で、OBCAMを卵巣癌細胞株SKOV-3のクローン誘導体にトランスフェクトし、以下の影響が示される。3つの観察結果によって、抑制物質としてのNTM/OBCAMの機能が示唆される。第1に、いくつかのセンスNTMトランスフェクトSKOV3クローンは、アンチセンスクローンと比較して、腫瘍形成の抑制を示すという証拠が存在するが、SKOV3のクローンの異型接合性によって、このデータを解釈するのが難しくなった。さらに、形態学的に、センスNTMトランスフェクトSKOV3クローンに関する接触障害があったという、いくつかの証拠が存在した。最後に我々は、アンチセンスOBCAM、およびSKOV3のベクター対照トランスフェクトクローン誘導体(SKNV3.3)が、同じSKOV3細胞株にトランスフェクトしたセンスOBCAMと比較して、速い増殖を示すことに気付いた。アンチセンスOBCAMSKOV3トランスフェクトクローン細胞株と比較して、OBCAMSKOV3トランスフェクトクローンの増殖率の、明らかな50%の低下が存在する。LOHとメチル化研究を関連付けることによって、Knudsenの腫瘍抑制遺伝子不活性化の古典的な2-ヒット機構(Knudsen AG, 1971 Proc Natl Acad Sci 68(4)p820-823)に従って、2つの不活性化の存在が当てはまることに関する証拠を我々は与える。それは、ただ1つの不活性化機構(LOHまたはメチル化のいずれか)が存在する腫瘍サンプルによって我々は、OBCAM遺伝子中の変異を検出するために、これらのサンプルを標的化することができることも強調した。

10

20

【0274】

これは、任意の形の癌、あるいは実際には任意の形のヒト疾患の進行における、IgLONファミリー、特にOBCAMおよびニューロトリンミンに関する、最初の記載である。

【実施例2】

【0275】

SKNV3.3はOBCAMに関してメチル化するが、OBCAMは発現しない細胞株SKNV3.3は、卵巣癌細胞株SKOV-3のネオマイシン耐性のクローン誘導体である。我々は、定量RT-PCRによって、SKNV3.3はOBCAMを発現しないこと、かつMS-PCRによって、OBCAMのCpGアイランドがメチル化されることを示している。さらに、*in vitro*でSKNV3.3を5'-アザ-2'-デオキシシチジンに暴露させた後の、脱メチル化によって、OBCAMの再発現が

30

【0276】

OBCAMのCpGアイランドは、MS-PCRアッセイによって判定されるように完全にメチル化される。したがって、SKNV3.3中でのOBCAMの発現は、この後生的機構によって抑制される。CpGアイランドのメチル化がOBCAMの発現を抑制する機構であることを証明するために、SKNV3.3細胞を5'-アザ-2'-デオキシシチジンに暴露させ、RT-PCR、サザンプロット、およびOBCAM特異的プローブとのハイブリダイゼーションによって、OBCAMの再発現をアッセイした。

【0277】

1×10^5 個のSKNV3.3(6回継代)細胞を、 25 cm^3 の組織培養フラスコ中の10m1培地にまいた。この培地は24時間後に交換し、5'-アザ-2'-デオキシシチジン(Sigma A3656)を加えて、最終濃度 $20 \mu\text{M}$ を与えた。細胞用の控えのフラスコには、アザシチジンの暴露は行わなかった(対照)。4日後、両方のフラスコからの細胞を採取し、DNaseI処理し、Absolutely RNA Miniprepキット(Stratagene)を使用して完全なRNAを調製した。一本鎖cDNA合成キット(Roche)を使用して、一本鎖cDNAを合成し、 $2 \mu\text{l}$ の等分試料であるcDNAをRT-PCR反応当たりで使用した。

40

【0278】

アクチンRT-PCRを行って、対照およびアザシチジン処理したSKNV3.3細胞からの、一本鎖cDNAの完全性を確認した。アガロースゲル上に分けた、それぞれのアクチンPCR反応の等量

50

の等分試料によって、両方のサンプルの完全性、およびサンプル当たりのcDNAの等しい濃度が確認された。

【0279】

OBCAMのRT-PCR反応:

OPCMLF4/R6のRT-PCR(474bp産物)を、25 μ lの反応混合物中で行った。

使用したPCRプライマーは以下のものである(GenBank受託番号NM_002545に対応するヌクレオチド番号)

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

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

【0280】

OBCAMのPCR反応からの産物を、2%アガロースゲル上で大きさによって分け、MSIナイロン膜上で一晩サザンブロットし、次いでDNAを紫外線により膜に架橋させた。

【0281】

QIAquick PCR用精製カラム(QIAGEN)によって精製した、OBCAMエクソン2F2/OPCMLR6のPCR産物を、³²P-dCTP.PCRで標識した。PCRプライマーは以下のものであった(GenBank受託番号NM_002545に対応するヌクレオチド番号):

OBCAMエクソン2F2:5'-ATAGACCCTCGTGTGATCAT-3'nucs300-319

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

【0282】

一晩のハイブリダイゼーションの後に、ブロット品を洗浄して、非結合プローブを除去し、ブロット品を-70 $^{\circ}$ Cにおいて1時間、X線フィルムに暴露し、次いで現像した。

【0283】

OBCAMの再発現は、20 μ Mの5'-アザ-2'-デオキシシチジンに4日間暴露させたSKNV3.3細胞において、明らかに示される。対照的に、4日後に5'-アザ-2'-デオキシシチジン処理がない対照のSKNV3.3細胞では、OBCAMの再発現は検出不能である(図13)。アクチンPCR産物を、対照および処理細胞の両方で等しい強度で増幅させて、単離RNAおよび合成した一本鎖cDNAの完全性を確認した。

【実施例3】

【0284】

SKNV3.3(SKOV3クローン誘導体)中のOBCAMの機能の研究

OBCAMのSKNV3.3へのトランスフェクション

Kozakコンセンサス配列および3'UTR重複部を含む、ヒトOBCAMの完全なコード配列を、正常なヒト卵巣表面上皮のRNAからPCR増幅させ、pGEM-T Easy TAクローニングベクターにサブクローニングした。ヌクレオチド34-1110(NM_002454.2参照配列)を増幅させるために使用した、PCRプライマー対は以下のものであった:

OPCML F1:5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3'nucs34-53

OPCML R1:5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3'nucs1110-1091

1077bpのPCR産物を増幅させた。次いでOBCAM挿入体を、NotIで切除し、NotIで消化したpcDNA3.1Zeo(ゼオマイシン耐性)哺乳動物発現ベクター(Invitrogen)に、センスおよびアンチセンス方向に再度サブクローニングした。次いで挿入配列を、トランスフェクションで使用する前に確認した。OBCAMのセンスおよびアンチセンス構築体に対応するプラスミドDNA、および親ベクターを、標準的な方法(QIAGEN)によって作製し、PvuIで消化した。

【0285】

1 μ gおよび2 μ gのPvuI-線状構築体およびベクターを、ネオマイシン標識したSKOV3クローン誘導体細胞株、SKNV3.3にトランスフェクトした。

【0286】

細胞株は、熱失活させた10%ウシ胎児血清(FCS)、およびペニシリン(100単位/ml)ストレプトマイシン(100 μ g/ml)、およびG418およびZeocin(Invitrogen)を含む、RPMI1640中に、適切に保った。

【0287】

10

20

30

40

50

2×10^5 個のSKNV3.3細胞を、60mm皿当たり4mlの培地にまいた。24時間後50%の集合状態になったとき、これらの細胞を、製造者のプロトコルに従いLIPOFECTIN Reagent(Life Technologies GIBCO BRL)を使用し、 $2 \mu\text{g}$ の線状構築体:OBCAMセンスまたはアンチセンスpcDNA3.1zeo構築体、または挿入体を含まないpcDNA3.1zeoベクターを用いて、別々にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、それぞれのプレートの細胞を1:6に分け、次いで $250 \mu\text{g/ml}$ のゼオシンを用いてトランスフェクトした細胞を選択した。第3週に、コロニーを24ウェルプレートに拾い集め、クローン細胞株を確立した。

【0288】

OBCAMはin vitroでの増殖を抑制する:

OBCAMのSKNV3.3細胞へのトランスフェクションによって、in vitroのSKNV3.3対照細胞と比較して、抑制された増殖がもたらされる(図は示さず)。

10

【0289】

OBCAMは腫瘍増殖、およびin vivoでの広がりを抑制する:

対数期のSKNV3.3対照およびOBCAMトランスフェクト細胞を採取し、 5×10^6 個の細胞をヌードマウスの脇腹に腹膜内(i.p.)または皮下(s.c.)注射し、細胞株当たり6回のs.c.および3回のi.p.注射を行った。s.c.腫瘍の大きさの測定は、4週間の間週1回行った。i.p.注射によって細胞を与えたマウスを、注射後65日に殺傷し、腹腔から腫瘍を除去し、重量を測定し、写真を撮った。

【0290】

OBCAMのSKNV3.3へのトランスフェクションによって、OBCAM「センス」発現構築体(センストランスフェクタント)でトランスフェクトしたSKNV3.3細胞、および対照SKNV3.3細胞(対照)と比較して、著しく抑制された皮下の腫瘍増殖がもたらされる(図14)。

20

【0291】

OBCAMのSKNV3.3へのトランスフェクションによって、SKNV3.3親細胞に関して観察される腫瘍の増殖およびi.p.による広がりと比較して、腫瘍の増殖および腹膜内での広がりがほぼ完全になくなる(図21;実施例8を参照のこと)。

【0292】

OBCAMのトランスフェクションによって、細胞凝集が増大する:

対数期のSKNV3.3対照およびOBCAMトランスフェクト細胞をトリプシン処理し、10%FCSを含む培地に再懸濁させた。 1×10^6 個の細胞を1mlの培地に再懸濁させ、21ゲージニードルに通して、単細胞懸濁液の作製を確実に行った。次いで細胞懸濁液を、5%CO₂中において37でインキュベートした。明確な時間地点で、等分試料を広口ピペットによって除去し、単細胞を血球計で計数した。

30

【0293】

OBCAMのSKNV3.3(センス発現構築体)へのトランスフェクションによって、対照SKNV3.3細胞に関して観察されるものと比較して、高い細胞の凝集率がもたらされる(図15)。OBCAMアンチセンス発現構築体のトランスフェクションによって、親SKNV3.3と比較して、低い細胞の凝集率がもたらされる。

【実施例4】

【0294】

40

ヒトOBCAM遺伝子のエクソン構造

ヒトOBCAM遺伝子のエクソン構造を、生物情報分析で決定した。ヒトOBCAMのmRNAの参照配列NM_002545.2を、BLAST2相同性検索を使用して、GenBank HTGSデータベースの入手可能なHuman Genome Projectの配列と比較した。この比較によって、OBCAMが少なくとも7つのエクソンからなることが確認された。イントロン-エクソン境界の位置によって導かれるエクソン構造を、図16A~Dに示す。エクソン配列を黄色で強調し、エクソン側面のイントロン配列は単なる文字中にある。ヌクレオチド番号は、(その受託番号が与えられている)GenBankのデータベース配列に対応するものに関するものである。エクソン1のヌクレオチド配列は、GenBank受託番号AC027631.4の入手可能なHuman Genome Projectの配列が欠けているために、エクソン/イントロン1境界を含む領域内では不完全である。

50

【実施例 5】

【0295】

一本鎖の立体配座の多型性に関する電気泳動(SSCPE)による、OBCAMの変異の検出
 ヒトOBCAM遺伝子の構造の生物情報分析による予測の次に、OBCAM遺伝子の7つの同定した
 エクソンを増幅させるための、プライマーを設計した。Exon2は、SSCPE分析に有用なPCR
 産物の大きさに制限があるために、2つの重複プライマー組を用いて分析した。SSCPE分析
 において使用したDNAサンプルは、卵巣腫瘍および適合性のある正常組織をパラフィン包
 埋した収容型卵巣腫瘍、および卵巣癌細胞株から抽出した。

【0296】

使用したOBCAMエクソン特異的プライマーは、以下のものであった。PCR産物の大きさは、
 括弧内に与える。 10

【0297】

図16A～Dでは、SSCPEのセンスおよびアンチセンスプライマーの位置は、それぞれ一本
 および二本の下線で強調している。イントロンおよびエクソン配列は、それぞれ強調して
 いないか、あるいは太字で強調している。

【0298】

エクソン1(188bp)

OBCAMEX1F3:5'-GACCAGGACTGTGCGGCTGC-3'

nucs54514-54533AC027631.4

OPCML R3:5'-CGTCACGTTGTCCATAGCTT-3'

nucs:188-169NM_002545.2 20

【0299】

エクソン2/1(175bp):(GenBank AC012234.6からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX2F1:5'-CACCACTCCCTGCCTCACTG-3'

nucs75226-75245

OBCAMEX2R1:5'-CATCCACATTTTGGATCATG-3'

nucs75400-75381

【0300】

エクソン2/2(180bp):(GenBank AC012234.6からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX2F2:5'-ATAGACCCTCGTGTGATCAT-3'

nucs75331-75350 30

OBCAMEX2R2:5'-TGGCAACCCCAGATCCAGCT-3'

nucs75510-75491

【0301】

エクソン3(179bp):(GenBank AP000843.3からのヌクレオチド番号)

OBCAMEMF1:5'-CAGGTATTTCTTCTATCCTG-3'

nucs37032-37051

OBCAMEX3R1:5'-GTCCTCCAGGTCAGCACCTT-3'

nucs37210-37191

【0302】

エクソン4(214bp):(GenBank AP000843.3からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX4F1:5'-TGGTTACACAGTTTCCTGAT-3'

nucs2881-2900 40

OBCAMEX4R1:5'-AGAACCCCCTGGCTGCAGGT-3'

nucs3094-3075

【0303】

エクソン5(195bp):(GenBank AP000843.3からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX5F1:5'-GTGCGTGCATGCCTGTGCAT-3'

nucs3466-3485

OBCAMEX5R1:5'-CAGAACTGTCCAGGTGTCAT-3'

50

nucs3660-3641

【0304】

エクソン6(198bp):(GenBank AP000843.3からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX6F1:5'-TAGCAATGTCTTCCCTCTTG-3'

nucs4028-4047

OBCAMEX6R1:5'-GCATCCAGGCTTCCAGCACT-3'

nucs4225-4206

【0305】

エクソン7(176bp):(GenBank AP000843.3からのヌクレオチド番号)

OBCAMEX7F1:5'-TCCTTGGGTGTATGCTAATG-3'

nucs19945-19964

OBCAMEX7R1:5'-GCGTTGCTCAGAGGACCTAG-3'

nucs20120-20101

【0306】

それぞれのOBCAMエクソンに関するSSCPEは、卵巣癌と適合性がある正常/腫瘍DNA、腫瘍DNAおよび細胞株に行った。OBCAMに関して観察される高度のLOH、およびCpGアイランドのメチル化が保たれる際には、予想される体細胞変異の頻度は低い。SSCPEおよび塩基配列決定によって検出されてきている、体細胞のミスセンス変異は以下に記載する。

【0307】

PEO卵巣癌細胞株系中の体細胞OBCAM変異

OBCAMエクソン2F1/R1のPCR産物のSSCPEによって、疾患の過程中的卵巣癌患者に由来する一連の細胞株からのDNAの、「バンド移動」を確認した。PE01は、疾患の過程初期の患者に由来する、プラチナ感受性卵巣癌細胞株である。プラチナ耐性細胞株PE04は、シスプラチン化学療法後の再発時の同じ患者に由来するものであった。細胞株PE01CDDPは、in-vitroでのシスプラチン暴露によりPE01に由来するものであり、プラチナ耐性であるin-vitroモデルである。正常なDNAである線維芽細胞DNAを、同じ患者から単離し、PE04細胞株を確立した(PE04線維芽細胞)。

【0308】

PE01、PE01CDDP、PE04およびPE04線維芽細胞から増幅させたエクソン2F1/R1のPCR産物を、最初のPCRで使用したのと同じプライマーを用いて、塩基配列決定した。配列追跡ファイル(図17)によって、PE01、PE01CDDP、およびPE04からのPCR産物中で、位置334(GenBank受託番号NM_002545、図7に示す)のCおよびGヌクレオチドの存在に対応する、異型接合性のピーク値が明らかに示される。PE04線維芽細胞からのPCR産物中で、位置334(NM_002545)は、Cが同型である(*によって印される)。野生型配列(NM_002545参照ヌクレオチド配列)は、この位置にC残基を含み、CCAコドンがCGAに変わっている。この位置を含むヌクレオチド配列の翻訳(ExPasyを使用する)によって、対応する野生型アミノ酸プロリン(P)がアルギニン(R)に変わり、これが未熟なOBCAMタンパク質配列のアミノ酸残基95に対応することが予想される(図18)。この残基は、OBCAMの第1の免疫グロブリンドメイン中に位置すると考えられる(図7およびGenBank受託番号NP_002536)。

【0309】

PE04線維芽細胞は、同型の野生型(プロリン)であり、一方PE01、PE01CDDP、およびPE04は、異型の野生型/ミスセンス変異体(プロリン/アルギニン)である。この位置でアルギニン残基をプロリンに置換することによって、変化したOBCAM構造の立体配座、したがって変化したOBCAM機能も、もたらされる可能性がある。

【0310】

この患者の疾患の時間工程中に由来するすべての細胞株が、このミスセンス変異体を含むので、この変異はそれらの疾患過程の初期事象であったと、我々は要約することができる。正常DNAに対応するPE04線維芽細胞は野生型であるので、この変化は体細胞の事象である。

【0311】

10

20

30

40

50

これは、卵巣癌を含めた癌のOBCAMに関して同定された、最初の体細胞変異である。

【実施例6】

【0312】

OBCAMは正常なヒト卵巣中では非メチル化状態である

我々は、5つの正常なヒト卵巣切片から、DNAおよびRNAを抽出した。これらの切片のOBCAMのMS-PCRによって、OBCAMのCpGアイランドが非メチル化状態であることが示される。600bpの増幅させたMS-PCR産物は、58のCpGを含む。これらの正常な卵巣からのOBCAMの、MS-PCR産物全体の塩基配列決定によって、産物中にメチル化したCpGの証拠は示されなかった。

【0313】

対照的に、MS-PCRアッセイにおいてメチル化状態である卵巣癌細胞株および原発性腫瘍からの、MS-PCR産物塩基配列決定によって、増幅させたCpGアイランドの領域全体の、広範囲のメチル化が示される。

【実施例7】

【0314】

OBCAMのCpGアイランドは、卵巣腫瘍中ではメチル化状態であり、正常な卵巣中では非メチル化状態である。

2例の卵巣腫瘍から、および2例の正常な卵巣からのDNAを、重亜硫酸塩処理によって化学的に改変させた。次いで、メチル化(M)と非メチル化(U)OBCAMのCpGアイランドの重亜硫酸塩で改変されたDNAを区別するために設計したプライマーを用いて、メチル化特異的PCRを行った。529bpのメチル化または非メチル化状態の特異的なPCR産物を、前に詳しく述べたプライマーを使用して、それぞれ卵巣腫瘍または正常な卵巣のDNAから特異的に増幅させた(OBCAMのCpGアイランドの塩基配列決定)。増幅させたPCR産物は、図19のヌクレオチド25-553に対応する(OBCAMのCpGアイランドの重亜硫酸塩による塩基配列決定)。次いでPCR産物をpGEM-T Easyにサブクローニングし、次いで個々の対立遺伝子を表す個々のサブクローンを塩基配列決定し、CpGにおけるメチル化Cヌクレオチドの有無を記録した。図20は、卵巣腫瘍および正常な卵巣の例中に存在する、メチル化したCpGのCの程度を表す。ヌクレオチド番号は、図19に示すCpGのCの位置であり、CpG番号は、塩基配列決定した526bpのOBCAMのCpGアイランド中に位置するCpGの配列番号である。2例の卵巣腫瘍それぞれに関する6つの対立遺伝子、および正常な卵巣の例それぞれに関する2つの対立遺伝子の、塩基配列決定の結果を示す。黒く塗りつぶした四角はメチル化状態のCpGを表し、空白の四角は非メチル化状態のCpGを表し、縦方向の線を含む四角は、CpGのメチル化状態が決定されなかった場合を表す。図20は、CpGアイランドが卵巣腫瘍中では広範囲でメチル化状態であり、正常な卵巣中では非メチル化状態であることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0315】

【図1】物理的な位置に従って編成した、NTMおよびOBCAM遺伝子を含む11q25領域のBAC近辺の地図である。関連マイクロサテライトマーカの相対的な位置を示す。目盛り付けはしていない。

【図2】Barx2領域(領域2)を示す染色体11q24-q25上の離れたLOH領域と、OBCAM/NTM領域(領域5)の関係を示す図である。

【図3】卵巣癌および結腸直腸癌の動原体からテロメアの、図2に関するマイクロサテライトマーカのLOH率を示す図である。

【図4】マーカをどのように記録したかを示し、それぞれのマーカの情報を与える例の数のパーセンテージとして、LOHに関する例の数を述べる図である。66%(43/65)の卵巣腫瘍、および69%(27/39)の結腸直腸腫瘍が、11q24-q25領域内で少なくとも1つの遺伝子座に関するLOHを有していた。それぞれの群の8つの腫瘍が、情報を与えるすべての遺伝子座においてLOHを有していた。

【図5】D11S4085のLOHの例、血液中の2つの対立遺伝子が保持されている2例、および卵巣癌組織中の対立遺伝子の完全な消失を示す図である。D11S4085におけるLOHの概略のこの例は、側面のマイクロサテライトマーカ-D11S874(動原体)およびD11S969(テロメア)

10

20

30

40

50

において、異型接合性が保持されていることを示す。PCR(蛍光染料で標識したそれぞれのマーカーに関して、1つのプライマーを用いる)によって、卵巣癌を有する2人の患者からの正常(N)および腫瘍(T)DNAから、マーカーを増幅させた。PCR産物(蛍光標識したものを)、ABI1310 Genetic Analyzer上で大きさによって分離し、レーザーおよびデータによって検出し、ABI GeneScanソフトウェアで分析した。ピーク値は、2人の患者、患者1および患者2の正常および腫瘍DNA中の、それぞれのマーカーに関する対立遺伝子の型を表す。それぞれの患者の、NとTの間のD11S4085に関する対立遺伝子の型を比較することによって、正常なDNA中に存在する2つの対立遺伝子(異型接合性)が示されるが、一方で腫瘍DNA中にはただ1つの対立遺伝子が存在し、異型接合性の消失が起こったことが示される。いずれの例でも、対立遺伝子の消失は完全なものであり、腫瘍サンプル中での異型接合性の欠如が示される。これによって、D11S4085の消失は、卵巣癌の発癌の初期事象であることが示唆される。対照的に、2つの側面のマーカーの異型である対立遺伝子の型は、2人の患者それぞれの正常と腫瘍の間で変わらず、異型接合性の保持が表される。

10

【図6】OBCAMおよびニューロトリミンに関してメチル化状態を示す、卵巣癌の13の症例の代表的サンプル、および個体中およびサンプル全体の、一致率および不一致率を示す図である。M=メチル化 U=非メチル化 C=一致 D=不一致

【図7】ヒトOBCAMのcDNAのヌクレオチド配列、およびコードされているアミノ酸配列を示す図である。この配列は、GenBankのデータベース項目番号NM_002545に対応する。

【図8】ヒトニューロトリミン(NTM)のcDNAのヌクレオチド配列、およびコードされているアミノ酸配列を示す図である。この配列は、GenBankのデータベース項目番号NM_016522

20

【図9A】NTMイソ型の配列を示す図である。正常なヒト卵巣表面上皮の主要な形は、+33bp形(約69%)である。+69bp形は、約4%を形成するデータベースの野生型配列と比較した、少数のイソ型である(約19%)他の代替的な形である。他の少数のイソ型は、他の108bpを含み、これが未熟なタンパク質の翻訳停止をもたらし、切断型NTMタンパク質イソ型を生成させると予想される。+33bp形は、33bpの挿入ヌクレオチド配列を含み、これはNTM遺伝子中の1つの他のエクソンに由来する。このエクソンは、69bpの挿入に貢献する(以下参照)、2つのエクソンのうちの1つである。示すのは、ヒトニューロトリミンの卵巣表面上皮の+33bpイソ型の、タンパク質が翻訳された(ヌクレオチド配列の下)ヌクレオチド配列である。他の33bpのヌクレオチド配列、および生成するインフレームの11個のアミノ酸を、野生型ヒトNTM配列(Genbank NM_015622)の脈絡において太字下線で示す。停止コドンは*によって示す。インフレーム挿入によって、NTMタンパク質:EVKTTALTPWKのC末端の近くに、他の11個のアミノ酸が含まれる結果となる。+69bp形は、69bpの挿入ヌクレオチド配列を含み、これはNTM遺伝子中の2つの他のエクソンのスプライシングに由来する。示すのは、ヒトNTMの卵巣表面上皮の+69bpイソ型の、タンパク質が翻訳された(ヌクレオチド配列の下)ヌクレオチド配列である。他の69bpのヌクレオチド配列、および生成するインフレームの23個のアミノ酸を、野生型ヒトNTM配列(Genbank NM_015622)の脈絡において太字下線で示す。停止コドンは*によって示す。インフレーム挿入によって、NTMタンパク質:ELNEP

30

TSSTLLQEVKTTALTPWKのC末端の近くに、他の23個のアミノ酸が含まれる結果となる。+108bp形は、108bpの挿入ヌクレオチド配列を含み、これはNTM遺伝子中の3つの他のエクソンのスプライシングに由来する。示すのは、ヒトNTMの卵巣表面上皮の+108bpイソ型の、タンパク質が翻訳された(ヌクレオチド配列の下)ヌクレオチド配列である。他の108bpのヌクレオチド配列は、未熟なタンパク質の翻訳停止をもたらし、カルボキシ末端にGPIアンカー結合部位が欠けている、切断型NTMタンパク質イソ型を生成させると予想される。したがって切断型タンパク質は、GPIアンカーを介して細胞膜に結合することはないと予想される。したがってこのイソ型は、可溶性のNTMを表すことができ、これは細胞外に位置する可能性があり、おそらくGPI結合型NTMの正常な機能を害するか調節する可能性がある。他の108bpのヌクレオチド配列、およびタンパク質翻訳は、野生型ヒトNTM配列(Genbank NM_015622)の脈絡において太字下線で示す。停止コドンは*によって示す。

40

【図9B】図9Aの続きである。

50

【図9C】図9Bの続きである。

【図10】IgLONが正常な卵巣中で高度に発現されることを示す図である。多数の組織のcDNA群(BD Clontech)の、OBCAMおよびNTMの完全長コード配列のRT-PCR、さらにICRF Medical Oncology Unit、Edinburgh、UKにおいて調製された正常な卵巣サンプル。脳中、および内輪で調製した(すなわちClontechのcDNA群ではない)正常な卵巣サンプルにおいて、両方の遺伝子の最も強い発現が観察される。プライマー配列: OBCAM: OPCML F1:5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3' 20'mer nucs34-53 OPCML R1:5'-TCAGAGGACCTAGGATTTCT-3' 20'mer nucs1110-1091 NM_002545から付番したOBCAMヌクレオチド NTM: NTM F2:5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3' nucs248-267 NTM R1:5'-AGAGGTTGCACGATGCAGCT-3' nucs1600-1581 NM_016522から付番したNTMヌクレオチド

10

【図11】IgLONの再発現を示す図である。MDAMB23.1およびT47D癌細胞株を、アザシチジンの存在(+)または不在(-)下において4日間、さらにTSA(Aza/TSA)で4日間培養した。OBCAMおよびNTMのRT-PCRによって、MDAMB23.1細胞株中でのOBCAMの再発現、およびMDAMB23.1およびT47D細胞株中でのNTMの再発現が示される。逆転写酵素から対照を引いたものが含まれる。NTMのRT-PCRによって、多数のニューロトリミンイソ型の再発現が示される。使用したプライマーは以下のものであった: OBCAM: OPCML F4:5'-TACCATAGATGACCGGGTAA-3'nucs:221-240 OPCML R6:5'-TTCCGCACATCGGGCGCAGC-3'nucs:694-675 NM_002545から付番したOBCAMヌクレオチド NTM: NTM F3:5'-ACATGACTATGGGAACAACA-3'nucs1125-1144 NTM R2:5'-GGAAGTGGCACTCACATCAA-3'nucs1315-1296 NM_016522から付番したNTMヌクレオチド

20

【図12A】OBCAMおよびNTM遺伝子のメチル化の検出において有用な、代表的なプライマーを示す図である。

【図12B】図12Aの続きである。

【図13】5'-アザ2'-デオキシチジン(AZA)への暴露の後の、SKNV3.3細胞中のOBCAMの脱メチル化および再発現を示す図である。CONは、対照の未処理SKNV3.3細胞である。Mixは、鋳型DNA以外のすべての成分を含む、対照のPCR反応混合物である。上側パネル:20μMの5'-アザ2'-デオキシチジンの存在(AZA)または不在(CON)で培養4日後に、SKNV3.3細胞から調製した一本鎖cDNAのOBCAM RT-PCR。Mixは、鋳型DNA以外のすべての反応成分を含む、対照のPCR反応混合物を指す。次いでOBCAMのPCR産物を、ナイロン膜上に移し、OBCAMプローブとハイブリダイズさせた。OBCAMの発現は、AZAへの暴露の後に明らかに認められるが、対照の細胞中には不在である。下側パネル:サンプルの完全性のための対照としての、小さな細胞株の一本鎖cDNAのアクチンRT-PCR。アクチンの発現は、処理および未処理SKNV3.3細胞で同等である。

30

【図14】OBCAMのSKNV3.3細胞へのトランスフェクションによって、ヌードマウスの皮下の腫瘍増殖が抑制されることを示す図である。OBCAMセンストランスフェクトおよび対照SKNV3.3細胞の皮下注射の後の、ヌードマウスの腫瘍の平均腫瘍体積(cm³)のグラフ。腫瘍体積は、4週間の間、週に一度測定した。皮下の腫瘍増殖の違いは、統計的に有意である。

【図15】OBCAMのSKNV3.3細胞へのトランスフェクションによって、細胞の凝集が増大することを示す図である。血球計を用いて時間間隔で測定した、OBCAMセンストランスフェクション、OBCAMアンチセンストランスフェクション、および親SKNV3.3細胞の培養物中に残っている、単細胞の数のグラフ。OBCAMの発現によって、培養物中に残っている単細胞の数の減少がもたらされ、観察される高い細胞の凝集率が平衡化する。

40

【図16A】ヒトOBCAM遺伝子の、予想されるエクソン構造を示す図である。エクソン配列を太線で強調し、エクソン側面のイントロン配列は単なる文字中にある。ヌクレオチド番号は、以下のようにGenBankのデータベース配列に対応するものに関するものである。エクソン1はAC027631.4を指し;エクソン2はAC012234.6を指し;エクソン3~7はAP000843.3を指す。エクソン1のヌクレオチド配列は、GenBank受託番号AC027631.4の入手可能なHuman Genome Project Sequenceが欠けているために、エクソン/イントロン1境界を含む領域内では不完全である。SSCPEのセンスおよびアンチセンスPCRプライマーは、それぞれ一本

50

および二本の下線で強調する。予想されるエクソンの大きさを与える。

【図16B】図16Aの続きである。

【図16C】図16Bの続きである。

【図16D】図16Cの続きである。

【図17】PE04が、エクソン2のOBCAMの体細胞変異体を含むことを示す図である。塩基配列決定プライマーとしてOBCAMEX2F1を使用して得た、PE04およびPE04線維芽細胞のDNAからの、OBCAMエクソン2F1/R1SSCPEのPCR産物の配列追跡ファイル。PE04線維芽細胞は、印をつけた位置(*)でCヌクレオチドが同型であり、PE04はこの位置で異型であり、CおよびG対立遺伝子を有する。

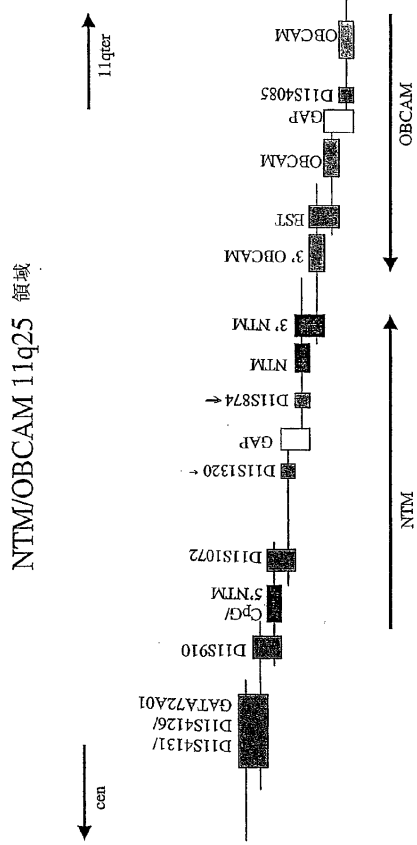
【図18】PE04が、OBCAMの体細胞ミスセンス変異体を含むことを示す図である。ヌクレオチド配列PE04OBCAMEX2F1/R1SSCPEPCR産物から同定した、2つの対立遺伝子のEx-Pasy翻訳によって、プロリン(P)からアルギニン(R)へのミスセンス変異が予想される。ヌクレオチド位置75365(AP000843.3)/334(NM_002545.2)での、cからgへの体細胞のヌクレオチドの変化によって、OBCAMの第1の免疫グロブリンドメイン内の位置95(未熟タンパク質の番号)での、アミノ酸の置換:アルギニン(R)からプロリン(P)がもたらされる。PE04線維芽細胞は、野生型プロリン対立遺伝子が同型であり、一方PE04(およびPE01およびPE01CDDP)は、野生型および変異配列が異型であり、野生型プロリンと体細胞アルギニンミスセンス変異体の両方を含む。野生型とは、GenBank配列中に含まれる参照配列を指す。野生型OBCAM、および体細胞変異体を含む配列のヌクレオチド配列を、それらのそれぞれのタンパク質翻訳(一文字のアミノ酸コード)の下にそれぞれ示す。影響を受けたヌクレオチドおよびアミノ酸を、太字で示す。野生型とは、GenBankデータベース(NM_002545.2およびAP000843.3)中に含まれる参照配列を指す。

【図19】OBCAMのCpGアイランドの重亜硫酸塩による塩基配列決定を示す図である。ヌクレオチド53134-54032(GenBank受託番号AC027631.4)に対応する、OBCAMの予想されるCpGアイランドのヌクレオチド配列を示す。重亜硫酸ナトリウムで改変させたメチル化(M)または非メチル化(U)DNAからの、529bpの産物を特異的に増幅させるために設計した、PCRプライマーの位置をイタリックで示し、それらの配列を以下で詳細に述べる。増幅させたPCR産物は太字で示し、周囲の配列は単なる文字中にある。CpGからのメチル化可能なCヌクレオチドは、下線で示す。プライマー: 重亜硫酸ナトリウムで改変させたメチル化DNAに特異的なもの: OBCAM F1M:5'-AGGCGTTTGTAGTGGAGGGGTACGGGC-3' OBCAM R3M:5'-TCCCGATACCG CCTCGAAACGAACG-3' 重亜硫酸ナトリウムで改変させた非メチル化DNAに特異的なもの: OBCAM F1U:5'-AGGTGTTTGTAGTGGAGGGGTATGGGT-3' OBCAM R3U:5'-TCCCAATACCACCTCAAAAACAAACA-3'

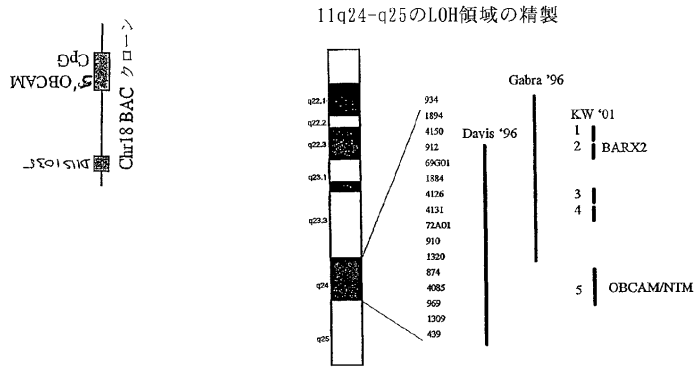
【図20】OBCAMのCpGアイランドが、卵巣腫瘍中ではメチル化状態であり、正常な卵巣中では非メチル化状態であることを示す図である。

【図21】SKNV3.3中でのOBCAMの発現によって、ヌードマウスの腫瘍形成がほぼ完全になくなることを示す図である。SKNV3.3親細胞株、および2例のOBCAMトランスフェクト再発現SKNV3.3細胞株を、ヌードマウスに腹腔内(i.p.)注射した。:マウス1匹あたりの1回の注射で、細胞株を3つ注射した。65日後、マウスを殺傷し、腹腔から腫瘍を除去し写真を撮った。i.p注射した腹腔に存在した腫瘍の合計量は、親SKNV3.3細胞と比較して、OBCAMトランスフェクトSKNV3.3細胞を注射したマウス中では大幅に少ない。この図は、3匹のSKNV3.3を注射したマウスから、およびOBCAMトランスフェクトSKNV3.3細胞を注射した5匹のマウス:3匹は1つのOBCAMトランスフェクト細胞株からのもの、および2匹は第2のOBCAMトランスフェクト細胞株からのものから除去した、すべての腫瘍を示す。第2のOBCAMトランスフェクトSKNV3.3細胞株を注射した第3のマウスでは、腫瘍は識別できなかった。OBCAMを発現する腫瘍の腹腔内での広がり、その後のOBCAMのトランスフェクションも、親SKNV3.3細胞(示さず)と比較して大幅に低下する。

【図1】



【図2】



【図3】

卵巣のLOH率

マーカー	分析数	情報数	LOH数	LOH率
D11S1894	58	44	11	25
D11S4150	54	50	18	34
D11S912	40	53	18	34
GATA69G01	44	24	9	33
D11S1884	54	26	9	35
D11S4126	63	30	11	37
GATA72A01	62	24	4	25
D11S4131	65	52	17	33
D11S910	59	38	10	26
D11S1320	40	39	11	28
D11S874	65	38	11	29
D11S4085	62	43	24	56

結腸直腸のLOH率

マーカー	分析数	情報数	LOH数	LOH率
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

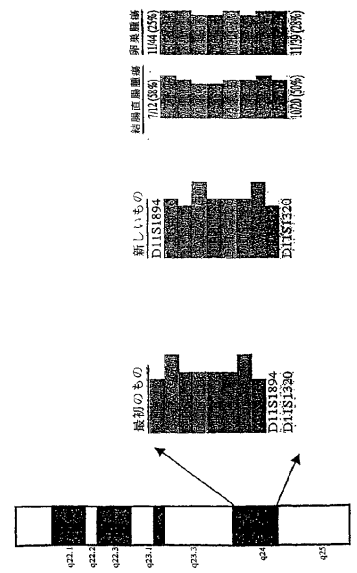
【図4】

結果

分子の分析

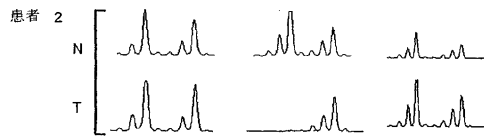
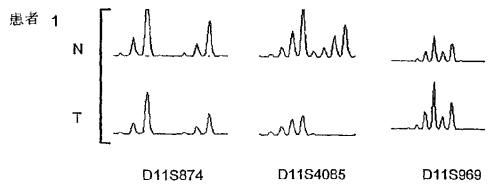
60% (43/65) の卵巣腫瘍、および58% (27/39) の結腸直腸腫瘍が、11q24領域内で少なくとも1つの遺伝子座にLOHを有していた。それぞれの腫瘍が、情報を与えるすべての遺伝子座においてLOHを有していた。

以下の図は、マーカーをどのように記録したかを示し、それぞれのマーカーの情報を与える例のバーセントーンズとして、LOHに関する例の数を述べる。



【 図 5 】

D11S4085における完全なLOHは、
異型接合性の保持と隣り合わせである。



【 図 6 】

症例	ニューロトロミン	OBCAM	全体
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
全体	8/11=73%	11/13=85%	9/11=82%

全体的なメチル化率=11/13=85%
M=メチル化
L=非メチル化

【 図 9 A 】

翻訳されたNTMのイソ型

+33bp イソ型

```

atgggggtctgtgggtacctgtctctgccctggaagtgcctcgtggctgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgtctctgtaccacaggagtgcctgtgcgcaggagatgccaccttcccacaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
gctatggacaacgtgacggtccggcaggggagagcgcacctcaagtgacctatgac
A M D N V T V R Q G E S A T L L R C T I D
aaccgggtcacccgggtggcctggcclaaaccgcagcacctctctatgctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
aagtggtgctggatctcctggctgtctctctgagaaacccaaagcagctacagcaatc
K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
ggatccagaacgtggatgtgatgagggcccttacacctgctcggtcagacagac
E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
aaccaccaaagacctcagggtccacctcattgtgcaagtctcccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
atctctcagatctccattaatgagggaacaattatagctcactcactgcatageaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagcctcaggctacttgagacacatctcccacaaaggctggctgtgtgtg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G P V
agtgaagcgaatacttggaaatcagggatcaccocggaaacagtcaggggactcagag
S E D B Y L H I Q G I T R E Q S G D Y R
tgcaagtgcctccaatgacgtggcgcgcctggatargagagataaaggtcacogtgaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccaccatacattcagaagcgaagggtcagggtccocctgggacaaaggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcaagtgtgaacctcagcagctccocctcagcagaattccogtggtaacaggatgacaa
L Q C R A S A V P S A E F Q W Y K D D K
agactgatgaagaaagaagggtgaagtggaacacagccttctctcaaacctc
R L I E G K K G V K V E N R P P L S K L
atctctcagctctcgaactgagctacactacactctgctggcctccaacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggacacccaatccagcactcagctatttgaactaaatgagcctagagctcaact
L G H T N A S I M L F E L N E P T S S T
tggaaaggctcagggcctcagcaggtgagcaacggcagctcggaggaggcaggtgc
W K G P G A V S E V S N G T S R A G C
gctggctgtgctctctgtctcagcctgtctctcaatttga
V W L L P L L V L H L L L K F *

```

【 図 9 B 】

+69bp イソ型

```

atgggggtctgtgggtacctgtctctgccctggaagtgcctcgtggctgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgtctctgtaccacaggagtgcctgtgcgcaggagatgccaccttcccacaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
gctatggacaacgtgacggtccggcaggggagagcgcacctcaagtgacctatgac
A M D N V T V R Q G E S A T L L R C T I D
aaccgggtcacccgggtggcctggcclaaaccgcagcacctctctatgctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
aagtggtgctggatctcctggctgtctctctgagaaacccaaagcagctacagcaatc
K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
ggatccagaacgtggatgtgatgagggcccttacacctgctcggtcagacagac
E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
aaccaccaaagacctcagggtccacctcattgtgcaagtctcccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
atctctcagatctccattaatgagggaacaattatagctcactcactgcatageaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagcctcaggctacttgagacacatctcccacaaaggctggctgtgtgtg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G P V
agtgaagcgaatacttggaaatcagggatcaccocggaaacagtcaggggactcagag
S E D B Y L H I Q G I T R E Q S G D Y R
tgcaagtgcctccaatgacgtggcgcgcctggatargagagataaaggtcacogtgaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccaccatacattcagaagcgaagggtcagggtccocctgggacaaaggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcaagtgtgaacctcagcagctccocctcagcagaattccogtggtaacaggatgacaa
L Q C R A S A V P S A E F Q W Y K D D K
agactgatgaagaaagaagggtgaagtggaacacagccttctctcaaacctc
R L I E G K K G V K V E N R P P L S K L
atctctcagctctcgaactgagctacactacactctgctggcctccaacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggacacccaatccagcactcagctatttgaactaaatgagcctagagctcaact
L G H T N A S I M L F E L N E P T S S T
tggaaaggctcagggcctcagcaggtgagcaacggcagctcggaggaggcaggtgc
W K G P G A V S E V S N G T S R A G C
gctggctgtgctctctgtctcagcctgtctctcaatttga
V W L L P L L V L H L L L K F *

```

【 図 9 C 】

+108bp イノ型

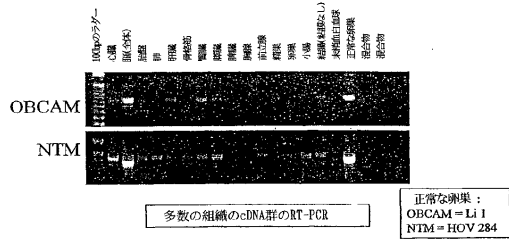
```

atgggggtctgtgggtaactgttctgcccctggaagtgcctggtggtctctcagc
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgttccctgtaccaccaggagtcctgctgcaaggagatgccacctccccaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T P P K
gctatggaacacgtgacgctccggcaggggagagcgcacctcaagtgcaattgac
A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
aacgggtcaaccgggtggctggctaaaccggaaccacctctctagctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T T L Y A G N D
aagtggctccgggtctgctggtctctctgagcaaccaccaccaccaccaccaccac
K W C L D P R V Y L L S N T Q T O Y S I
gagatccagaagctggtatgtatgacgagggcccttaacctgctggtggaacagac
B I Q N V D V Y D E G P Y T C S V O T D
aacaccaccagacctaggtccacctctgtggaagtatccccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
attctctcagatctcctcaatgaagggaaacatattagctccacctgcatagcaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagacagagcctacgggttaactgggagacacactctccccaaaggcttggcttgtg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
agtgaagagaactctggaaattcagggtctcaaccggggacagctcaggggactcagag
S E D Y L E I O G T T R E Q S D Y E
tgcaagctcccaatgacgtgcccggccctggtagcggagatcaagctcaccgtgaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tateccaccatattcagaagccagggtacaggtgtcccggtgggacaagaagggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcaagctggaagcctcagcagctccctcagcagaatctccagtggtacaagagtgacaaa
L Q C B A S A V P S A E F Q W Y K D D K
ngactgtgaagaaaggggtgaaagtggaagacagaccttctctcaaaactc
P T L B G F X G Y K V B N P P L S K L
atcttctcaatgctctggaacagactatgggaactacactgtggtggtcccaaacag
I F P N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggccacacaaatgacagatcatgctattttgggtcctcaagctgacttgggaa
L G H T N A S I M L P * W L L S * L W E
tcataatggtaactaaatgagctcagcagcaactttgttggcaagtgaaactaca
S * L B L M B P T S S T L L Q B Y K T T
gcoctgaccccttggaaggctcaggcccgctcagcagggtgagcaaggcagctgaggg
A L T P W K G P G A V S E V S N G T S R
aggcagctgctgctgctgctctctctggtctgcaactgctcaaatgtga
R A G C V W L L P L L V L H L L K F *

```

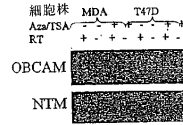
【 図 1 0 】

IgLONは正常な卵巣中で高度に発現される



【 図 1 1 】

IgLONの再発現



- 細胞株 : MDAMB23.1, T47D.
- アザシチジンおよびトリコスタチンA
- OBCAMおよびNTMの再発現によって、転写の後発的調節が確認される

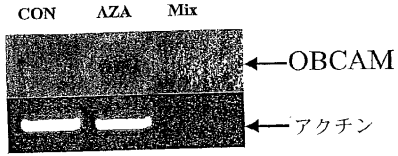
【 図 1 2 A 】

プライマー組	セクシープライマー	7'セクシープライマー	大きさ	最初のゲノム位置	最後のゲノム位置
OBCAM1-W	AGGGCTCCAGTGGAGGGGCA GGGGC	CATCGGGGTG CAATCGGGTCCCGG	135	23	160
OBCAM1-M	AGCGCTTTAGTGGAGGGGTA GGGGC	CATCGGGTCA CAATCGGGTCCCGG	135	25	160
OBCAM1-U	AGGCTTTTAGTGGAGGGGTA TGGGT	CATCGGGTCA CAATCGGGTCCCGG	135	25	160
OBCAM2-W	CAGCGGATG GACAGCAC CC	AAACCGGGGC CCCTCCAGC G	229	151	380
OBCAM2-M	TAGCGCGATGGATAGCTATATC	AAACCGGAGC CCCTCCAGC G	229	151	380
OBCAM2-U	TAGCTTTGATG CATATGATATA TT	AAACCGGAGC CCCTCCAGC G	229	151	380
OBCAM3-W	CAACTTCTGC GGTGGCATCG GC	AAACCGGGGC CCCTCCAGC G	154	226	380
OBCAM3-M	TATTTTITGG GTTGGATATG GC	AAACCGGAGC CCCTCCAGC G	154	226	380
OBCAM3-U	TATTTTITGG GTTGGATATG GC	AAACCGGAGC CCCTCCAGC G	154	226	380
OBCAM4-W	GGCGCGCTTT CTCTCGGCTG GGCC	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	182	371	553
OBCAM4-M	GGCGCGCTTT CTCTCGGCTG GGCC	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	182	371	553
OBCAM4-U	GTGTGTTTGT TTTTITGTTG GTGT	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	182	371	553
OBCAM5-W	GGGGGGTCCG GGTCTATCCC C	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	134	419	553
OBCAM5-M	GGGGGGTCCG GGTCTATCCC C	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	134	419	553
OBCAM5-U	GTGTGTGTGT GTTATTTT TT	TCCCGGTCCG GCTCCGAGC GAGCG	134	419	553

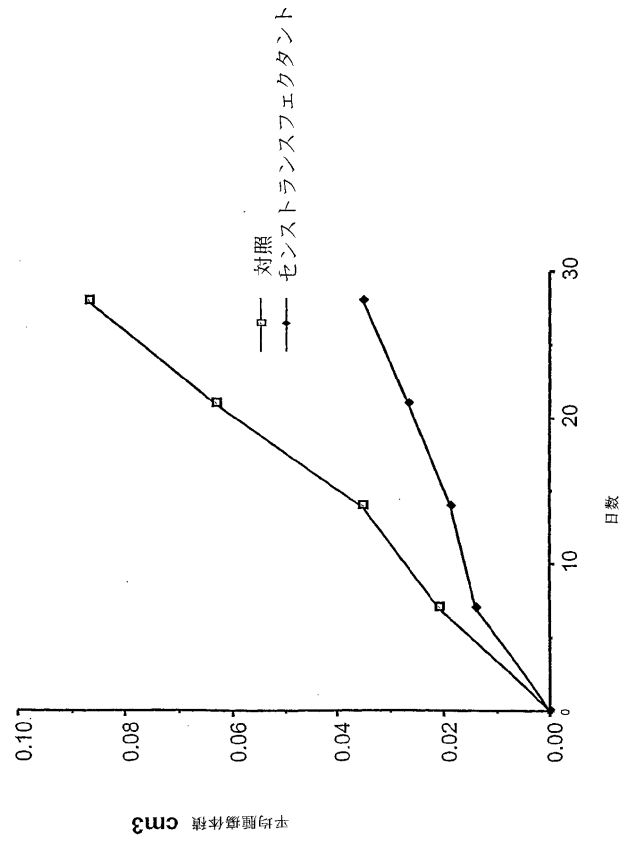
【 図 1 2 B 】

プライマー組	セクシープライマー	7'セクシープライマー	大きさ	最初のゲノム位置	最後のゲノム位置
NTM1-W	CTCTCGCTGC GGTCTATCCC GC	TGGCAGCAGC TCGATCCCTG ACAG	160	30	190
NTM1-M	TATAGTTTGG GTTGGTGTG GT	TAACAACAAC TCGATCCCTA ACCA	160	30	190
NTM1-U	TATAGTTTGG GTTGGTGTG GT	TAACAACAAC TCGATCCCTA ACCA	160	30	190
NTM2-W	CACAGCCTGG GCCCGGGGGG GC	AGGGAGGGGG GGGGGTGGGG GGG	111	30	141
NTM2-M	TATAGTTTGG GTTGGTGTG GT	AGGGAGGGGG GGGGGTGGGG GGG	111	30	141
NTM2-U	TATAGTTTGG GTTGGTGTG GT	AGGGAGGGGG GGGGGTGGGG GGG	111	30	141
NTM3-W	GGCCCTGAG CTTGGCTCCG GC	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	121	265	386
NTM3-M	GGCTTGTGG GTTGGTGTG GT	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	121	265	386
NTM3-U	GGCTTGTGG GTTGGTGTG GT	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	121	265	386
NTM4-W	AGCGAGCTACCGAGGTTGGGGCCGGC	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	65	321	386
NTM4-M	AGCGAGCTACCGAGGTTGGGGCCGGC	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	65	321	386
NTM4-U	AGCGAGCTACCGAGGTTGGGGCCGGC	TGGCGGAGGA GGGAGAGGCC GAGCG	65	321	386
NTM5-W	AGACTCGGAG GAGTCTGGCC	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	151	925	1076
NTM5-M	AGACTCGGAG GAGTCTGGCC	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	151	925	1076
NTM5-U	AGACTCGGAG GAGTCTGGCC	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	151	925	1076
NTM6-W	TCCCGGGCCG TCCGGTTCGC GGC	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	121	955	1076
NTM6-M	TITTTGGTTTGTGGTGTGTGT	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	121	955	1076
NTM6-U	TITTTGGTTTGTGGTGTGTGT	ACTTCCCGGA ACTCCGGCAG CCG	121	955	1076

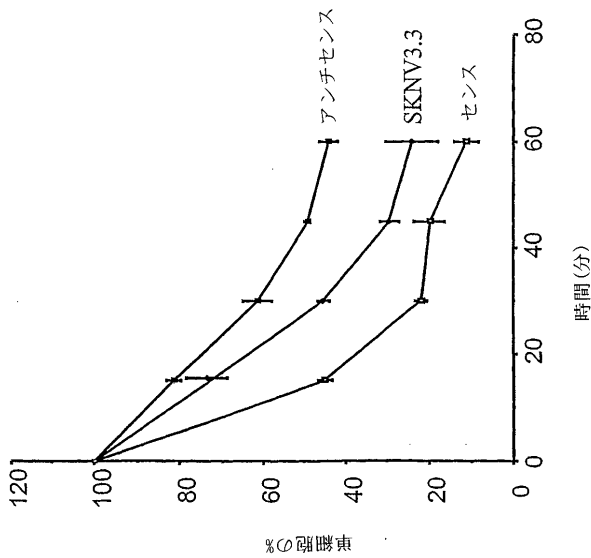
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 A 】

Figure 16 (page 1 of 4)

エクソン 1 (コード配列) AC027631.4: 166bp

Exon 1 (Coding Sequence) AC027631.4: 166bp

```

54481 cgcttccoga gcccgctggt gcgcgggcg gggaccagg actgtggcg tgcgggagtc
54541 ctgggaagtt gtgctgtcg agaattgggg tctgtggta cctgttctg cctggaagt
54601 gccctgtggt cgtgtctctc aggtgtctgt tcttgtacc cacaggagct gcccgggcg
54661 aggaagatgc caccttccc aaagctatgg acaagttgac ggtccggcac cggcagagcg
54721 ccaactctean nnnnnnnnnn nnnnnnnnn

```

エクソン 2 AC012234.6: 233bp

```

75121 ttttagcaact gtgttttgtt gtttcattta ctctcaaaa tgcacagctc tattaccat
75181 attatataat ctctccactc tctctcttc ccttctctc ccctccaaca ctcccctgct
75241 cactgcaggt tgaccataga tgaccgggta acccgggtgg cctggctaaa ccgacgacc
75301 atctctacg ctgggaatga caagtgttcc atagaccctc gtgtgatac cctggctcaat
75361 acaccaacc agtacagcat catgatocaa atgtggatg tgtatgacga aggtccgtac
75421 acctgtcttg tgcagacaga caatcctccc aaacgtccc gggttccctc aatagtgaa
75481 ggttagtccc agctggatct ggggttgcca ttcccgtcag tgatggagg gaagaacagt
75541 gttggtgttt gttctacctg tftgcgaaga cacaaaagtc atcttctct actgaatcca
75601 gagtttgact atatgtcttg gaatgttttc catcgaatgg gtaacttaact aagtgtgaa

```

【 16 B 】

Figure 16 (page 2 of 4)

エクソン 3 AP000843.3: 126bp

36961 attattata aaaaatgct atacaaaat ttgtaggcta acacctcctt ttaagtgcac
 37021 agaatatttc taaggatttt cttctatcct gtttccttac gtttcctcct cagatcatga
 37081 **atctctctc agacatacct gtaagtagg gaaactgtt gacctgttg tgtttgtga**
 37141 **ttggcagcc agagcaact gtagaatga gacacatgtc agtcaaggt aagttcctga**
 37201 **ctctggagcc gttttccag gtagtatgtt aaagtcttgg cttctatgca caacagatct**
 37261 tcaggaaatca gaaaacattt tgaatccag tcatagaaa tcaaacagcc aatatgaccc
 37321 aattgtggc tatttcattt caaaaagaag attcatagag gaaaatttctt aaatgatggt

エクソン 4 AP000843.3: 138bp

2821 tctgatgct ttttctctc ctcctctac aatctctaga tgtgaatatg gttctgtccc
 2881 tggttacaca gtttccctgat tgtttcctgt ctgcttcttt cttcccagaa **ggcccagggct**
 2941 **ttgtaagta ggtatgtagt ctggagatct ctgacataca gogagaccag tcccggggagt**
 3001 **acgaaatgag cgggttgaac gatgtcgtg cggcagatgt gcgaaagta aaaaatcaatg**
 3061 **taaaactgta gtagcactgc aaccagggag ttctggggaa agaacggcac aggggagtgg**
 3121 tggacaatct ggtaaatgca tggccatttt ccaagagacc caggttctctg ccaacagaaa
 3181 aatacttcat cagatggctt tggcccacctt ggctccctgt ccatttctcc ctgggaatctt

【 16 C 】

Figure 16 (page 3 of 4)

エクソン 5 AP000843.3: 121bp

3361 aaatgattat tttactggga aagaggggttg tcaacaagaa tccatttaca tagcaaatgg
 3421 ctggatgag ccttcacttc ttcaagaaa tcaactctgt tgtgtgtggt tgcagtcctg
 3481 tgcattgtg tgtgtgtgt tcccacagat **cctccctata tctcaaaagc caagaacct**
 3541 **ggttttccag tgggtccagaa gggcactctg agctgtgaag cctctgcagt cccatggct**
 3601 **gaattccagt gtttcaagga agaacaccag taccttttaa atgacacctg gacagtctg**
 3661 aagcagact gatgtctat ccccacatgg gagaagatg aggatgaga aaaggggaaa
 3721 gataaggcaa acagaaata tactatgccc tcttttggaa caaagtctat ttttcaaaag
 3781 agaaaaaaa tggaggaggc tgggaaatgg agaaaatgaa ctgaccatga tcttgaatct

エクソン 6 AP000843.3: 152bp

3901 ggcagaagca tcatttccct tctctcctg ttggacaatg aagtgttag ggtttgagtt
 3961 tgaaggaga gattagtgg agaaaagat ttggtgaga gtagggcctc tttgtagaat
 4021 gaattgatag caatgtcttc cctcttcag **gttagccact ggttggatg gaatgggat**
 4081 **gaaaaaaa ggcgcgctgt ccactctgac tttcttcaat gtttcagaaa aggatctgg**
 4141 **gaactatact tttgtgcca cgaaacagct tggcaacc cctggccagca tcaatgtga**
 4201 **tggtgatgcc tggagacctg gatgcagtgg gctcagccc atggggagc ttgaggact**
 4261 caggaggag gaattgcaa tctgttggc ctgttccat ccatctact caaccacca
 4321 cctgtagata agacatactt ctcccgtcca ttcccctagc atgccaatga gatgatgta

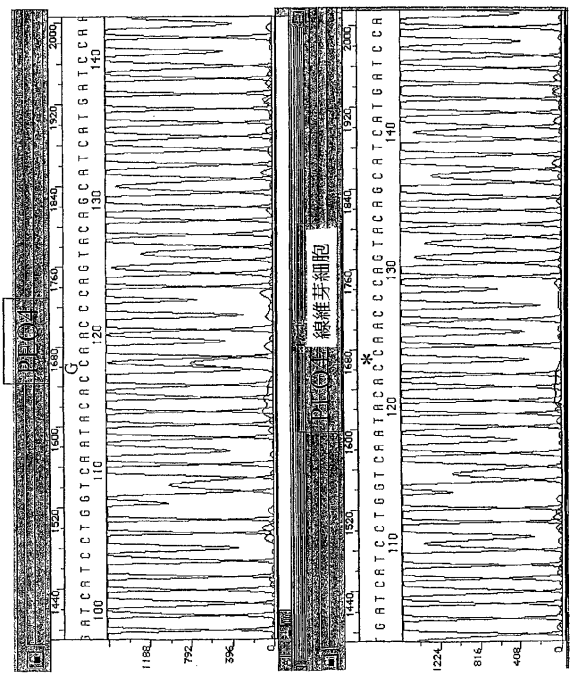
【 16 D 】

Figure 16 (page 4 of 4)

エクソン 7 (コード配列) AP000843.3: 101bp

19861 ttgttttagc ttggaatggt cagcgggaag gttggaaggtg gaaagcatgt atgtgtattt
 19921 gcttgcag gaagaactat gttgctcttg ggtgtatgct aatggctctg tctctctc
 19981 cctcacag ggcctggagc agcaatgat ggtgaaact cggctccag agaacgtgct
 20041 **tgtctctgc taccaggac cctctagcc cactttcca tcaagtcttg ataagaatc**
 20101 **ctagtcttc tgaagacgc cgtctctcc atatacaga ctttaactca cactggag**
 20161 agcaaacag ctgggcttc ttttggttt tttctgtat tctagatttg tttctttt
 20221 gttttgttt attgtttgt ttgcttttat ttcccagctg aatgagttgg gttggggggc

【 17 】



【 図 1 8 】

PE04線維芽細胞のDNA中に存在する、野生型OBCAM:

V I I L V N T P . T Q Y S I M I Q
gtgtgatcatcctgggtcaatacaccacccagctacagcatcatgatccaaa

PE01、PE01CDDP、PE04のDNAの、体細胞OBCAMミスセンス突然変異:

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

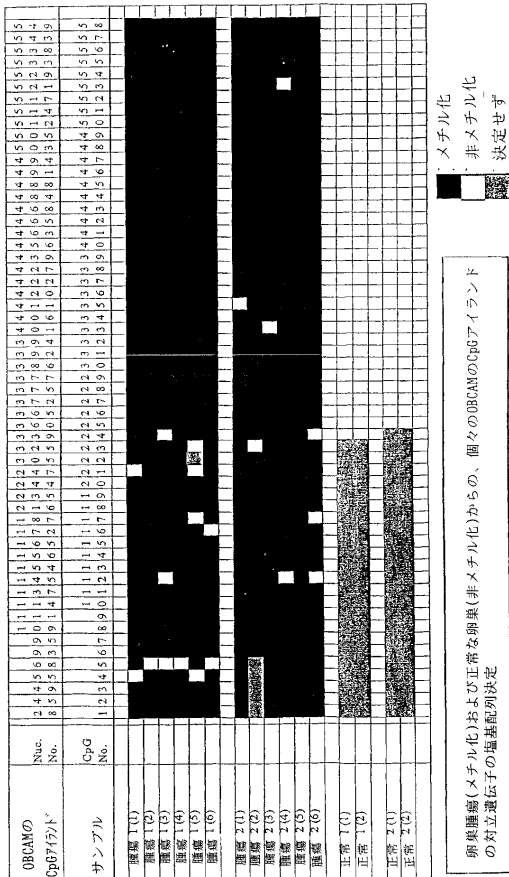
【 図 1 9 】

OBCAMのCpGアイルンドの重硫酸塩による塩基配列決定

1 ATTGAGATTT GCCACTTTGG GGACAGGCGT CCAGTGGAGG GGCACGGGCGG
51 TTTCGAGGT GGGTCCTCGG AGTGGGTGC ACTCCACTC TGGGGGGCC
101 CAGGACAGCG CGCCTCAGG GCTGGACTTG GCTGGCCGG GAGCCGATTG
151 CAGCCGATG GACACGCACA CCGTGCACC ATCTGGCTG GGCAGGGTAG
201 TTCAGCTTC CAGGGCGGGG TTTGTCACT TCTGGCTGG CATCGGCGAG
251 GGAAGGTGCC AGTGTCAATT TTCAGTTGC TGTTCCTCC AGAACTCCCT
301 CTCCTGCCCT CCCCTCACC TCCCCTCC CCCACCCGG CCCCTCTGT
351 AGGGGAAGCC GCTGCGAGG GCGCCGCGTT CTCTCCGCTG GCGCGGGTGT
401 CGGACGGAG CGAAGTGGG GGGTGGGG CTCACTCCCG CAGGCATCCC
451 CAGCCGGTG GCGCGGCGG AGGTTAAGT GGGCGCCCG CGTCCGGATG
501 AGCGGCAGT CCGCGCCGGC CGCCAGCCG CTCTGGTCCG GCGCGGACCG
551 GAGGAAAGT CCGGTACGG ATGGAGTGC TGCCATGACA ACCCGGGCGG
601 TCCGGCCCG CCGCGCTCG GGTGCTCC GGGAGGAGG CCGCGCGGAG
651 CCGGGGCGG CCGCTGAGG TGCGTCCCG GCGTCCCGG GTCTCGTGC
701 GCGTCCCGG AGGAAGCGG GCGCCCGTC CCGCAGTCC CCGTGGGCC
801 CCGAGTCCC CCGGGCGG GCTCCCGCG CTGCCCGCA GTCCCGGACC
851 GGGGTGACA GACGGCCAC CGACGGGAC ACCCTGTGC GCCGGTCCGG
901 TCCCGCCCTT GGAACCTTTT GCCCGCTTGG GGTTCAGAT GCGAGACTT

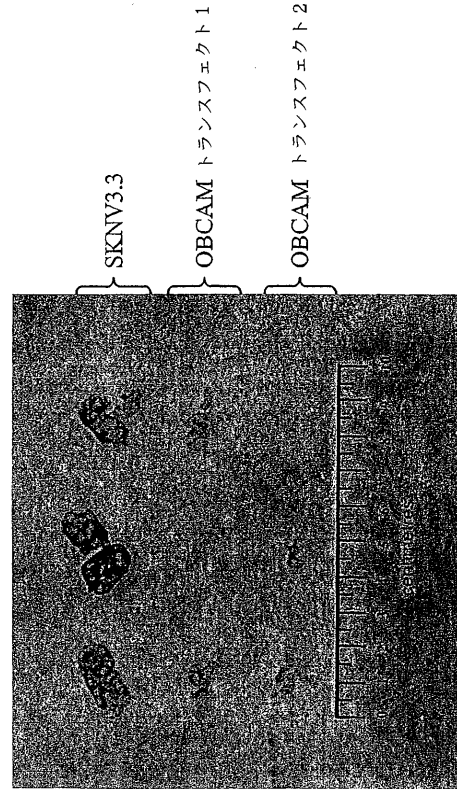
【 図 2 0 】

OBCAMのCpGアイルンドは、卵巣腫瘍中ではメチル化状態であり、正常な卵巣中では非メチル化状態である



【 図 2 1 】

SKNV3.3中でのOBCAMの発現によって、ヌードマウスの腫瘍形成がほぼ完全になくなる。



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/002765 A2

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/68**
- (21) International Application Number: PCT/GB02/02928
- (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0115673.6 27 June 2001 (27.06.2001) GB
60/305,137 16 July 2001 (16.07.2001) US
60/330,792 31 October 2001 (31.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **IMPERIAL CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED** [GB/GB]; Sardinia House, Sardinia Street, London WC2A 3NL (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **SELLAR, Grant, Clark** (GB/GB); Imperial Cancer Research Fund Medical Oncology Unit, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU (GB). **GABRA, Hani** [GB/GB]; Imperial Cancer Research Fund Medical Oncology Unit, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU (GB).
- (74) Agent: **MILES, John, S.**, Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Repewalk, Nottingham NG1 5DD (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 03/002765 A2

(54) Title: CANCER

(57) Abstract: The invention provides methods of diagnosis, prognosis and treatment of cancer related to the OBCAM and NTM genes. The methods are particularly suited to ovarian and colorectal cancers.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

1

CANCER

The present invention relates to cancer and in particular to ovarian and colorectal cancers.

5

Cancer is a serious disease and a major killer. Although there have been advances in the diagnosis and treatment of certain cancers in recent years, there is still a need for improvements in diagnosis and treatment.

10

Cancer is a genetic disease and in most cases involves mutations in one or more genes. There are believed to be around 30-40,000 genes in the human genome but only a handful of these genes have been shown to be involved in cancer. Although it is surmised that many more genes than have been presently identified will be found to be involved in cancer, progress in this area has remained slow despite the availability of molecular analytical techniques. This may be due to the varied structure and function of genes which have been identified to date which suggests that cancer genes can take many forms and have many different functions.

15

20

Ovarian cancer is the most frequent cause of death from gynaecological malignancies in the Western World, with an incidence of 5,500 new cases every year in England and Wales. It is the fourth most common cause of cancer mortality in American women. The majority of patients with epithelial ovarian cancer present at an advanced stage of the disease.

25

Consequently, the 5 year survival rate is only 30% after adequate surgery and chemotherapy despite the introduction of new drugs such as platinum and taxol (Advanced Ovarian Cancer Trialists Group (1991) *BMJ* 303, 884-893; Ozols (1995) *Semin Oncol.* 22, 61-66). However, patients who have

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

2

stage I disease (confined to the ovaries) do better with the 5 year survival rate being 70%. It is therefore desirable to have techniques to detect the cancer before metastasis to have a significant impact on survival.

5 Epithelial ovarian cancer constitutes 70-80% of ovarian cancer and encompasses a broad spectrum of lesions, ranging from localized benign tumours and neoplasms of borderline malignant potential to invasive adenocarcinomas. Histologically, the common epithelial ovarian cancers are classified into several types, that is, serous, mucinous, endometrioid, 10 clear cell, mixed epithelial, and undifferentiated tumours. The heterogeneity of histological subtypes reflects the metaplastic potential of the ovarian surface Mullerian epithelium which shares a common embryological origin with the peritoneum and the rest of the uro-genital system. Germ cell, sex cord/stromal tumours and sarcomas represent the remainder of ovarian 15 cancers. The histogenesis and biological characteristics of epithelial ovarian cancer are poorly understood as are the molecular genetic alterations that may contribute to the development of such tumours or their progression. Epidemiological factors related to ovulation seem to be important, whereby ovarian epithelial cells undergo several rounds of division and proliferative 20 growth to heal the wound in the epithelial surface. These lead to the development of epithelial inclusion cysts and frank malignant tumours may arise from them (Fathalla (1971) *Lancet* 2, 163).

A review of ovarian cancer screening is given in Bell *et al* (1998) *Health* 25 *Technology Assessment* 2, 1-50.

Genetic changes in the tumour are critical for the development of cancer. Many chromosomal regions (chromosomes 3, 5, 6, 8, 11, 13, 17, 18, 22, and

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

3

- X) have been implicated to contain tumour suppressor genes involved in tumour progression of sporadic ovarian cancer, but only the p53 gene (chromosome arm 17p) has been found to be frequently mutated (Shelling *et al* (1995) *Br. J. Cancer* 72, 521-527). The BRCA1 gene (chromosome arm 17q) and the BRCA2 gene (chromosome arm 13q) isolated in 1994 and 1996 respectively, are mutated in a proportion of patients with familial breast/ovarian cancer (Ford & Easton (1995) *Br. J. Cancer* 72, 805-812). Familial ovarian cancer only accounts for 5-10% of all ovarian tumours. In tumours from patients with sporadic ovarian cancer, only five mutations in the BRCA1 gene and four in the BRCA2 gene have been reported (Takahashi *et al* (1995) *Cancer Res.* 55, 2998-3002; Takahashi *et al* (1996) *Cancer Res.* 56, 2738-2741) suggesting that they are rare in sporadic ovarian cancer. Mutations in the mismatch repair genes have been reported at a frequency of 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). Thus genes that may be more critical in tumour progression in sporadic ovarian cancer have not yet been fully characterised.
- WO 96/05306, WO 96/05307 and WO 96/05308 relate to methods and materials used to isolate and detect a human breast and ovarian cancer predisposing gene (BRCA1), some mutant alleles of which are alleged to cause susceptibility to cancer, in particular breast and ovarian cancer.
- Tumour suppressor activity has been suggested to be encoded on chromosome 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*

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

4

(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; and Gabra *et al* (1998) *Br J. Cancer* **78**, Poster P185), but none of these papers identify the candidate gene(s).

Colorectal tumours of the large intestine are a frequent cause of human cancer mortality in the Western world with approximately 19,000 deaths in the UK per annum.

10

The majority of cancers of the colorectum are adenocarcinomas (Jass and Morson (1987) *J. Clin. Pathol.* **40**, 1016-1023; Morson (1974) *Proc. R. Soc. Med.* **67**, 451-457). The literature remains divided on the true origins of colorectal carcinomas and it has been proposed that carcinomas may arise both from within existing benign neoplasms (termed adenomas), in what has been termed the adenoma to carcinoma sequence (Muto *et al* (1975) *Cancer* **30**, 2251-2270), or *via* areas of generalised dysplasia (*de novo*) without an adenomatous stage. Whilst it is probable that some colorectal cancers originate in adenomas, the majority of adenomas do not appear to progress to carcinoma and indeed may even regress (Knoernschild (1963) *Surg. Forum* **XIV** 137-138). Whilst evidence on environment, diet, age and sex suggest that these are all risk factors for colorectal cancer, the lack of confirmation of involvement of these factors in all cases suggests an underlying genetic basis for colorectal tumour formation. The majority of colorectal cancers are not associated with clear inherited syndromes although hereditary forms do exist, including Familial Polyposis Coli (FPC), Gardner's Syndrome, Hereditary non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) and Turcot's Syndrome.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

5

Several oncogenes and tumour suppressor genes have now been shown to play a definite role in colorectal tumorigenesis, whilst at other loci a correlation between LOH and colorectal cancer is less well defined. Notably, the Barx2 gene was found to be a candidate tumour suppressor in the 11q24-q25 LOH region implicated in ovarian and colorectal cancer (WO 00/77252).

The IgLONs (Immunoglobulin LAMP, OBCAM, and Neurotrimin) are a family of immunoglobulin (Ig) domain-containing cell adhesion molecules, part of the Ig SuperFamily of Ig-domain containing proteins (IgSF). The IgLONs consists of LAMP (Limbic system Associated Membrane Protein), OBCAM/OPCML (Opioid Binding Cell Adhesion Molecule, previously called GP55A), and Neurotrimin (NTM or HNT in humans, or CEPU-1 in chick). Recently, the IgLON family has been shown to include rat neurotractin (kilon - Kindred of LON is the chick homologue). The IgLONs are all extracellular proteins, and are not themselves transmembrane proteins or indeed even directly in contact with the cell membrane. Instead, they are tethered to the cell membrane via a GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor attached near the C-terminus of the protein, which is then inserted into the cell membrane. It is presumed that signalling to the nucleus following IgLON binding is then carried out via trans- and cis-interaction with, as yet undefined, G protein coupled signalling pathways (Clarke and Moss (1997) *Eur. J. Neurosci.* 9:334-41).

The genes encoding OBCAM and NTM are located in the 11q24-q25 region of chromosome 11. The two genes share approximately 80% and 76% identity at the nucleotide and amino acid level, respectively. In the mouse, both proteins are also encoded by distinct genes that appear to be clustered on the proximal end of mouse chromosome 9, in a region syntenic to human

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

6

chromosome 11q24-q25. It is likely, therefore, that these highly related genes have most likely arisen as a result of an ancestral gene duplication event that occurred at least prior to the divergence of man and mouse (Struyk AF *et al* (1995) *J. Neurosci* 15(3):2141-56).

5

IgLON function has primarily been described in the context of neuronal axon guidance and cell-cell contact in brain development. IgLON family members can be co-expressed on a single cell type, and it may be that their relative levels on the cell surface and resultant heterophilic interactions, in addition to homophilic interactions, are important in contextualising their function. Homodimerisation (and also trimerisation) in the plane of a membrane is a feature of NTM cis-interaction (Gil *et al* (1998) *J. Neuroscience* 18:9312-9325). It has not previously been suggested that members of the IgLON family are involved in cancer and, in particular, it has not previously been suggested that members of the IgLON family may be tumour suppressor genes.

Surprisingly, it has now been found that in addition to the Barx2 tumour suppressor located at 11q24-q25, two further genes in this region are methylated, mutated and/or deleted in cancer. It is believed that the OBCAM and NTM genes are involved in ovarian and colorectal cancer as tumour suppressor genes.

This unexpected observation provides new methods of diagnosis and treatment for cancer, especially for ovarian and colorectal cancers.

A first aspect of the invention provides a method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

7

- (i) obtaining a sample containing nucleic acid from the patient;
and
(ii) contacting the said nucleic acid with
- 5 (a) a nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- 10 (b) a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- (c) both (a) and (b).

A second aspect of the invention provides a method of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a patient comprising the steps of

- (i) obtaining a sample containing nucleic acid from the patient;
and
20 (ii) contacting the said nucleic acid with
- (a) a nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- 25 (b) a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- (c) both (a) and (b).

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

8

Identification of mutations in, or lack of activity of, OBCAM or NTM are believed to be particularly useful for prognosis (i.e. link to outcome) and in determining whether a patient may be suitable for treatment by gene therapy or agonist/mimetic therapy (see below).

In particular, lack of activity of OBCAM due to loss of heterozygosity is thought to be an early event in, for example, ovarian cancer. Loss of NTM heterozygosity is thought to occur later than loss of OBCAM in ovarian cancer. Hence, identification of a lack of activity or mutation in OBCAM may be particularly informative about the possibility of the onset of cancer, whereas analysis of both OBCAM and NTM and identification of lack of activity or mutation (such as deletion) (e.g. by methylation analysis or LOH analysis) in both genes may allow a conclusion as to the degree, or where the method is performed on the same patient at different times, of the progression of the disease.

As discussed further below, the nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM or NTM gene, or a mutant allele thereof, or their complement, may hybridise to the said gene once the said gene has been exposed to a modifying treatment, for example treatment with bisulphite or methylation-sensitive restriction enzymes, as discussed further below. Thus, the method of the first or second aspect of the invention may further comprise the step of exposing the said nucleic acid from the patient to a modifying treatment, for example bisulphite treatment, prior to contacting the said nucleic acid from the patient with the test nucleic acid.

Early detection of ovarian cancer is particularly useful since this cancer type remains asymptomatic until the late stages of tumour development.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

9

Preferably, the patient is a human patient and, generally, reference to OBCAM and NTM is a reference to human OBCAM and human NTM respectively.

5

It will readily be appreciated by the skilled person that the OBCAM or NTM genes or parts thereof may readily be obtained from other suitable human gene libraries, such as standard cosmid, or yeast artificial chromosome (YAC) or P1-artificial chromosome (PAC) libraries. An OBCAM or NTM cDNA may be used as a probe to identify all or parts of the OBCAM or NTM gene respectively.

OBCAM cDNA sequence is publicly available from GenBank under Accession No. NM_002545. This sequence is also shown in Figure 7. Further sequences for OBCAM in rat and cow are available from GenBank under the following Accession Nos: M88711 (*Rattus norvegicus*) and X12672 (*Bos taurus*).

The genomic structure of the gene may be determined by comparing the cDNA sequences, for example GenBank cDNA sequences, with the sequence of genomic BAC clones from the GenBank database. The following BAC or PAC clones contain the OBCAM gene: AC027631 (although this sequence in GenBank is incorrectly annotated in referring to chromosome 18; the markers contained within it are all chromosome 11), AC027631, AC012234, AP000843 and AP000912. They can be obtained from the relevant sequencing centres as part of the HGS project.

The OBCAM gene is believed to encompass the D11S4085 genetic marker on chromosome 11. As described in more detail in the Example, the

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

10

D11S4085 marker has been identified as being lost from one allele of chromosome 11 in ovarian and colorectal cancer (in 56% (24/43) and 32% (8/25) of cases respectively). The D11S4085 marker is known to be located telomeric to the D11S1320 marker. The D11S4085 marker is intronic, in the second intron of OBCAM, approximately 300-600kb telomeric to D11S1320. Hence, in an alternative embodiment of the first and second aspects of the invention, the step (ii) part (a) may be formulated as:

“a nucleic acid which hybridises selectively to a polynucleotide comprising the microsatellite marker D11S4085, or a mutant allele thereof, or their complement; or”.

In this case, the polynucleotide may be any polynucleotide comprising the D11S4085 marker. Preferably, the polynucleotide comprises at least a portion of the OBCAM gene, more preferably all of the OBCAM gene. Still more preferably, the polynucleotide is chromosome 11, or a portion thereof wherein the portion is at least 100, 500, 5000, 10000 or 50000 nucleotides in length. Preferably, the polynucleotide portion is such that it comprises at least 50, 100, 2500, 5000 or 25000 consecutive nucleotides of chromosome 11 on either side of the D11S4085 marker.

D11S4085 is flanked by genomic sequence within intron 2 of OBCAM. This is on BAC AC012234. The partial nucleotide sequence of intron 2 is shown in Figure 16. However, since Figure 16 only shows intron/exon boundaries and does not show the full length introns, the marker D11S4085 is not shown in this Figure.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

11

Hence, it will be appreciated that reference to the "OBCAM gene" below may be a reference to a polynucleotide comprising the D11S4085 marker as defined above.

5 NTM cDNA sequence is publicly available from GenBank under Accession No NM_016522. This sequence is also shown in Figure 8. A further sequence for NTM in rat is available from GenBank under Accession No NM-017354 (*Rattus norvegicus*).

10 The genomic structure of the gene may be determined by comparing the cDNA sequences, for example GenBank cDNA sequences, with the sequence of genomic BAC clones from the GenBank database. The following BAC or PAC clones contain the NTM gene: AC012134, AC018368 and AP0000912. They can be obtained from the relevant
15 sequencing centres as part of the HGS project.

Further NTM cDNA sequences may include those of clones 11753149.0.6 and 11753149.0.37 of WO 00/61754 and PRO337 of WO 99/46281.

20 We have determined further NTM cDNA sequences which are shown in Figure 9. These sequences are found, for example, in human ovarian surface epithelium. The predominant form in human ovarian surface epithelium appears to be the "+33bp" form. The "+69bp" form is another alternative form. Both forms appear to be more abundant in human ovarian
25 surface epithelium than the sequence shown in Figure 8 and in the database entry referred to above. A further form is the "+108bp" form, which contains an additional 108bp, which would be predicted to result in premature protein translation termination and a resultant truncated NTM protein isoform lacking the GPI anchor attachment site in the carboxy

terminus. The truncated protein, therefore, would be predicted not to be anchored to the cell membrane via a GPI anchor. This isoform may therefore represent a soluble form of NTM, which might be located extracellularly, and which may potentially interfere with or modulate the normal function of GPI-anchored NTM.

Thus, it is preferred in relation to the first and second aspects of the invention that the nucleic acid which hybridises selectively to the NTM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement, hybridises to the +33bp and/or +69bp and/or +108bp NTM gene or cDNA or their complement (particularly in relation to cancer of the ovary).

In an embodiment, it is preferred that the said nucleic acid hybridises to the +33bp and/or +69bp and/or +108bp forms of the NTM gene or cDNA or their complement. In a further embodiment it may be preferred that the said nucleic acid further does not hybridise to the "normal" or database NTM gene or cDNA sequence, as exemplified by the cDNA sequence of Figure 8.

In any event, an OBCAM or NTM cDNA may be readily obtained from a human cDNA library using well known techniques and portions of the genomic clones, or portions of the OBCAM or NTM cDNA sequence shown in Figures 7 and 8 or 9 respectively, as a probe. A suitable human cDNA library is one prepared from mRNA isolated from a human ovary or human ovarian tissue or human brain or human lymphoblastoid tissues although different tissue-specific isoforms of NTM may exist in non-ovarian tissues. Once an OBCAM or NTM cDNA or gene or fragment thereof has been identified as said, its nucleotide sequence may readily be determined,

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

13

for example using Sanger dideoxy sequencing or other methods well known in the art.

It will be appreciated that the OBCAM or NTM gene may exist as a “wild-type” gene or it may exist as mutant alleles which differ in sequence to the wild-type gene, as noted above. By “mutant alleles” is included not only sequences which lead to changes in function or expression of the OBCAM or NTM polypeptide, but allelic variants (or polymorphisms) which have no or only minor effect on the function or expression of the OBCAM or NTM polypeptide. Thus, the nucleic acids which selectively hybridise in the methods of the invention include those that selectively hybridise to the wild-type OBCAM or NTM gene sequence or to the wild-type OBCAM or NTM cDNA sequence (or mRNA sequence) as well as those which selectively hybridise to mutant alleles thereof. Also, it will readily be appreciated that, as is described in more detail herein, the skilled person can readily identify mutant alleles of the OBCAM or NTM gene and polymorphisms thereof.

An example of a mutant allele of the OBCAM gene is described in Example 5, wherein a cytosine nucleotide in exon 2 (at position 334 in GenBank entry No NM_002545 which is shown in Figure 7; mutation indicated in Figure 18) is present as a guanine. This mutation is seen in the ovarian cancer cells lines PEO1 and PEO4, but is not seen in fibroblast DNA isolated from the same patient as PEO1 and PEO4. The mutation produces a change in the encoded amino acid sequence; a “wild type” proline residue is replaced by an arginine in the ovarian cancer cell lines (Figure 18).

By “the polypeptide OBCAM or NTM” we include a polypeptide whose sequence comprises or consists of the amino acid sequence given in Figure 7, or 8 or 9, respectively, or whose sequence is encoded by the nucleotide

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

14

sequence indicated as coding region is Figures 7, or 8 or 9, respectively, and natural variants thereof. Preferably, the OBCAM polypeptide is one whose amino acid sequence comprises the sequence given in Figure 7. Preferably, the NTM polypeptide is one whose amino acid sequence comprises the sequence given in Figure 8 or 9.

By "the polypeptide OBCAM or NTM" we also include any naturally occurring polypeptide which comprises a consecutive 50 amino acid residue portion or natural variants thereof of the polypeptide sequence given in Figure 7, or Figure 8 or 9, respectively. Preferably, the polypeptide is a human polypeptide.

By "change in expression of the OBCAM or NTM polypeptide" is included any changes in the OBCAM or NTM gene which lead to changes in expression of the OBCAM or NTM polypeptide respectively. For example, changes in the transcription of the OBCAM or NTM gene will lead to changes in the expression of the OBCAM or NTM polypeptide respectively. Similarly, changes in the translation of OBCAM or NTM mRNA will lead to changes in the expression of the OBCAM or NTM polypeptide respectively.

Mutation of the protein coding sequence of OBCAM or NTM may lead to a loss of function of the OBCAM or NTM protein respectively; similarly, loss of function may be due to transcriptional silencing of the OBCAM or NTM gene or the presence of dominant negative mutations.

It will be appreciated that the methods of the invention defined above may involve either directly or indirectly comparing the results from the test

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

15

sample with results from a control sample such as from a known non-cancerous (normal) sample or from a known cancerous sample.

It will be appreciated that the nucleic acids which are useful in the method of the invention may readily be defined as those which selectively hybridise to OBCAM or NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement. In addition, the methods of the invention include the use of a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM or NTM gene or cDNA, or mutant alleles thereof whatever the source of the gene or cDNA. An example of a mutant OBCAM allele is shown in Figure 18 and described in more detail above. Nucleic acids which selectively hybridise to this mutant may be easily determined using the sequences shown in Figures 7, 16 and 18.

By "selectively hybridising" is meant that the nucleic acid has sufficient nucleotide sequence similarity with the said DNA or cDNA that it can hybridise under moderately or highly stringent conditions. As is well known in the art, the stringency of nucleic acid hybridization depends on factors such as length of nucleic acid over which hybridisation occurs, degree of identity of the hybridizing sequences and on factors such as temperature, ionic strength and CG or AT content of the sequence. Thus, any nucleic acid which is capable of selectively hybridising as said is useful in the practice of the invention. It is preferred that the nucleic acid which selectively hybridises, selectively hybridises to the human OBCAM or NTM gene or cDNA.

Nucleic acids which can selectively hybridise to the said DNA or cDNA (such as human DNA or cDNA) include nucleic acids which have >95% sequence identity, preferably those with >98%, more preferably those with

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

16

>99% sequence identity, over at least a portion of the nucleic acid with the said DNA or cDNA. As is well known, human genes usually contain introns such that, for example, a mRNA or cDNA derived from a gene within the said human DNA would not match perfectly along its entire
5 length with the said human DNA but would nevertheless be a nucleic acid capable of selectively hybridising to the said human DNA. Thus, the invention specifically includes nucleic acids which selectively hybridise to a OBCAM or NTM cDNA but may not hybridise to a OBCAM or NTM gene, or *vice versa*. For example, nucleic acids which span the intron-exon
10 boundaries of the OBCAM or NTM gene may not be able to selectively hybridise to the OBCAM or NTM cDNA respectively. The intron-exon boundaries for the OBCAM gene are shown in Figure 16; the nucleotide sequence for all introns is incomplete.

15 Typical moderately or highly stringent hybridisation conditions which lead to selective hybridisation are known in the art, for example those described in *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Sambrook *et al* (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, incorporated herein by reference.

20

An example of a typical hybridisation solution when a nucleic acid is immobilised on a nylon membrane and the probe nucleic acid is ≥ 500 bases or base pairs is:

25 6 x SSC (saline sodium citrate)
0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS)
100 $\mu\text{g/ml}$ denatured, fragmented salmon sperm DNA

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

17

The hybridisation is performed at 68°C. The nylon membrane, with the nucleic acid immobilised, may be washed at 68°C in 1 x SSC or, for high stringency, 0.1 x SSC.

5 20 x SSC may be prepared in the following way. Dissolve 175.3 g of NaCl and 88.2 g of sodium citrate in 800 ml of H₂O. Adjust the pH to 7.0 with a few drops of a 10 N solution of NaOH. Adjust the volume to 1 litre with H₂O. Dispense into aliquots. Sterilize by autoclaving.

10 An example of a typical hybridisation solution when a nucleic acid is immobilised on a nylon membrane and the probe is an oligonucleotide of between 15 and 50 bases is:

3.0 M trimethylammonium chloride (TMACl)

15 0.01 M sodium phosphate (pH 6.8)

1 mM EDTA (pH 7.6)

0.5% SDS

100 µg/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA

0.1% nonfat dried milk

20

The optimal temperature for hybridization is usually chosen to be 5°C below the T_i for the given chain length. T_i is the irreversible melting temperature of the hybrid formed between the probe and its target sequence. Jacobs *et al* (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 4637 discusses the determination of T_is. The

25 recommended hybridization temperature for 17-mers in 3 M TMACl is 48-50°C; for 19-mers, it is 55-57°C; and for 20-mers, it is 58-66°C.

By "nucleic acid which selectively hybridises" is also included nucleic acids which will amplify DNA from the said region of human DNA by any of the

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

18

well known amplification systems such as those described in more detail below, in particular the polymerase chain reaction (PCR). Suitable conditions for PCR amplification include amplification in a suitable 1 x amplification buffer:

5

10 x amplification buffer is 500 mM KCl; 100 mM Tris.Cl (pH 8.3 at room temperature); 15 mM MgCl₂; 0.1% gelatin.

A suitable denaturing agent or procedure (such as heating to 95°C) is used in order to separate the strands of double-stranded DNA.

10

Suitably, the annealing part of the amplification is between 37°C and 60°C, preferably 50°C.

Although the nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be RNA or DNA, DNA is preferred. Although the nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be double-stranded or single-stranded, single-stranded nucleic acid is preferred under some circumstances such as in nucleic acid amplification reactions.

15

The nucleic acid which is useful in the methods of the invention may be very large, such as 100 kb, if it is double stranded. For example, such large nucleic acids are useful as a template for making probes for use in FISH (fluorescence *in situ* hybridization) analysis. Typically, the labelled probes used in FISH are generally made by nick-translation or random priming from a genomic clone (such as an insert in a suitable PAC clone). Once made these probes are around 50-1000 nucleotides in length. It is more preferably used as a template for nick-translation or random primer extension as described above. However, for certain diagnostic, probing or

20

25

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

19

amplifying purposes, it is preferred if the nucleic acid has fewer than 10 000, more preferably fewer than 1000, more preferably still from 10 to 100, and in further preference from 15 to 30 base pairs (if the nucleic acid is double-stranded) or bases (if the nucleic acid is single stranded). As is
5 described more fully below, single-stranded DNA primers, suitable for use in a polymerase chain reaction, are particularly preferred.

The nucleic acid for use in the methods of the invention is a nucleic acid capable of hybridising to the OBCAM or NTM gene or the OBCAM or
10 NTM cDNA or mRNA or a mutant thereof. Fragments and variants of this gene, and cDNAs derivable from the mRNA encoded by the gene are also preferred nucleic acids for use in the methods of the invention.

Clearly nucleic acids which selectively hybridise to the gene itself or
15 variants thereof are particularly useful. Fragments of the gene are preferred for use in the method of the invention. Fragments may be made by enzymatic or chemical degradation of a larger fragment, or may be chemically synthesised. By "gene" is included not only the introns and exons but also regulatory regions associated with, and physically close to,
20 the introns and exons, particularly those 5' to the 5'-most exon. By "physically close" is meant within 50 kb, preferably within 10 kb, more preferably within 5 kb and still more preferably within 2 kb. It is believed that the basic promoter and regulatory elements of the OBCAM and NTM gene probably lie up to 200-400 base pairs from the transcriptional start site
25 or start of the coding regions. However, tissue specific or inducible elements may be 50 kb in either direction of the coding regions (exons) or may be in the introns. Such elements of the OBCAM and NTM genes may be identified or located by DNase hypersensitivity sites (detected on Southern blots) which indicate sites of regulatory protein binding.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

20

Alternatively, reporter constructs may be generated using the upstream genomic DNA (i.e. upstream of the 5'-most exon) and, for example, β -galactosidase as a reporter enzyme. Serial deletions and footprinting techniques may also be used to identify the regulatory regions.

5

The NTM CpG island overlaps with the ATG translation start site and is about 1.1kb in length. The OBCAM CpG island is approximately 500bp upstream of the translation start site and is about 900bp in length. When investigating the methylation status of the NTM or OBCAM gene (as discussed further below), nucleic acids which selectively hybridise to the CpG island of the selected gene may be particularly useful.

By "fragment" of a gene is included any portion of the gene of at least 15 nucleotides in length (whether single stranded or double stranded) but more preferably the fragment is at least 20 nucleotides in length, most preferably at least 50 nucleotides in length and may be at least 100 nucleotides in length or may be at least 500 nucleotides in length. Preferably the fragment is no more than 50 kb and, more preferably, no more than 100 kb.

By "variant" of a gene is included specifically a cDNA, whether partial or full length, or whether copied from any splice variants of mRNA. We also include specifically a nucleic acid wherein, compared to the natural gene, nucleotide substitutions (including inversions), insertions and deletions are present whether in the gene or a fragment thereof or in a cDNA. Both variants and fragments will be selected according to their intended purposes; for probing, amplifying or diagnostic purposes, shorter fragments but with a greater degree of sequence identity (e.g. at least 80%, 90%, 95% or 99%) will generally be required. An example of a variant of the OBCAM gene (and corresponding cDNA) includes the mutant with a cytosine to guanine

25

substitution at nucleotide 334 as numbered in Figure 7 and shown in Figure 18.

It is particularly preferred if the nucleic acid for use in the methods of the invention is an oligonucleotide primer which can be used to amplify a portion of the gene or cDNA.

Preferred nucleic acids for use in the invention are those that selectively hybridise to the OBCAM or NTM gene or cDNA and do not hybridise to other genes or cDNAs. Such selectively hybridising nucleic acids can be readily obtained, for example, by reference to whether or not they hybridise to the OBCAM or NTM cDNA as described in Figures 7 and 8 or 9 respectively.

Preferably, the methods of the first and second aspects are used to detect the presence or absence of a mutation in any of the said genes or cDNA. In other words, whether a variant gene or cDNA is present. More preferably, it is determined whether the nucleotide corresponding to nucleotide 334 of OBCAM as numbered in Figure 7 in the nucleic acid from the patient is the same as that in Figure 7, or not. Such determination may be made using a polynucleotide according to the invention and as described below.

The methods are suitable in respect of any cancer but it is preferred if the cancer is cancer of the ovary, colorectal, or other common adenocarcinomas such as cancer of the breast, lung, prostate and cervix. Additionally, methods relating to OBCAM may also be suitable for leukaemia and methods relating to NTM suitable for pancreas and leukaemia. The methods are particularly suitable in respect of cancer of the ovary or colon; the methods are most suitable in respect of ovarian cancer when the method

involves a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM gene or cDNA or a polynucleotide comprising the D11S4085 marker, and are most suitable in respect of colorectal cancer when the method involves a nucleic acid which selectively hybridises to the NTM gene or cDNA. It will be appreciated that the methods of the invention include methods of prognosis and methods which aid diagnosis. It will also be appreciated that the methods of the invention are useful to the physician or surgeon in determining a course of management or treatment of the patient.

The patient may be any individual in whom a cancer or tumour has been found or is suspected. Particularly preferred patients are those who have a pelvic mass identified by ultrasound and/or who have mildly raised CA125 levels. CA125 is a serum glycopeptide recently identified as Muc16 and is a tumour marker, not just for ovarian cancer but predominantly used in the clinical management of ovarian tumours.

Although it is believed that any sample containing nucleic acid derived from the patient is useful in the methods of the invention, since mutations in the OBCAM or NTM gene may occur in familial cancers and not just sporadic cancers, it is, however, preferred if the nucleic acid is derived from a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found. For example, if the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found is ovary, it is preferred if the sample containing nucleic acid is derived from the ovary of the patient. Samples of ovary may be obtained by surgical excision, laparoscopy and biopsy, endoscopy and biopsy, and image-guided biopsy. The image may be generated by ultrasound or technetium-99-labelled antibodies or antibody fragments which bind or locate selectively at the ovary. The well known monoclonal antibody HMF1 is a suitable antibody for imaging ovarian

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

23

cancer. Ascites/peritoneal cavity fluid, and peritoneal samples, may be obtained by surgery or laparoscopy. Similarly, if the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found is colon, it is preferred if the sample containing nucleic acid is derived from the colon of the patient; and so on. Colon samples may be obtained by colonoscopy.

Other samples in which it may be beneficial to analyse OBCAM or NTM include lymph node, blood, serum and potential or actual sites of metastasis, for example bone. It is particularly preferred that the sample is blood or lymph node, for example for early diagnosis of occult disease, for example asymptomatic ovarian cancer.

The sample may be directly derived from the patient, for example, by biopsy of the tissue, or it may be derived from the patient from a site remote from the tissue, for example because cells from the tissue have migrated from the tissue to other parts of the body. Alternatively, the sample may be indirectly derived from the patient in the sense that, for example, the tissue or cells therefrom may be cultivated *in vitro*, or cultivated in a xenograft model; or the nucleic acid sample may be one which has been replicated (whether *in vitro* or *in vivo*) from nucleic acid from the original source from the patient. Thus, although the nucleic acid derived from the patient may have been physically within the patient, it may alternatively have been copied from nucleic acid which was physically within the patient. The tumour tissue may be taken from the primary tumour or from metastases.

It will be appreciated that a useful method of the invention includes the analysis of mutations in, or the detection of the presence or absence of, the OBCAM or NTM gene in any suitable sample. The sample may suitably be

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

24

a freshly-obtained sample from the patient, or the sample may be an historic sample, for example a sample held in a library of samples.

Conveniently, the nucleic acid capable of selectively hybridising to the said
5 human DNA and which is used in the methods of the invention further
comprises a detectable label.

By "detectable label" is included any convenient radioactive label such as
32P, 33P or 35S which can readily be incorporated into a nucleic acid
10 molecule using well known methods; any convenient fluorescent or
chemiluminescent label which can readily be incorporated into a nucleic
acid is also included. In addition the term "detectable label" also includes a
moiety which can be detected by virtue of binding to another moiety (such
as biotin which can be detected by binding to streptavidin); and a moiety,
15 such as an enzyme, which can be detected by virtue of its ability to convert a
colourless compound into a coloured compound, or *vice versa* (for example,
alkaline phosphatase can convert colourless o-nitrophenylphosphate into
coloured o-nitrophenol). Conveniently, the nucleic acid probe may occupy
a certain position in a fixed assay and whether the nucleic acid hybridises to
20 the said region of human DNA can be determined by reference to the
position of hybridisation in the fixed assay. The detectable label may also
be a fluorophore-quencher pair as described in Tyagi & Kramer (1996)
Nature Biotechnology 14, 303-308.

25 It will be appreciated that the aforementioned methods may be used for
presymptomatic screening of a patient who is in a risk group for cancer.
High risk patients for screening include patients over 50 years of age or
patients who carry a gene resulting in increased susceptibility (e.g.
predisposing versions of BRCA1, BRCA2 or p53); patients with a family

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

25

history of breast/ovarian cancer; patients with affected siblings; nulliparous women; and women who have a long interval between menarche and menopause. Similarly, the methods may be used for the pathological classification of tumours such as ovarian tumours or colon tumours.

5

Conveniently, in the methods of the first, second and third aspects of the invention the nucleic acid which is capable of the said selective hybridisation (whether labelled with a detectable label or not) is contacted with a nucleic acid derived from the patient under hybridising conditions.

10 Suitable hybridising conditions include those described above.

It is preferred that if the sample containing nucleic acid derived from the patient is not a substantially pure sample of the tissue or cell type in question that the sample is enriched for the said tissue or cells. For

15 example, enrichment for ovarian cells in a sample such as a blood sample may be achieved using, for example, cell sorting methods such as

fluorescent activated cell sorting (FACS) using an ovary cell-selective antibody, or at least an antibody which is selective for an epithelial cell. For example, Cam 5.2, anticytokeratin 7/8, from Becton Dickinson, 2350 Qume

20 Drive, San Jose, California, USA, may be useful.

In a preferred embodiment, the invention provides a diagnostic blood test for early ovarian disease or other tumour types. The blood test allows small numbers of circulating tumour cells to be analysed with regard to OBCAM

25 and /or NTM, for example with regard to the methylation state of one or both of these genes.

The source of the said sample also includes biopsy material as discussed above and tumour samples, also including fixed paraffin mounted specimens

as well as fresh or frozen tissue. The nucleic acid sample from the patient may be processed prior to contact with the nucleic acid which selectively hybridises to OBCAM or NTM. For example, the nucleic acid sample from the patient may be treated by selective amplification, reverse transcription, 5 immobilisation (such as sequence specific immobilisation), or incorporation of a detectable marker.

It is particularly preferred if the methods of the invention include the determination of methylation of, mutations in, or the detection of the 10 presence or absence of, the OBCAM or NTM gene.

The methods of the first or second aspects of the invention may involve sequencing of DNA at one or more of the relevant positions within the relevant region, including direct sequencing; direct sequencing of PCR- 15 amplified exons; differential hybridisation of an oligonucleotide probe designed to hybridise at the relevant positions within the relevant region (conveniently this uses immobilised oligonucleotide probes in, so-called, "chip" systems which are well known in the art); denaturing gel electrophoresis following digestion with an appropriate restriction enzyme, 20 preferably following amplification of the relevant DNA regions; S1 nuclease sequence analysis; non-denaturing gel electrophoresis, preferably following amplification of the relevant DNA regions; conventional RFLP (restriction fragment length polymorphism) assays; heteroduplex analysis; selective DNA amplification using oligonucleotides; fluorescent *in-situ* 25 hybridisation (FISH) of interphase chromosomes; ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR) for specific mutations; cleavage at mismatch sites in hybridised nucleic acids (the cleavage being chemical or enzymic); SSCP single strand conformational polymorphism or DGGE (discontinuous or denaturing gradient gel electrophoresis); analysis

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

27

to detect mismatch in annealed normal/mutant PCR-amplified DNA; and protein truncation assay (translation and transcription of exons - if a mutation introduces a stop codon a truncated protein product will result). Other methods may be employed such as detecting changes in the secondary
5 structure of single-stranded DNA resulting from changes in the primary sequence, for example, using the cleavase I enzyme. This system is commercially available from GibcoBRL, Life Technologies, 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA4 9RF, Scotland.

10 It will be appreciated that the methods of the invention may also be carried out on "DNA chips". Such "chips" are described in US 5,445,934 (Affymetrix; probe arrays), WO 96/31622 (Oxford; probe array plus ligase or polymerase extension), and WO 95/22058 (Affymax; fluorescently marked targets bind to oligomer substrate, and location in array detected);
15 all of these are incorporated herein by reference.

Detailed methods of mutation detection are described in "Laboratory Protocols for Mutation Detection" 1996, ed. Landegren, Oxford University Press on behalf of HUGO (Human Genome Organisation).

20

It is preferred if RFLP is used for the detection of fairly large (≥ 500 bp) deletions or insertions. Southern blots may be used for this method of the invention.

25 PCR amplification of smaller regions (maximum 300bp) to detect small changes greater than 3-4 bp insertions or deletions may be preferred. Amplified sequence may be analysed on a sequencing gel, and small changes (minimum size 3-4 bp) can be visualised. Suitable primers are designed as herein described.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

28

In addition, using either Southern blot analysis or PCR restriction enzyme variant sites may be detected. For example, for analysing variant sites in genomic DNA restriction enzyme digestion, gel electrophoresis, Southern blotting, and hybridisation specific probe (for example any suitable fragment derived from the OBCAM or NTM cDNA or gene).

For example, for analysing variant sites using PCR DNA amplification, restriction enzyme digestion, gel detection by ethidium bromide, silver staining or incorporation of radionucleotide or fluorescent primer in the PCR.

Other suitable methods include the development of allele specific oligonucleotides (ASOs) for specific mutational events. Similar methods are used on RNA and cDNA for the suitable tissue, such as ovarian or colon tissue.

Whilst it is useful to detect mutations in any part of the OBCAM and/or NTM gene, it is preferred if the mutations are detected in the exons of the gene and it is further preferred if the mutations are ones which change the coding sense. The detection of these mutations is a preferred aspect of the invention. An example of a cytosine to guanine mutation in exon 2 (nucleotide 334 as numbered in GenBank Entry No NM_002545) of the OBCAM gene is described in Example 5.

The methods of the invention also include checking for loss-of-heterozygosity (LOH; shows one copy lost). LOH may be a sufficient marker for diagnosis; looking for mutation/loss of the second allele may not be necessary. LOH of the gene may be detected using polymorphisms in the

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

29

coding sequence, and introns, of the gene. LOH in a tumour cell, from whatever source, compared to blood is useful as a diagnostic tool, e.g. it may show that the tumour has progressed and requires more stringent treatment.

5

Particularly preferred nucleic acids for use in the aforementioned methods of the invention are those selected from the group consisting of primers suitable for amplifying nucleic acid.

- 10 Suitably, the primers are selected from the group consisting of primers which hybridise to the nucleotide sequences shown in any of the Figures which show OBCAM or NTM gene or cDNA sequences. It is particularly preferred if the primers hybridise to the introns of the OBCAM or NTM gene or if the primers are ones which will prime synthesis of DNA from the
- 15 OBCAM or NTM gene or cDNA but not from other genes or cDNAs. The intron-exon borders of the OBCAM gene are shown in Figure 16.

- Primers which are suitable for use in a polymerase chain reaction (PCR; Saiki *et al* (1988) *Science* 239, 487-491) are preferred. Suitable PCR
- 20 primers may have the following properties:

It is well known that the sequence at the 5' end of the oligonucleotide need not match the target sequence to be amplified.

- 25 It is usual that the PCR primers do not contain any complementary structures with each other longer than 2 bases, especially at their 3' ends, as this feature may promote the formation of an artifactual product called "primer dimer". When the 3' ends of the two primers hybridize, they form a

“primed template” complex, and primer extension results in a short duplex product called “primer dimer”.

Internal secondary structure should be avoided in primers. For symmetric
5 PCR, a 40-60% G+C content is often recommended for both primers, with
no long stretches of any one base. The classical melting temperature
calculations used in conjunction with DNA probe hybridization studies
often predict that a given primer should anneal at a specific temperature or
10 that the 72°C extension temperature will dissociate the primer/template
hybrid prematurely. In practice, the hybrids are more effective in the PCR
process than generally predicted by simple T_m calculations.

Optimum annealing temperatures may be determined empirically and may
be higher than predicted. *Taq* DNA polymerase does have activity in the
15 37-55°C region, so primer extension will occur during the annealing step
and the hybrid will be stabilized. The concentrations of the primers are
equal in conventional (symmetric) PCR and, typically, within 0.1- to 1- μ M
range.

20 Any of the nucleic acid amplification protocols can be used in the method of
the invention including the polymerase chain reaction, QB replicase and
ligase chain reaction. Also, NASBA (nucleic acid sequence based
amplification), also called 3SR, can be used as described in Compton (1991)
Nature 350, 91-92 and *AIDS* (1993), Vol 7 (Suppl 2), S108 or SDA (strand
25 displacement amplification) can be used as described in Walker *et al* (1992)
Nucl. Acids Res. 20, 1691-1696. The polymerase chain reaction is
particularly preferred because of its simplicity.

- When a pair of suitable nucleic acids of the invention are used in a PCR it is convenient to detect the product by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. As an alternative to detecting the product of DNA amplification using agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of the DNA, it is convenient to use a labelled oligonucleotide capable of hybridising to the amplified DNA as a probe. When the amplification is by a PCR the oligonucleotide probe hybridises to the interprimer sequence as defined by the two primers. The oligonucleotide probe is preferably between 10 and 50 nucleotides long, more preferably between 15 and 30 nucleotides long. The probe may be labelled with a radionuclide such as ^{32}P , ^{33}P and ^{35}S using standard techniques, or may be labelled with a fluorescent dye. When the oligonucleotide probe is fluorescently labelled, the amplified DNA product may be detected in solution (see for example Balaguer *et al* (1991) "Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescence adsorbent" *Anal. Biochem.* **195**, 105-110 and Dilesare *et al* (1993) "A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation" *BioTechniques* **15**, 152-157.
- 20 PCR products can also be detected using a probe which may have a fluorophore-quencher pair or may be attached to a solid support or may have a biotin tag or they may be detected using a combination of a capture probe and a detector probe.
- 25 Fluorophore-quencher pairs are particularly suited to quantitative measurements of PCR reactions (e.g. RT-PCR). Fluorescence polarisation using a suitable probe may also be used to detect PCR products.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

32

Oligonucleotide primers can be synthesised using methods well known in the art, for example using solid-phase phosphoramidite chemistry.

The present invention provides the use of a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM or NTM gene or to a polynucleotide comprising the microsatellite D11S4085 (as described above), or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which selectively hybridises to OBCAM or NTM cDNA or a mutant allele thereof, or their complement in a method of diagnosing cancer or prognosing cancer or determining susceptibility to cancer; or in the manufacture of a reagent for carrying out these methods.

Also, the present invention provides a method of determining the presence or absence, or mutation in, the said OBCAM and/or NTM gene. Preferably, the method uses a suitable sample from a patient. An example of a suitable mutation includes the cytosine to guanine mutation at nucleotide 334 in OBCAM, as described in Example 5 and shown in Figure 18.

The methods of the invention include the detection of mutations in the OBCAM and/or NTM gene.

The methods of the invention may make use of a difference in restriction enzyme cleavage sites caused by mutation. A non-denaturing gel may be used to detect differing lengths of fragments resulting from digestion with an appropriate restriction enzyme.

An "appropriate restriction enzyme" is one which will recognise and cut the wild-type sequence and not the mutated sequence or *vice versa*. The sequence which is recognised and cut by the restriction enzyme (or not, as the case may be) can be present as a consequence of the mutation or it can

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

33

be introduced into the normal or mutant allele using mismatched oligonucleotides in the PCR reaction. It is convenient if the enzyme cuts DNA only infrequently, in other words if it recognises a sequence which occurs only rarely.

5

In another method, a pair of PCR primers are used which match (i.e. hybridise to) either the wild-type genotype or the mutant genotype but not both. Whether amplified DNA is produced will then indicate the wild-type or mutant genotype (and hence phenotype). However, this method relies partly on a negative result (i.e. the absence of amplified DNA) which could be due to a technical failure. It therefore may be less reliable and/or requires additional control experiments. In a preferred embodiment, one of the primer pair selectively hybridises to a portion of the OBCAM gene which includes nucleotide 334 as numbered in Figure 7, or the corresponding portion of the OBCAM cDNA.

15

A preferable method employs similar PCR primers but, as well as hybridising to only one of the wild-type or mutant sequences, they introduce a restriction site which is not otherwise there in either the wild-type or mutant sequences.

20

It will be appreciated that the nucleic acid which selectively hybridise as said may selectively hybridise to both of the OBCAM and NTM genes because these two genes are located within relative close proximity to each other on chromosome 11. As shown in Figure 1, the two genes are probably located adjacent to each other.

25

The nucleic acids which selectively hybridise to the OBCAM and/or NTM gene or to the OBCAM or NTM cDNA are useful for a number of purposes.

They can be used in Southern hybridization to genomic DNA and in the RNase protection method for detecting point mutations already discussed above. The probes can be used to detect PCR amplification products. They may also be used to detect mismatches with the OBCAM or NTM gene or mRNA in a sample using other techniques. Mismatches can be detected using either enzymes (e.g. S1 nuclease or resolvase), chemicals (e.g. hydroxylamine or osmium tetroxide and piperidine), or changes in electrophoretic mobility of mismatched hybrids as compared to totally matched hybrids. These techniques are known in the art. Generally, the probes are complementary to the OBCAM and/or NTM gene coding sequences, although probes to certain introns are also contemplated. A battery of nucleic acid probes may be used to compose a kit for detecting loss of or mutation in the wild-type OBCAM and/or NTM gene. The kit allows for hybridization to the entire OBCAM and/or NTM gene. The probes may overlap with each other or be contiguous. In a preferred embodiment, the probe detects a portion of the OBCAM gene (for example, after amplification as described above), which includes nucleotide 334 as numbered in Figure 7, or the corresponding nucleotide in the OBCAM cDNA.

If a riboprobe is used to detect mismatches with mRNA, it is complementary to the mRNA of the human OBCAM or NTM gene. The riboprobe thus is an anti-sense probe in that it does not code for the protein encoded by the OBCAM or NTM gene because it is of the opposite polarity to the sense strand. The riboprobe generally will be labelled, for example, radioactively labelled which can be accomplished by any means known in the art. If the riboprobe is used to detect mismatches with DNA it can be of either polarity, sense or anti-sense. Similarly, DNA probes also may be used to detect mismatches.

Nucleic acid probes may also be complementary to mutant alleles of the OBCAM or NTM genes. These are useful to detect similar mutations in other patients on the basis of hybridization rather than mismatches. As
5 mentioned above, the OBCAM and NTM gene probes can also be used in Southern hybridizations to genomic DNA to detect gross chromosomal changes such as deletions and insertions.

According to the diagnostic and prognostic method of the present invention,
10 loss of, or modification of, the wild-type gene function may be detected. The loss may be due to either insertional, deletional or point mutational events. If only a single allele is mutated, an early neoplastic state may be indicated. However, if both alleles are mutated then a malignant state is indicated or an increased probability of malignancy is indicated. The
15 finding of such mutations thus provides both diagnostic and prognostic information. An OBCAM or NTM gene allele which is not deleted (e.g. that on the sister chromosome to a chromosome carrying a gene deletion) can be screened for other mutations, such as insertions, small deletions, and point mutations. We believe that detecting a mutation in a single copy
20 (allele) of the gene is useful. For example, mutation of the OBCAM gene at cytosine 334 as numbered in GenBank Accession No NM_002545 is observed as an early event in the development of ovarian cancer. Loss of the second allele may be necessary for carcinogenesis. If the second copy was lost routinely by a gross mechanism, this could be a useful event to
25 detect. Some mutations of the gene may have a dominant negative effect on the remaining allele. Mutations leading to non-functional gene products may also lead to a malignant state or an increased probability of malignancy. Mutational events (such as point mutations, deletions, insertions and the like) may occur in regulatory regions, such as in the

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

36

promoter of the gene, leading to loss or diminution of expression of the mRNA. Point mutations may also abolish proper RNA processing, leading to loss of or alteration in the expression of the OBCAM or NTM gene product or to the OBCAM or NTM polypeptide being non-functional or
5 having an altered expression. It is preferred if the amount of OBCAM or NTM mRNA in a test sample is quantified and compared to that present in a control sample. It is also preferred if the splicing patterns or structure of OBCAM or NTM mRNA in a test sample is determined and compared to that present in a control sample. However, the detection of OBCAM or
10 NTM expression is less preferred.

The amount of OBCAM or NTM mRNA is suitably determined per unit mass of sample tissue or per unit number of sample cells and compared this to the unit mass of known normal tissue or per unit number of normal cells.
15 RNA may be quantitated using, for example, northern blotting or quantitative RT-PCR.

The genes have two alleles each, and it will be appreciated that alterations to both alleles may have a greater effect on cell behaviour than alteration to
20 one. It is expected that at least one mutant allele has mutations which result in an altered coding sequence. Modifications to the second allele, other than to the coding sequence, may include total or partial gene deletion, and loss or mutation of regulatory regions.

25 As mentioned above, it may be useful to determine the loss or inactivation of an allele of both OBCAM and NTM, since loss or inactivation of OBCAM may be an earlier event than loss or inactivation in NTM, and determination of the presence or absence of loss or inactivation in either of the two may be informative as to the stage of progression of the cancer. For

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

37

example, a patient in whom a deletion (or other loss or inactivation) is identified in OBCAM, but not in NTM, may have an earlier stage of cancer than a patient in whom a loss or inactivation in both OBCAM and NTM is identified. For example, it is believed that subsequent NTM LOH occurs almost exclusively in cases with OBCAM LOH, and that NTM LOH almost never occurs alone. There may be a correlation with higher stage, or grade, or adverse survival. For colorectal cancer, the rates of OBCAM and neurotrimin LOH are considered to be about 32% and 50%, respectively.

10 Since the progression of a cancer or pre-cancerous condition may be indicated by detection of loss or inactivation in NTM, in addition to loss or inactivation in OBCAM, then it may be useful to perform the method of the first or second aspects of the invention more than once on the same patient.

15 Hence, the present invention also provides a method of determining the progression of a cancerous disease, for example progression of a tumour, in a patient comprising the steps of

- 20 (i) obtaining a sample nucleic acid from the patient wherein the OBCAM gene of the patient has been lost or inactivated;
- (ii) contacting the said nucleic acid with a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM gene or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement.

25

Preferably, the sample is a sample from the tissue in which the cancer is found or suspected, and more preferably the sample is from ovary or colon.

Such information concerning the progression of, or change in, any cancer or pre-cancerous condition may be useful to the physician in monitoring the efficacy of a treatment, or in diagnosing the precise condition or prognosing or predicting the relative prospects of a particular outcome in a patient.

5

The invention also includes the following methods: *in vitro* transcription and translation of OBCAM and/or NTM gene to identify truncated gene products, or altered properties such as substrate binding; immunohistochemistry of tissue sections to identify cells in which expression of the protein is reduced/lost, or its distribution is altered within cells or on their surface; and the use of RT-PCR using random primers, prior to detection of mutations in the region as described above. It is preferred if altered distribution of the OBCAM or NTM polypeptide is screened for.

15 An example of a mutation which it may be useful to detect is the proline to arginine mutation in the OBCAM polypeptide which is described in Example 5. The mutated residue is located within the first immunoglobulin domain, and may introduce a conformation change in the OBCAM polypeptide. This mutation is believed to be an indicator of cancer,
20 particularly an early indicator of ovarian cancer. Such a mutation in the OBCAM polypeptide may be detected using an antibody which is capable of distinguishing between the wild type (i.e., with no proline to arginine mutation) and the mutant. Such antibodies are described in more detail below.

25

The methods of the inventions also include detection of inactivation of the OBCAM or NTM gene by investigating its DNA methylation status. DNA methylation of the OBCAM or NTM gene can be assessed using standard techniques such as those described in Herman *et al* (1996) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 93, 9821-9826. Aberrant methylation of the OBCAM or NTM gene may be associated with their inactivation.

As will be known to the skilled person, regions of cytosines located 5' to
5 guanines, called CpG islands, are present in the regulatory regions of many
genes. These cytosines are generally unmethylated under normal
circumstances. However, these cytosines can become methylated within
certain genes in association with cancer. These methylated genes can
become repressed as a consequence of this both by biallelic methylation or
10 in combination with a second inactivating mechanism (for example LOH or
mutation). Methylation Specific PCR (MS-PCR) involves deamination of
unmethylated cytosines in genomic DNA to uracil by modification using
sodium bisulphite. Methylated cytosines are not deaminated by sodium
bisulphite. Primers are designed so mismatches are created, depending on
15 the methylation state of the genomic DNA under investigation. Typical
experiments involve two PCR reactions using the same template. One
experiment uses a primer that anneals to modified methylated DNA and the
other designed to anneal to modified unmethylated DNA, producing specific
bands for methylated and unmethylated DNA, respectively, by MS-PCR.
20 Sequencing of MS-PCR products further confirms the extent of CpG island
methylation for the genes under test. Examples of suitable primers are
shown in Figure 12.

The following references relate to MS-PCR: Maekawa *et al* (2001) *Clin*
25 *Chem Lab Med* Feb;39(2):121-8; Maekawa M *et al* (1999) *Biochem Biophys*
Res Commun 262(3):671-6.

The Examples show that there is a correlation between the methylation
status of the OBCAM or NTM gene and its level of expression: down-

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

40

regulation of OBCAM or NTM expression correlates with OBCAM or NTM methylation. Thus, the invention includes methods of determining the level of expression of OBCAM or NTM by assessing the level or extent of methylation of the OBCAM or NTM gene, and of using this information in,
5 diagnosing or predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a patient.

A still further aspect of the invention provides a method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of

10

- (i) obtaining a sample containing the OBCAM and/or NTM gene from the patient;
- (ii) determining the degree of methylation of the OBCAM and/or NTM gene;
- 15 (iii) comparing the level of methylation of the OBCAM and/or NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample; and
- (iv) if the patient sample has a higher degree of methylation of the OBCAM and/or NTM gene compared to the control sample this is
20 indicative of cancer.

By determining the degree of methylation is included determining the presence or absence of methylation, for example the presence or absence of methylation on a particular residue or region. Thus, for example,
25 methylation in the primer region may be detected by the presence or absence of a product using MS-PCR as described above, whilst sequencing of the product may indicate whether or how many of the potential methylation sites in the intervening (amplified) region are methylated (and therefore

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

41

mutated as a consequence of the deaminating agent or treatment, for example bisulphite treatment).

If the patient sample shows methylation of the OBCAM and/or NTM gene whilst the control sample shows no or insignificant methylation of the OBCAM and/or NTM gene this is indicative of cancer. It is considered that methylation may occur in an essentially "all or nothing" manner.

A yet still further aspect of the invention provides a method of predicting the relative prospect of a particular outcome of a cancer patient comprising the steps of

- (i) obtaining a sample containing the OBCAM and/or NTM gene from the patient;
- (ii) determining the degree of methylation of the OBCAM and/or NTM gene;
- (iii) comparing the level of methylation of the OBCAM and/or NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample; and
- (iv) if the patient sample has a higher degree of methylation of the OBCAM and/or NTM gene compared to the control sample this is indicative of a lower chance of a successful outcome.

By "control sample" we include the meaning of a non-tumorous sample or a sample which may be tumorous but which is at an earlier stage of development than that suspected in the sample of the patient.

Preferably, the control sample is a non-tumorous sample. In the case of measuring the progression of a tumour, it may be preferred if the control

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

42

sample is a tumorous sample from an earlier stage of development, typically from the same patient.

5 A progression in the disease or tumour may be identified by determining the degree of methylation in NTM alone, or may be identified by determining the degree of methylation in both NTM and OBCAM. Preferably, the methylation degree is determined in both NTM and OBCAM. By “progression” we include an increase in the likelihood of the tumour becoming malignant.

10

Unlike colorectal cancer which has a clear progression pathway, ovarian tumours have no premalignant/malignant switch that is detectable. Hence, progression of ovarian disease refers to an increasingly aggressive tumour with, for example, decreased prognosis or increased local spread.

15

LOH appears to be temporally separated with OBCAM LOH earlier than NTM LOH. Methylation may also be temporally defined for OBCAM and NTM but it is more common for methylation, if it occurs, to occur in both genes at the same time, as discussed in Example 1.

20

The identification of any methylation at NTM, or of additional methylation at NTM where previously only OBCAM was methylated, may indicate a progression in the disease or tumour from the stage in which no methylation at NTM was identified.

25

Thus, a still further aspect of the invention provides method of determining the progression of a cancerous disease, for example progression of a tumour, in a patient comprising the steps of

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

43

- (i) obtaining a sample from the patient containing the NTM gene wherein the OBCAM gene of the patient has been methylated;
- (ii) determining the degree of methylation of the NTM gene;
- (iii) comparing the level of methylation of the NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample;
- and if the level of methylation of NTM from the patient sample is increased compared to the control sample, this is indicative of a progression in the disease or tumour.

10

The tumour may be benign or malignant. As described above in relation to the first and second aspects of the invention, it is preferred if the tumour is an ovarian or colorectal tumour, and it is also preferred if the sample is a sample of the tissue in which cancer is suspected or the tumour is found.

15

Methods for determining methylation differences between nucleic acids are well known in the art and include (a) the use of methylation sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE); (b) digestion of genomic DNA with methylation sensitive restriction enzymes by Southern analysis; and (c) PCR-based methylation assays utilizing digestion of genomic DNA with methylation-sensitive restriction enzymes prior to PCR amplification. The above methods may be carried out following the digestion or bisulphite-converted DNA. Bisulphite treatment causes unmethylated cytosine in the nucleic acid sample to be converted to uracil but does not cause deamination of methylated cytosine (to thymine).

25

A further aspect of the invention provides a system (or it could also be termed a kit of parts) for detecting the presence or absence of, or mutation in, the relevant region of human DNA, the system comprising a nucleic acid

capable of selectively hybridising to the relevant region of human DNA and a nucleoside triphosphate or deoxynucleoside triphosphate or derivative thereof. Preferred nucleic acids capable of selectively hybridising to the relevant region of human DNA are the same as those preferred above.

- 5 The "relevant region of human DNA" includes the OBCAM or NTM gene or the OBCAM or NTM cDNA. Preferably, the relevant region of human DNA is the OBCAM or NTM gene as herein defined.

Hence, the invention provides a kit of parts comprising a nucleic acid which
10 hybridises selectively to the OBCAM or NTM gene or a mutant allele thereof, and means for detecting a mutation in the OBCAM or NTM gene wherein said mutation is a mutation in OBCAM or NTM found in a cancer cell.

- 15 By "mutation" is included insertions, substitutions and deletions. An example of a mutation which the nucleic acid is capable of selectively hybridising to is the OBCAM cytosine to guanine mutation at nucleotide 334 as numbered in Figure 7.

20 By "nucleoside triphosphate or deoxynucleoside triphosphate or derivative thereof" is included any naturally occurring nucleoside triphosphate or deoxynucleoside triphosphate such as ATP, GTP, CTP, and UTP, dATP, dGTP, dCTP, TTP as well as non-naturally derivatives such as those that include a phosphorothioate linkage (for example α S derivatives).

25 Conveniently the nucleoside triphosphate or deoxynucleoside triphosphosphate is radioactively labelled or derivative thereof, for example with ^{32}P , ^{33}P or ^{35}S , or is fluorescently labelled or labelled with a chemiluminescence compound or with digoxigenin.

Conveniently deoxynucleotides are at a concentration suitable for dilution to use in a PCR.

- 5 Thus, the invention includes a kit of parts which includes a nucleic acid capable of selectively hybridising to the said relevant region of human DNA and means for detecting the presence or absence of, or a mutation in, the said region. Means for detecting the presence or absence of, or a mutation in, the said region include, for example, a diagnostic restriction enzyme or a mutant-specific nucleic acid probe or the like.
- 10

A further aspect of the invention provides a kit of parts comprising:

- (a) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the OBCAM gene or a mutant allele thereof, or at least two nucleic acid which hybridise selectively to OBCAM cDNA or a mutant allele thereof; or
- 15 (b) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated methylated OBCAM gene or a mutant allele thereof; or
- (c) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated unmethylated OBCAM gene or a mutant allele thereof; or
- 20 (d) both (a) and (b), or (a) and (c), or (b) and (c), or (a), (b) and (c) and a source of bisulphite.

25

The invention further provides a kit of parts comprising:

- (a) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the NTM gene or a mutant allele thereof, or at least two nucleic acid which hybridise selectively to NTM cDNA or a mutant allele thereof; or

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

46

- (b) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated methylated NTM gene or a mutant allele thereof, or
- 5 (c) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated unmethylated NTM gene or a mutant allele thereof, or
- (d) both (a) and (b) both (a) and (b), or (a) and (c), or (b) and (c), or (a), (b) and (c)
- and a source of bisulphite.

10

The kit may further comprise means for performing an amplification reaction, as discussed further below (for example a PCR reaction) and/or for sequencing an amplification product, which may indicate the presence or absence of methylated CpG within the body of the amplification, for

15 example PCR, product.

Conveniently, these kits which comprise a source of bisulphite further comprise control methylated DNA. Such control DNA is known to be methylated on at least one cytosine, and permits a positive comparison with

20 test DNA. Any methylated human DNA may be used, for example DNA that has been artificially methylated using enzymatic methods. DNA derived from blood may be useful as this represents a renewable source. Methylated human DNA is commercially available from Intergen (Purchase, New York, USA/Oxford, UK): CpGenome Universal Methylated DNA Cat.

25 No. S7821.

Also conveniently, these kits further comprise a DNA polymerase. DNA polymerases are useful for amplifying bisulphite-modified DNA prior to sequence analysis. Use of bisulphite in modifying DNA, and subsequent

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

47

DNA amplification in investigating the methylation status of the DNA is described above and in the Example.

5 A further aspect of the invention provides a system for detecting the presence or absence of, or mutation in, the relevant region of DNA, the system comprising a nucleic acid which selectively hybridises to the relevant region of human DNA and a nucleic acid modifying enzyme. Preferred nucleic acids capable of selectively hybridising to the relevant region of human DNA are the same as those preferred above.

10

By "mutation" is included insertions, substitutions (including transversions) and deletions.

15 By "nucleic acid modifying enzyme" is included any enzyme capable of modifying an RNA or DNA molecule.

Preferred enzymes are selected from the group consisting of DNA polymerases, DNA ligases, polynucleotide kinases or restriction endonucleases. A particularly preferred enzyme is a thermostable DNA 20 polymerase such as *Taq* DNA polymerase. Nucleases such as Cleavase I which recognise secondary structure, for example mismatches, may also be useful.

25 Detecting mutations in the gene will be useful for determining the appropriate treatment for a patient, e.g. OBCAM and/or NTM gene therapy (see below). Detecting mutations in the gene may be useful to identify a subset of patients whose tumours have this shared characteristic, and can be analysed as a group for prognosis or response to various therapies. An

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

48

example of a mutation in OBCAM is described in Example 5 and shown in Figure 18.

5 Mutations in the gene may be related to response or resistance to certain treatments, this may be investigated using cell lines with known sensitivity to various therapies, or by clinical correlation studies.

10 It is possible that the genes would be used as part of a panel of markers and tests, the combined results of which would direct therapy. Detecting mutations in either or both of the genes may be useful for monitoring disease spread and load.

15 Analysis of the genes may be useful for differential diagnosis in the case where mutations in the gene are common in one tumour, but not another. For example, secondary tumours of gastrointestinal origin are frequently found in the ovaries and are difficult to distinguish from tumours of true ovarian origin.

20 A still further aspect of the invention provides a method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of

- (i) obtaining a sample containing protein derived from the patient; and
- (ii) determining:
 - 25 (a) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the OBCAM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the OBCAM polypeptide; or

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

49

- (b) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the NTM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the NTM polypeptide; or
- 5 (c) both (a) and (b).

A yet still further aspect of the invention provides a method of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a patient comprising the steps of

10

- (i) obtaining a sample containing protein derived from the patient; and
- (ii) determining:
- 15 (a) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the OBCAM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the OBCAM polypeptide; or
- (b) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the NTM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the NTM polypeptide; or
- 20 (c) both (a) and (b).

The methods of the invention also include the measurement and detection of

25 the OBCAM and/or NTM polypeptide or mutants thereof in test samples and their comparison in a control sample. It may also be useful to detect altered activity of the polypeptide. It will be appreciated that the measurements taken with respect to OBCAM and/or NTM polypeptide (or mutants thereof) in the test sample may be compared to the equivalent

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

50

measurements in control samples which may be derived from known non-cancerous (normal) cells or derived from known cancerous cells.

5 The sample containing protein derived from the patient is conveniently a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found. These methods may be used for any cancer, but they are particularly suitable in respect of cancer of the ovary, colorectal cancer, and other common adenocarcinomas such as cancer of the breast, lung or upper gastrointestinal tract; the methods are especially suitable in respect of cancer
10 of the ovary or colorectal cancer. Methods of obtaining suitable samples are described in relation to earlier methods.

The methods of the invention involving detection of the OBCAM and/or NTM polypeptide are particularly useful in relation to historical samples
15 such as those containing paraffin-embedded sections of tumour samples.

The relative amount of, or the cellular location of, or the physical form of, the OBCAM or NTM polypeptide may be determined in any suitable way.

20 The polypeptide sequence of OBCAM is given in the GenBank data library under Accession Nos NM_002545 (see Figure 7). The polypeptide sequence of NTM is given in the GenBank data library under Accession No NM_016522 (see Figures 8 and 9). Polypeptide sequences of NTM may also include those encoded by clones 11753149.0.6 and 11753149.0.37 of
25 WO 00/61754 and PRO337 of WO 99/46281.

By determining the "physical form" we include determining the sequence of the polypeptide, for example, determining the presence of differences such as insertions, deletions, substitutions etc between the wild type sequence as

shown in Figures 7 and the sequence of the polypeptide present in the sample from the patient. It may be useful to determine whether the polypeptide is a variant, such as the mutant described in Example 5 in the case of OBCAM, since such variants may be informative. For example, 5 determining that a sample from a patient contains a variant OBCAM wherein residue 95 (as numbered in the immature polypeptide shown in Figure 7 and in the corresponding protein reference sequence under GenBank Accession No NP_002536) is an arginine instead of proline may be indicative of ovarian cancer. Since this variant is believed to be 10 detectable from an early stage in ovarian cancer, its detection allows prompt diagnosis, prognosis and a determination of the relative prospects of a particular outcome in that patient, all which allow a more suitable treatment to be selected, thereby improving the chances of a favourable outcome for the patient.

15 It is preferred if the relative amount of, or cellular location of, or physical form of the OBCAM or NTM polypeptide is determined using a molecule which selectively binds to OBCAM or NTM polypeptide or which selectively binds to a mutant form of OBCAM or NTM polypeptide. As 20 will be known to the skilled person, both OBCAM and NTM are extracellular and secreted cell adhesion molecules and therefore the mature wild-type molecules are not generally intracellular. Suitably, the molecule which selectively binds to OBCAM or NTM or which selectively binds to a mutant of OBCAM or NTM is an antibody. The antibody may also bind to 25 a natural variant or fragment of OBCAM or NTM polypeptide.

Antibodies to OBCAM or NTM can be made by methods well known in the art.

It is preferred if the antibodies used are selective for OBCAM or NTM. By “selective for OBCAM or NTM” we mean that they bind OBCAM or NTM but do not bind substantially to other polypeptides. Preferably the antibody binds selectively only to OBCAM or NTM polypeptide, and more preferable, the antibody binds only to one of OBCAM and NTM, and not to both.

Antibodies which can selectively bind to a mutant form of OBCAM or NTM can be made, for example, by using peptides which encompass the changed amino acid or otherwise modified region of OBCAM or NTM, or by using fusion proteins which express a portion of the OBCAM or NTM polypeptide which includes the changed amino acid or otherwise modified region.

15 An example of a variant OBCAM (i.e., a mutant OBCAM) polypeptide sequence against which it may be useful to make an antibody, which is capable of selectively binding, is described in Example 5, and the amino acid sequence immediately surrounding the mutated residue is shown in Figure 18. The mutated amino acid corresponds to residue 95 of the
20 immature (i.e., with the signal peptide still attached) polypeptide, as numbered in Figure 7. Residue 95 is believed to be located in the first immunoglobulin domain of OBCAM.

In any case, based on the genetic code, it is possible to deduce readily the
25 change in the amino acid sequence. Antibodies which are selective for a mutant OBCAM or NTM polypeptide as herein disclosed form a further aspect of the invention.

The antibodies may be monoclonal or polyclonal. Suitable monoclonal antibodies may be prepared by known techniques, for example those disclosed in "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) and in "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), both of which are incorporated herein by reference.

By "the relative amount of OBCAM polypeptide" is meant the amount of OBCAM polypeptide per unit mass of sample tissue or per unit number of sample cells compared to the amount of OBCAM polypeptide per unit mass of known normal tissue or per unit number of normal cells. The relative amount may be determined using any suitable protein quantitation method. In particular, it is preferred if antibodies are used and that the amount of OBCAM is determined using methods which include quantitative western blotting, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) or quantitative immunohistochemistry. Similarly, by "the relative amount of NTM polypeptide" is meant the amount of NTM polypeptide per unit mass of sample etc, as described above in respect of OBCAM.

The neoplastic condition of lesions can also be detected on the basis of the alteration of wildtype OBCAM or NTM polypeptide. Such alterations can be determined by sequence analysis in accordance with conventional techniques. More preferably, antibodies (polyclonal or monoclonal) are used to detect differences in, or the absence of OBCAM or NTM polypeptide or peptides derived therefrom. The antibodies may be prepared as discussed herein.

Other techniques for raising and purifying antibodies are well known in the art and any such techniques may be chosen to achieve the preparations

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

54

claimed in this invention. In a preferred embodiment of the invention, antibodies will immunoprecipitate OBCAM or NTM proteins from solution as well as react with OBCAM or NTM protein on Western or immunoblots of polyacrylamide gels. In another preferred embodiment, antibodies will
5 detect OBCAM or NTM proteins in paraffin or frozen tissue sections, using immunocytochemical techniques.

Preferred embodiments relating to methods for detecting OBCAM or NTM or its mutations include enzyme linked immunosorbent assays (ELISA),
10 radioimmunoassay (RIA), immunoradiometric assays (IRMA) and immunoenzymatic assays (IEMA), including sandwich assays using monoclonal and/or polyclonal antibodies. Exemplary sandwich assays are described by David *et al* in US Patent Nos. 4,376,110 and 4,486,530, hereby incorporated by reference.

15 The cellular location of OBCAM or NTM may readily be determined using methods known in the art such as immunocytochemistry in which a labelled antibody (for example, radioactively or fluorescently labelled antibody) is used to bind to OBCAM or NTM and its location within the cell is
20 determined microscopically. For example, it is possible using this methodology to determine whether the OBCAM or NTM is located in the cytoplasm or in the plasma membrane or, if located in both compartments, the proportion of OBCAM or NTM which is located in each compartment. A change in the location of OBCAM or NTM in a test sample compared to a
25 non-cancerous, normal control sample may be indicative of a cancerous state.

Methods for detecting altered cellular distribution include immunohistochemistry (IHC; for example, where the antibody or a

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

55

secondary antibody which recognises the first, is labelled with an enzyme, a fluorescent tag, a radioisotope) and computer-aided image analysis of IHC stained sections.

- 5 The relative activity of OBCAM or NTM can be determined by measuring the activity of the OBCAM or NTM polypeptide per unit mass of sample tissue or per unit number of sample cells and comparing this activity to the activity of the OBCAM or NTM polypeptide per unit mass of known normal tissue or per unit number of normal cells. The relative amount may be
- 10 determined using any suitable assay of OBCAM or NTM activity. Preferably, the assay is selective for the OBCAM or NTM polypeptide activity.

- The activity of the NTM and OBCAM genes include tumour suppressor
- 15 activity, neuronal axon guidance, promotion of cellular aggregation and an, as yet poorly defined, cell signalling function.

- The invention also provides an antibody which reacts with a mutant OBCAM or NTM polypeptide or fragment thereof, wherein said mutant
- 20 OBCAM or NTM is a mutant found in a cancer cell. Preferably, the antibody does not react with wild-type OBCAM or NTM polypeptide. Such antibodies are useful in the diagnostic assays and methods of the invention and may be made, for example, by using peptides whose sequence is derived from mutant OBCAM or NTM polypeptide as immunogens. An example of
- 25 an OBCAM mutant is described in Example 5 and shown in Figure 18.

The invention also provides a nucleic acid which selectively hybridises to a nucleic acid encoding a mutant OBCAM or NTM polypeptide, which

mutant is one found in a cancer cell. Such nucleic acids are useful in the diagnostic assays and methods of the invention.

It will be appreciated that in respect of the certain nucleic acid-based methods of diagnosis, determination of susceptibility and prediction of relative prospects of outcome, the methods involve determining whether the status of OBCAM or NTM nucleic acid (whether DNA or mRNA) is altered in a sample being tested compared to a sample from an equivalent tissue or other source which is known to be normal or disease free.

Peptides based on the mutant sequences may be useful in stimulating an immune response.

A further aspect of the invention provides a method of treating cancer in a patient comprising the step of administering to the patient an agonist of OBCAM or NTM activity. The agonist may function by binding to the external aspect of the cell membrane, for example to the GPI anchor) and interacting with the normal targets of OBCAM or NTM. The agonist may be an antibody or antibody fragment, as known to those skilled in the art or may be a small molecule, for example of less than 5000 Da.

Since OBCAM and NTM are extracellular molecules, a mimetic that reconstitutes their function by binding on the extracellular portion of the cell membrane could achieve the same effect as gene therapy transducing a full-length cDNA. In other words, tumour suppressor gene function in a patient may be reconstituted by administering a small molecule therapeutic to the patient.

A further aspect of the invention provides a method of treating cancer in a patient comprising the step of administering to the patient a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM or NTM gene or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM or NTM cDNA.

5

A further aspect of the invention provides a method of treating cancer in a patient comprising the step of administering to the patient a nucleic acid which encodes the OBCAM and/or NTM polypeptide or a functional variant or portion or fusion thereof.

10

The invention also includes the administration of all or part of the OBCAM and/or NTM gene or cDNA to a patient with a cancer. Preferably, the cancer to be treated in ovarian cancer or colorectal cancer.

15 Suitably, the nucleic acid which is administered to the patient is a nucleic acid which encodes the OBCAM and/or NTM polypeptide or a functional variant or portion thereof. Preferably, the OBCAM and/or NTM polypeptide is a wild-type polypeptide or a variant polypeptide which has substantially wild-type activities. It is less preferred if the OBCAM and/or
20 NTM polypeptide is a polypeptide with mutations which are found in cancer cells such as ovarian cancer cells; however, such polypeptides may be useful in provoking an anti-cancer cell immune response. Thus, according to the present invention, a method is also provided of supplying wild-type OBCAM and/or NTM function to a cell which carries mutant OBCAM
25 and/or NTM alleles. Supplying such a function should suppress neoplastic growth of the recipient cells. The wild-type OBCAM and/or NTM gene or a part of the gene may be introduced into the cell in a vector such that the gene remains extrachromosomal. In such a situation, the gene will be expressed by the cell from the extrachromosomal location. If a gene

fragment is introduced and expressed in a cell carrying a mutant OBCAM and/or NTM allele, the gene fragment should encode a part of the OBCAM and/or NTM protein which is required for non-neoplastic growth of the cell. More preferred is the situation where the wild-type OBCAM and/or NTM gene or a part thereof is introduced into the mutant cell in such a way that it recombines with the endogenous mutant OBCAM and/or NTM gene present in the cell. Such recombination requires a double recombination event which results in the correction of the OBCAM and/or NTM gene mutation. Vectors for introduction of genes both for recombination and for extrachromosomal maintenance are known in the art, and any suitable vector may be used. Methods for introducing DNA into cells such as electroporation, calcium phosphate co-precipitation and viral transduction are known in the art, and the choice of method is within the competence of the suitably skilled person. Cells transformed with the wild-type OBCAM and/or NTM gene can be used as model systems to study cancer remission and drug treatments which promote such remission.

As generally discussed above, the OBCAM and/or NTM gene or fragment, where applicable, may be employed in gene therapy methods in order to increase the amount of the expression products of such genes in cancer cells. Such gene therapy is particularly appropriate for use in both cancerous and pre-cancerous cells, in which the level of OBCAM and/or NTM polypeptide is absent or diminished or otherwise changed compared to normal cells. It may also be useful to increase the level of expression of a OBCAM and/or NTM gene even in those tumour cells in which the mutant gene is expressed at a "normal" level, but the gene product is not fully functional or has an altered function.

Gene therapy may be carried out according to generally accepted methods, for example, as described by Friedman, 1991. Cells from a patient's tumour may be first analyzed by the diagnostic methods described herein, to ascertain the production of OBCAM and/or NTM polypeptide and its physical form (i.e. what mutations it contains) in the tumour cells. A virus or plasmid vector (see further details below), containing a copy of the OBCAM and/or NTM gene linked to expression control elements and capable of replicating inside the tumour cells, is prepared. Suitable vectors are known, such as disclosed in US Patent 5,252,479 and PCT published application WO 93/07282. The vector is then injected into the patient, either locally at the site of the tumour or systemically (in order to reach any tumour cells that may have metastasised to other sites). If the transfected gene is not permanently incorporated into the genome of each of the targeted tumour cells, the treatment may have to be repeated periodically.

Gene transfer systems known in the art may be useful in the practice of the gene therapy methods of the present invention. These include viral and nonviral transfer methods. A number of viruses have been used as gene transfer vectors, including papovaviruses, e.g. 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), vaccinia virus (Moss, 1992), adeno-associated virus (Muzyczka, 1992; Ohi *et al.*, 1990), herpesviruses including HSV and EBV (Margolskee, 1992; Johnson *et al.*, 1992; Fink *et al.*, 1992; Breakfield and Geller, 1987; Freese *et al.*, 1990), and retroviruses of avian (Brandyopadhyay and Temin, 1984; Petropoulos *et al.*, 1992), murine (Miller, 1992; Miller *et al.*, 1985; Sorge *et al.*, 1984; Mann and Baltimore, 1985; Miller *et al.*, 1988), and human origin (Shimada *et al.*, 1991; Helseth *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1990; Buchschacher and Panganiban, 1992). To date

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

60

most human gene therapy protocols have been based on disabled murine retroviruses.

It may be preferred, particularly in relation to OBCAM, that the gene
5 therapy vector is not a vaccinia virus vector.

Nonviral gene transfer methods known in the art include chemical techniques such as calcium phosphate coprecipitation (Graham and van der Eb, 1973; Pellicer *et al.*, 1980); mechanical techniques, for example
10 microinjection (Anderson *et al.*, 1980; Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981; Constantini and Lacy, 1981); membrane fusion-mediated transfer via liposomes (Felgner *et al.*, 1987; Wang and Huang, 1989; Kaneda *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1992; Nabel *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1992); and direct DNA
15 uptake and receptor-mediated DNA transfer (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). Viral-mediated gene transfer can be combined with direct *in vivo* gene transfer using liposome delivery, allowing one to direct the viral vectors to the tumour cells and not into the surrounding nondividing cells.
20 Alternatively, the retroviral vector producer cell line can be injected into tumours (Culver *et al.*, 1992). Injection of producer cells would then provide a continuous source of vector particles. This technique has been approved for use in humans with inoperable brain tumours.

25 Other suitable systems include the retroviral-adenoviral hybrid system described by Feng *et al.* (1997) *Nature Biotechnology* 15, 866-870, or viral systems with targeting ligands such as suitable single chain Fv fragments.

In an approach which combines biological and physical gene transfer methods, plasmid DNA of any size is combined with a polylysine-conjugated antibody specific to the adenovirus hexon protein, and the resulting complex is bound to an adenovirus vector. The trimolecular
5 complex is then used to infect cells. The adenovirus vector permits efficient binding, internalization, and degradation of the endosome before the coupled DNA is damaged.

Liposome/DNA complexes have been shown to be capable of mediating
10 direct *in vivo* gene transfer. While in standard liposome preparations the gene transfer process is nonspecific, localized *in vivo* uptake and expression have been reported in tumour deposits, for example, following direct *in situ* administration (Nabel (1992) *Hum. Gene Ther.* 3, 399-410).

15 Gene transfer techniques which target DNA directly to ovarian tissue, e.g. epithelial cells of the ovaries, is preferred. Receptor-mediated gene transfer, for example, is accomplished by the conjugation of DNA (usually in the form of covalently closed supercoiled plasmid) to a protein ligand *via* polylysine. Ligands are chosen on the basis of the presence of the
20 corresponding ligand receptors on the cell surface of the target cell/tissue type. These ligand-DNA conjugates can be injected directly into the blood if desired and are directed to the target tissue where receptor binding and internalization of the DNA-protein complex occurs. To overcome the problem of intracellular destruction of DNA, coinfection with adenovirus
25 can be included to disrupt endosome function.

In the case where replacement gene therapy using a functionally wild-type OBCAM and/or NTM is used, it may be useful to monitor the treatment by detecting the presence of OBCAM and/or NTM mRNA or polypeptide, or

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

62

functional OBCAM and/or NTM, at various sites in the body, including the targeted tumour, sites of metastasis, blood serum, and bodily secretions/excretions, for example urine.

- 5 A still further aspect of the invention provides a gene therapy vector which is capable of expressing the OBCAM and/or NTM polypeptide or a functional fragment or variant or fusion thereof in a mammalian cell. Typically, the functional fragment or variant or portion or fusion of the OBCAM or NTM polypeptide has the tumour-suppressing activities of
10 wild-type OBCAM or NTM respectively.

The tumour suppressing activity of OBCAM is shown in Figure 14, and described in more detail in Example 3.

- 15 Preferably, the vector is one which can replicate in a human cell. Preferably, the vector is one which has been described in more detail above in connection with the gene therapy aspects of the invention.

- A further aspect of the invention provides a method of treating cancer in a
20 patient comprising the step of administering to the patient an effective amount of OBCAM and/or NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof (or other agonist of OBCAM and/or NTM activity, as noted above) to ameliorate the cancer.

- 25 Peptides which have OBCAM or NTM activity can be supplied to cells which carry mutant or missing OBCAM or NTM alleles. The sequence of the OBCAM or NTM protein is disclosed in Figures 7 and 8 or 9 respectively. Protein can be produced by expression of the cDNA sequence in bacteria, for example, using known expression vectors. Alternatively,

OBCAM or NTM polypeptide can be extracted from OBCAM-producing or NTM-producing mammalian cells. In addition, the techniques of synthetic chemistry can be employed to synthesize OBCAM or NTM protein. Any of such techniques can provide the preparation of the present invention which
5 comprises the OBCAM or NTM protein. The preparation is substantially free of other human proteins. This is most readily accomplished by synthesis in a microorganism or *in vitro*.

The OBCAM or NTM gene or cDNA can be expressed by any suitable
10 method. Generally, the DNA is inserted into an expression vector, such as a plasmid, in proper orientation and correct reading frame for expression. If necessary, the DNA may be linked to the appropriate transcriptional and translational regulatory control nucleotide sequences recognised by the desired host, although such controls are generally available in the expression
15 vector. The vector is then introduced into the host through standard techniques. Generally, not all of the hosts will be transformed by the vector. Therefore, it will be necessary to select for transformed host cells. One selection technique involves incorporating into the expression vector a DNA sequence, with any necessary control elements, that codes for a selectable
20 trait in the transformed cell, such as antibiotic resistance. Alternatively, the gene for such selectable trait can be on another vector, which is used to co-transform the desired host cell.

Host cells that have been transformed by the recombinant DNA of the
25 invention are then cultured for a sufficient time and under appropriate conditions known to those skilled in the art in view of the teachings disclosed herein to permit the expression of the polypeptide, which can then be recovered.

Many expression systems are known, including bacteria (for example *E. coli* and *Bacillus subtilis*), yeasts (for example *Saccharomyces cerevisiae*), filamentous fungi (for example *Aspergillus*), plant cells, animal cells and insect cells.

5

The vectors include a prokaryotic replicon, such as the ColE1 *ori*, for propagation in a prokaryote, even if the vector is to be used for expression in other, non-prokaryotic, cell types. The vectors can also include an appropriate promoter such as a prokaryotic promoter capable of directing the expression (transcription and translation) of the genes in a bacterial host cell, such as *E. coli*, transformed therewith.

A promoter is an expression control element formed by a DNA sequence that permits binding of RNA polymerase and transcription to occur. Promoter sequences compatible with exemplary bacterial hosts are typically provided in plasmid vectors containing convenient restriction sites for insertion of a DNA segment of the present invention.

Typical prokaryotic vector plasmids are pUC18, pUC19, pBR322 and pBR329 available from Biorad Laboratories, (Richmond, CA, USA) and pTrc99A and pKK223-3 available from Pharmacia, Piscataway, NJ, USA.

A typical mammalian cell vector plasmid is pSVL available from Pharmacia, Piscataway, NJ, USA. This vector uses the SV40 late promoter to drive expression of cloned genes, the highest level of expression being found in T antigen-producing cells, such as COS-1 cells.

An example of an inducible mammalian expression vector is pMSG, also available from Pharmacia. This vector uses the glucocorticoid-inducible

promoter of the mouse mammary tumour virus long terminal repeat to drive expression of the cloned gene.

Useful yeast plasmid vectors are pRS403-406 and pRS413-416 and are
5 generally available from Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037,
USA. Plasmids pRS403, pRS404, pRS405 and pRS406 are Yeast
Integrating plasmids (YIps) and incorporate the yeast selectable markers
HIS3, *TRP1*, *LEU2* and *URA3*. Plasmids pRS413-416 are Yeast
Centromere plasmids (YCps)

10 A variety of methods have been developed to operably link DNA to vectors
via complementary cohesive termini. For instance, complementary
homopolymer tracts can be added to the DNA segment to be inserted to the
vector DNA. The vector and DNA segment are then joined by hydrogen
15 bonding between the complementary homopolymeric tails to form
recombinant DNA molecules.

Synthetic linkers containing one or more restriction sites provide an
alternative method of joining the DNA segment to vectors. The DNA
20 segment, generated by endonuclease restriction digestion as described
earlier, is treated with bacteriophage T4 DNA polymerase or *E. coli* DNA
polymerase I, enzymes that remove protruding, 3'-single-stranded termini
with their 3'-5'-exonucleolytic activities, and fill in recessed 3'-ends with
their polymerizing activities.

25 The combination of these activities therefore generates blunt-ended DNA
segments. The blunt-ended segments are then incubated with a large molar
excess of linker molecules in the presence of an enzyme that is able to
catalyze the ligation of blunt-ended DNA molecules, such as bacteriophage

T4 DNA ligase. Thus, the products of the reaction are DNA segments carrying polymeric linker sequences at their ends. These DNA segments are then cleaved with the appropriate restriction enzyme and ligated to an expression vector that has been cleaved with an enzyme that produces
5 termini compatible with those of the DNA segment.

A still further aspect of the invention provides a method of treating cancer in a patient comprising the step of administering to the patient an effective amount of a compound which inhibits the function of a mutant OBCAM or
10 NTM polypeptide found in a tumour cell, or which upregulates expression of wild-type OBCAM or NTM polypeptide.

Suitable compounds for use in this method of the invention include antibodies or fragments or variants thereof which inhibit the activity of the
15 mutant OBCAM or NTM, or antisense molecules which inhibit the expression of the mutant OBCAM and/or NTM.

Also suitable (though less preferred) are methylation inhibitors; as described below and in the Example, the OBCAM and NTM genes are methylated in
20 cancer, and inhibition of this methylation by administering a methylation inhibitor may upregulate expression of the wild type gene or genes. Methylation inhibitors are known in the art and include the compound azacytidine. Other methylation inhibitors include 5 deoxy-azacytidine, or antisense oligos to DNA methyltransferases.

25 A further aspect of the invention provides a method of treating a cancer in which the OBCAM and/or NTM gene is methylated in a patient comprising the step of administering to the patient an effective amount of a compound which decreases or inhibits DNA methylation.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

67

As discussed below, inhibition of methylation may remove the methyl groups which cause a decrease in expression of the OBCAM and/or NTM genes, which decrease of expression can cause cancer. Hence, decreasing
5 the methylation of OBCAM and/or NTM in cancer cells will increase the expression of OBCAM and/or NTM and may remove, or reduce the rate of, the uncontrolled growth of the cancer cells.

A yet further aspect of the invention provides a method for increasing the
10 expression of the OBCAM and/or NTM gene in a cell comprising the step of administering to the cell an effective amount of a compound which decreases or inhibits DNA methylation.

It may be beneficial to administer the compound in combination with other
15 therapeutic agents indicated herein.

In a preferred embodiment, the cell is one within a patient. It is more preferred if the cell is a cancer or tumour cell within the patient.

20 Compounds which inhibit the function of a mutant OBCAM or NTM polypeptide found in a tumour cell, or which upregulate expression of wild-type OBCAM or NTM polypeptide or which otherwise act as OBCAM or NTM agonists may be obtained by screening.

25 Screening compounds by using the OBCAM and/or NTM polypeptide or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques may be used.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

68

The OBCAM and/or NTM polypeptide or fragment or a mutant thereof found in a tumour cell employed in such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, or borne on a cell surface. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant polynucleotides expressing the polypeptide or fragment, preferably in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays. One may measure, for example, for the formation of complexes between an OBCAM or NTM polypeptide or fragment and the agent being tested, or examine the degree to which the formation of a complex between an OBCAM or NTM polypeptide, or fragment and a known ligand is interfered with by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs comprising contacting such an agent with an OBCAM or NTM polypeptide or fragment thereof or a mutant thereof found in a tumour cell and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the OBCAM or NTM polypeptide or fragment or mutant, or (ii) for the presence of a complex between the OBCAM or NTM polypeptide or fragment or mutant and a ligand, by methods well known in the art. In such competitive binding assays the OBCAM or NTM polypeptide or fragment or mutant is typically labelled. Free OBCAM or NTM polypeptide or fragment or mutant is separated from that present in a protein:protein complex and the amount of free (i.e. uncomplexed) label is a measure of the binding of the agent being tested to OBCAM or NTM or its interference with OBCAM or NTM:ligand binding, respectively.

Drugs which are able to correct mutant OBCAM and/or NTM function (so that the wild-type function is restored) or that mimic wild-type OBCAM

and/or NTM function, are believed to be useful. Similarly, drugs which promote expression of wild-type OBCAM and/or NTM are believed to be useful.

- 5 Expression of wild-type OBCAM and/or NTM may be promoted by removing an inhibition of the expression. For example, expression of OBCAM and NTM is inhibited by methylation of CpG islands within the respective genes. Administration of a methylation inhibitor such as azacytidine, 5 deoxy-azacytidine, or antisense oligos to DNA
- 10 methyltransferases, prevents methylation of the CpG islands and thereby promotes expression of the genes. Hence, a method of upregulating expression of wild-type OBCAM or NTM polypeptide in a patient comprises administering a methylation inhibitor.
- 15 Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to the OBCAM or NTM polypeptides and is described in detail in Geysen, PCT published application WO 84/03564, published on September 13, 1984. Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on
- 20 a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with OBCAM or NTM polypeptide and washed. Bound OBCAM or NTM polypeptide is then detected by methods well known in the art.
- 25 Purified OBCAM or NTM can be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to capture antibodies to immobilize the OBCAM or NTM polypeptide on the solid phase.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

70

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of specifically binding the OBCAM or NTM polypeptide compete with a test compound for binding to the OBCAM or NTM polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants of the OBCAM or NTM polypeptide.

A further technique for drug screening involves the use of host eukaryotic cell lines or cells (such as described above) which have a mutant OBCAM and/or NTM gene. These host cell lines or cells are defective at the OBCAM and/or NTM polypeptide level. The host cell lines or cells are grown in the presence of drug compound. The rate of growth of the host cells is measured to determine if the compound is capable of regulating the growth of OBCAM and/or NTM defective cells.

Screens may also be derived which make use of the OBCAM or NTM promoter sequence operatively linked to a reporter gene. Compounds which selectively increase the expression of the reporter gene may be usefully selected.

Additionally or alternatively, rational drug design may be used. The goal of rational drug design is to produce structural analogues of biologically active polypeptides of interest or of small molecules with which they interact (e.g. agonists, antagonists, inhibitors) in order to fashion drugs which are, for example, more active or stable forms of the polypeptide, or which, e.g. enhance or interfere with the function of a polypeptide *in vivo*. See, e.g. Hodgson, 1991. In one approach, one first determines the three-dimensional structure of a protein of interest (e.g. OBCAM or NTM polypeptide) or, for example, of the OBCAM or NTM ligand complex, by x-ray crystallography,

by computer modelling or most typically, by a combination of approaches. Less often, useful information regarding the structure of a polypeptide may be gained by modelling based on the structure of homologous proteins. An example of rational drug design is the development of HIV protease inhibitors (Erickson *et al* (1990) *Science* **249**, 527-533). In addition, peptides (e.g. OBCAM and NTM polypeptide) are analyzed by an alanine scan (Wells (1991) *Methods Enzymol.* **202**, 390-411). In this technique, an amino acid residue is replaced by Ala, and its effect on the peptide's activity is determined. Each of the amino acid residues of the peptide is analyzed in this manner to determine the important regions of the peptide.

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by a functional assay, and then to solve its crystal structure. In principle, this approach yields a pharmacophore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of the anti-ids would be expected to be an analogue of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced banks of peptides. Selected peptides would then act as the pharmacophore.

Thus, one may design drugs which have, for example, improved OBCAM and/or NTM polypeptide activity or stability or which act as inhibitors, agonists, antagonists, etc of OBCAM and/or NTM polypeptide activity. By virtue of the availability of cloned OBCAM and NTM sequences, sufficient amounts of the OBCAM and NTM polypeptide may be made available to perform such analytical studies as x-ray crystallography. In addition, the knowledge of the OBCAM and NTM protein sequence provided herein will

guide those employing computer modelling techniques in place of, or in addition to x-ray crystallography.

Cells and animals which carry a mutant OBCAM and/or NTM allele can be used as model systems to study and test for substances which have potential as therapeutic agents. The cells are typically cultured epithelial cells. These may be isolated from individuals with OBCAM and/or NTM mutations, either somatic or germline. Alternatively, the cell line can be engineered to carry the mutation in the OBCAM and/or NTM allele, using methods well known in the art. After a test substance is applied to the cells, the neoplastically transformed phenotype of the cell is determined. Any trait of neoplastically transformed cells can be assessed, including anchorage-independent growth, tumourigenicity in nude mice, invasiveness of cells, and growth factor dependence. Assays for each of these traits are known in the art.

Animals for testing therapeutic agents can be selected after mutagenesis of whole animals or after treatment of germline cells or zygotes. Such treatments include insertion of mutant OBCAM and/or NTM alleles, usually from a second animal species, as well as insertion of disrupted homologous genes. Alternatively, the endogenous OBCAM and/or NTM gene(s) of the animals may be disrupted by insertion or deletion mutation or other genetic alterations using conventional techniques (Capecchi, 1989; Valancius and Smithies, 1991; Hasty *et al*, 1991; Shinkai *et al*, 1992; Mombaerts *et al*, 1992; Philpott *et al*, 1992; Snouwaert *et al*, 1992; Donchower *et al*, 1992). After test substances have been administered to the animals, the growth of tumours must be assessed. If the test substance prevents or suppresses the growth of tumours, then the test substance is a candidate therapeutic agent for the treatment of the cancers identified herein. These animal models

provide an extremely important testing vehicle for potential therapeutic products.

Active OBCAM and/or NTM molecules can be introduced into cells by microinjection or by use of liposomes, for example. Alternatively, some active molecules may be taken up by cells, actively or by diffusion. Extracellular application of the OBCAM and/or NTM gene product may be sufficient to affect tumour growth. Supply of molecules with OBCAM and/or NTM activity should lead to partial reversal of the neoplastic state.

Other molecules with OBCAM and/or NTM activity (for example, peptides, drugs or organic compounds) may also be used to effect such a reversal. Modified polypeptides having substantially similar function are also used for peptide therapy.

Further aspects of the invention provide a pharmaceutical composition comprising a gene therapy vector including a nucleic acid which encodes the OBCAM and/or NTM polypeptide or a functional variant or portion or fusion thereof and pharmaceutically acceptable carrier; a pharmaceutical composition comprising a gene therapy vector including a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM and/or NTM gene, or a mutant allele thereof, or a OBCAM and/or NTM cDNA, or a mutant allele thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier; a pharmaceutical composition comprising OBCAM and/or NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

Suitable gene therapy vectors are described above. Suitable OBCAM and NTM polypeptides are described above. As noted above, it is preferred, particularly in relation to OBCAM, that the gene therapy vector is not a vaccinia virus vector.

By "pharmaceutically acceptable" is included that the formulation is sterile and pyrogen free. Suitable pharmaceutical carriers are well known in the art of pharmacy.

5

The present invention will now be described in more detail with reference to the following, non limiting, Examples and Figures.

Figure 1

10 BAC contig map of the 11q25 region containing the NTM and OBCAM genes, organised according to physical position. The relative position of relevant microsatellite markers is shown. Not to scale

Figure 2.

15 Relationship of discrete LOH regions on chromosome 11q24-q25 showing the Barx2 region (region2) and the OBCAM/NTM region (region 5)

Figure 3.

20 LOH rates for microsatellite markers relating to figure 2 from centromere to telomere for ovarian and colorectal cancer.

Figure 4.

This Figure shows how the markers have been reordered and documents the number of cases with LOH as a percentage of the number of informative cases for each marker. 66% (43/65) of the ovarian tumours and 69% (27/39) of the colorectal tumours had LOH involving at least 1 locus within the 11q24-q25 region. 8 tumours in each group had LOH at all informative loci.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

75

Figure 5

Examples of D11S4085 LOH. 2 cases with retention of both alleles in blood and complete loss of an allele in ovarian cancer tissue

- 5 This example of LOH profile at D11S4085 shows retention of heterozygosity at the flanking microsatellite markers D11S874 (centromeric) and D11S969 (telomeric). Markers were amplified by PCR (with one primer for each marker labelled with a fluorescent dye) from Normal (N) and Tumour (T) DNA from two patients with ovarian cancer.
- 10 PCR products (fluorescently labelled) were size separated on an ABI310 Genetic Analyzer, detected by a laser and data analysed with ABI GeneScan software. The peaks represent the pattern of alleles for each of the markers in the Normal and Tumour DNA for the two patients, Patient 1 and Patient 2. Comparing the allele pattern for D11S4085 between N and T for each
- 15 patient shows two alleles (heterozygosity) present in the Normal DNA, whereas only a single allele is present in the Tumour DNA, indicating that loss of heterozygosity has occurred. Allele loss has been complete in both cases, indicating a lack of heterogeneity in the Tumour sample. This suggests that loss of the D11S4085 is an early event in the ovarian
- 20 carcinogenesis. In contrast, the heterozygous allele patterns for the two flanking markers are unchanged between Normal and Tumour for each of the two patients, representing retention of heterozygosity.

Figure 6

- Representative sample of 13 cases of ovarian cancer showing the
- 25 methylation status for OBCAM and neurotrimin, and the concordance and discordance rates for both within individuals and across the sample.

M = methylated

U = unmethylated

C = concordant

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

76

D = discordant

Figure 7. The nucleotide sequence of human OBCAM cDNA with the encoded amino acid sequence. The sequence corresponds to GenBank database entry No NM_002545.

Figure 8.
The nucleotide sequence of human Neurotrimin (NTM) cDNA with the encoded amino acid sequence. The sequence corresponds to GenBank database entry No NM_016522.

Figure 9.
NTM isoform sequences. The predominant form in normal human ovarian surface epithelium is the +33bp form (about 69%). The +69bp form is another alternative form that is a minor isoform (about 19%), compared with the database wild type sequence that forms about 4%. A further minor isoform contains an additional 108bp, which would be predicted to result in premature protein translation termination and a resultant truncated NTM protein isoform.

The +33bp form contains an inserted nucleotide sequence of 33bp, which is derived from a single alternative exon within the NTM gene. This exon is one of the two exons that contributes to the 69bp insertion (see below). Shown is the nucleotide sequence with protein translation (below the nucleotide sequence) of the ovarian surface epithelium +33bp isoform of human neurotrimin. The additional 33bp of nucleotide sequence and resultant in-frame 11 amino acids are shown in underlined bold in the context of the wild type human NTM sequence (Genbank NM_015622). The stop codon is denoted by *. The in-frame insertion results in the

inclusion of an additional 11 amino acids near the C-terminus of the NTM protein: EVKTTALTPWK.

5 The +69bp form contains an inserted nucleotide sequence of 69bp, which is derived from splicing of 2 alternative exons within the NTM gene. Shown is the nucleotide sequence with protein translation (below the nucleotide sequence) of the ovarian surface epithelium +69bp isoform of human NTM. The additional 69bp of nucleotide sequence and resultant in-frame 23 amino acids are shown in underlined bold in the context of the wild type human
10 NTM sequence (Genbank NM_015622). The stop codon is denoted by *. The in-frame insertion results in the inclusion of an additional 23 amino acids near the C-terminus of the NTM protein: ELNEPTSSTLLQEVKTTALTPWK.

15 The +108bp form contains an inserted nucleotide sequence of 108bp, which is derived from splicing of 3 alternative exons within the NTM gene. Shown is the nucleotide sequence with protein translation (below the nucleotide sequence) of the ovarian surface epithelium +108bp isoform of human NTM. The additional 108bp of nucleotide sequence would be predicted to result in premature protein translation termination and a resultant truncated
20 NTM protein isoform lacking the GPI anchor attachment site in the carboxy terminus. The truncated protein, therefore, would be predicted not to be anchored to the cell membrane via a GPI anchor. This isoform may therefore represent a soluble form of NTM, which might be located
25 extracellularly, and which may potentially interfere with or modulate the normal function of GPI-anchored NTM. The additional 108bp of nucleotide sequence and protein translation are shown in underlined bold text in the context of the wild type human NTM sequence (Genbank NM_015622). The stop codons are denoted by *.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

78

Figure 10. IgLONs are highly expressed in normal ovary

OBCAM and NTM full length coding sequence RT-PCR of multi tissue cDNA panel (BD Clontech) with the addition of a normal ovary sample prepared at ICRF Medical Oncology Unit, Edinburgh, UK. Strongest expression of both genes is observed in brain and the normal ovary samples prepared in-house (i.e. not the Clontech cDNA panel).

Primer sequences:

10 OBCAM:

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

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

15 OBCAM nucleotide numbering from NM_002545

NTM:

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

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

20 NTM nucleotide numbering from NM_016522

Figure 11. IgLON Re-expression

MDAMB23.1 and T47D cancer cell lines were cultured in the presence (+) or absence (-) of azacytidine for 4 days plus TSA (Aza/TSA) for the fourth day. OBCAM and NTM RT-PCR shows re-expression of OBCAM in MDAMB23.1 cell line, and NTM re-expression in MDAMB23.1 and T47D cell lines. Reverse transcriptase minus controls are included. NTM RT-PCR shows re-expression of multiple neurotrimin isoforms.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

79

Primers used were:

OBCAM:

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

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

OBCAM nucleotide numbering from NM_002545

NTM:

NTM F3: 5'-ACATGACTATGGGAACTACA-3' nucs 1125-1144

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

NTM nucleotide numbering from NM_016522

Figure 12. Representative primers useful in detecting methylation of the OBCAM and NTM genes.

15

Figure 13. Demethylation and re-expression of OBCAM in SKNV3.3 cells following 5'-aza 2'-deoxycytidine (AZA) exposure. CON are control untreated SKNV3.3 cells. Mix is a control PCR reaction containing all components except template DNA.

20

Upper panel: OBCAM RT-PCR of 1st strand cDNA prepared from SKNV3.3 cells after 4 days in culture in the presence (AZA) or absence (CON) of 20µM 5'-aza 2'-deoxycytidine. Mix refers to a control PCR reaction containing all reaction components except template DNA. OBCAM
25 PCR products were then transferred onto a nylon membrane and hybridised with an OBCAM probe. OBCAM expression is clearly evident following exposure to AZA but is absent in control cells. Lower panel: Actin RT-PCR of 1st strand cDNA of same cell lines as a control for integrity of samples. Actin expression is similar in both treated and untreated SKNV3.3 cells.

Figure 14. OBCAM transfection into SKVN3.3 cells suppresses sub-cutaneous tumour growth in nude mice.

- 5 Graph of the mean tumour volume (cm^3) of tumours in nude mice following sub-cutaneous injection of OBCAM sense transfected and control SKVN3.3 cells. Tumour volumes were measured weekly for 4 weeks. The difference in s.c. tumour growth is statistically significant.

- 10 Figure 15. OBCAM transfection into SKVN3.3 cells enhances cell aggregation.

Graph of the number of single cells remaining in cultures of OBCAM sense transfected, OBCAM antisense transfected, and parent SKNV3.3 cells measured with a haemocytometer at timed intervals. The expression of OBCAM results in a reduced number of single cells remaining in culture, equating with an observed enhanced rate of cell aggregation.

15

Figure 16. Predicted Exon Structure of the Human OBCAM Gene.

20

The exonic sequence is highlighted in bold and intron sequence flanking the exons is in plain text. Nucleotide numberings relate to corresponding to GenBank database sequences as follows. Exon 1, refers to AC027631.4; Exon 2, refers to AC012234.6; Exons 3-7, refers to AP000843.3. The nucleotide sequence for Exon 1 is incomplete in the area encompassing the exon/intron 1 boundary due to lack of available Human Genome Project Sequence in GenBank Accession AC027631.4. Sense and antisense PCR primers for SSCPE are highlighted with single and double underlining, respectively. Predicted exon sizes are given.

25

Figure 17. PEO4 contains a somatic mutation for OBCAM in Exon 2.

5 Sequence trace files of OBCAM exon 2 F1/R1 SSCPE PCR products from PEO4 and PEO4 Fibroblast DNA obtained using OBCAM EX2 F1 as the sequencing primer. PEO4 Fibroblasts are homozygous for a C nucleotide at the marked position (*); PEO4 is heterozygous at this position and has both C and G alleles.

10 Figure 18. PEO4 contains a somatic mis-sense mutation for OBCAM

15 Ex-Pasy translation of the two alleles identified from the nucleotide sequence the PEO4 OBCAM EX2 F1/R1 SSCPE PCR products, predicts a proline (P) to arginine (R) mis-sense mutation. Somatic nucleotide change: c to g at nucleotide position 75365 (AP000843.3)/ 334 (NM_002545.2) results in an amino acid substitution: arginine (R) for proline (P) at position 95 (immature protein numbering), within the first immunoglobulin domain of OBCAM.

20 PEO4 Fibroblasts are homozygous for the wild type proline allele, whereas PEO4 (and PEO1 and PEO1CDDP) are heterozygous for the wild type and mutated sequence, containing both the wild type proline and somatic arginine mis-sense mutation. Wild type refers to the reference sequence as contained in the GenBank sequences

25 Nucleotide sequence of wild type OBCAM and of sequence containing a somatic mutation are each shown below their respective protein translation (single letter amino acid code). Affected nucleotides and amino acids are

shown in bold. Wild type refers to the reference sequence as contained in the GenBank database (NM_002545.2 and AP 000843.3).

Figure 19. OBCAM CpG Island Bisulphite Sequencing

5

The nucleotide sequence of the predicted CpG island of OBCAM, corresponding to nucleotides 53134-54032 (GenBank Accession No. AC027631.4) is shown. The locations of the PCR primers designed to specifically amplify a 529bp product from sodium bisulphite modified

10 Methylated (M) or Unmethylated (U) DNA are shown in italics, and their sequences detailed below. The PCR product amplified is emboldened, with surrounding sequence in plain text. Methylatable C nucleotides from CpGs are underlined.

15 Primers:

Sodium bisulphite modified methylated DNA specific:

OBCAM F1M: 5'-AGGCGTTTAGTGGAGGGGTACGGGC-3'

OBCAM R3M: 5'-TCCCGATACCGCCTCGAAACGAACG-3'

20

Sodium bisulphite modified unmethylated DNA specific:

OBCAM FIU: 5'-AGGTGTTTAGTGGAGGGGTATGGGT-3'

OBCAM R3U: 5'-TCCCAATACCACCTCAAACAAACA-3'

25

Figure 20. OBCAM CpG Island is methylated in ovarian tumours and unmethylated in normal ovary.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

83

Figure 21. OBCAM expression in SKNV3.3 almost completely abolishes tumorigenicity in *Nude* mice.

SKNV3.3 parent cell line and two examples of OBCAM-transfected re-expressing SKNV3.3 cell lines were injected intra-peritoneally (i.p.) into *Nude* mice: 3 injections per cell line with one injection per mouse. After 65 days, the mice were sacrificed and the tumours from the peritoneal cavity removed and photographed. The total amount of tumour present in the i.p. cavity is markedly diminished in mice injected with OBCAM transfected SKNV3.3 cells compared with the parent SKNV3.3 cells. This Figure show total tumour removed from three SKNV3.3 injected mice and from five mice injected with OBCAM-transfected SKNV3.3 cells: three from one OBCAM-transfected cell line and two from the second OBCAM-transfected cell line. No tumour was discernible in the third mouse injected with the second OBCAM-transfected SKNV3.3 cell line. The intra-peritoneal spread of tumours expressing OBCAM following OBCAM transfection is also greatly reduced compared to parent SKNV3.3 cells (not shown).

Example 1: The role of OBCAM and NTM in the progression of epithelial ovarian cancer (EOC)

11q24-q25 LOH Analysis of Ovarian Blood/Tumour paired DNAs

Fluorescently labelled polymorphic microsatellite markers selected from the chromosome 11q24-q25 region were PCR amplified from DNAs extracted from whole ovarian tumours and also from either blood or from normal ovarian tissue as a matched normal control. Markers used, in order from centromere to 11qter, were: 11cen-D11S910-D11S1320-D11S874-

D11S4085-D11S969-11qter. PCR amplified products were separated on an ABI 310 Genetic Analyzer using GeneScan software (PE Biosystems). LOH is defined as imbalance of 30% or greater difference between alleles in the tumour compared with normal tissues. The striking feature of LOH observed at D11S4085 is the completeness of LOH. This is unusual when one considers that the ovarian tumour DNA was extracted from whole tumour rather than from microdissected tissue. Tumour tissue would normally be regarded to contain a proportion of contaminating normal cells, e.g. stromal cells. However, as the loss is so complete in this case, we may infer from the lack of contaminating normal tissue that loss of the D11S4085 allele is an extremely early event in the process of ovarian carcinogenesis.

Physical mapping of the OBCAM/NTM region

OBCAM and Neurotrimin are the 11q24-q25 LOH-Associated Genes: Having identified regions of LOH, we next wanted to identify the genes from that region disrupted by LOH in ovarian cancer. In order to identify BAC clones from the 11q24-q25 region containing the markers used in the LOH study, their corresponding nucleotide sequences were used to BLAST search the Genbank HTGS database at NCBI. Of the markers used, all except D11S969 identified BAC clones in the homology search of the HTGS database. Nucleotide sequences from the corresponding BAC clones were then analysed using the Nucleotide Identify X (NIX) algorithm at the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre (HGMP-RC). NIX allows multiple bioinformatics programs to be performed simultaneously on a nucleotide sequence, such as BLAST searches against multiple databases, identifying nucleotide and protein translation homologies, performing exon predictions, CpG island predictions etc. NIX has allowed us to compile a

contig map of the region incorporating overlapping BAC clones, identifying the genes in the region and their positions relative to the markers in the study (Figure 1).

5 NIX has identified that the two highly related genes OBCAM and Neurotrimin are the only genes present within the region of LOH. The marker of highest LOH, D11S4085, is contained within OBCAM, whereas Neurotrimin spans two of the markers: D11S1320 and D11S874. OBCAM and NTM are highly related, sharing 80% and 76% nucleotide and protein
10 identity, respectively. In the mouse, their respective homologues are located near each other on a region of chromosome 9 syntenic with human chromosome 11q24-q25. It is likely, therefore, that the two genes have arisen as a consequence of a gene duplication event prior to the divergence of man and mouse. In man, the two genes are arranged in a 3'-3' orientation,
15 with convergent transcriptional directions (Figure 1).

OBCAM and NTM are expressed in Normal Ovarian Surface Epithelium (OSE) but not in Ovarian Cancer Cell Lines

20 We extracted RNA from cultured normal human OSE (HOSE), primary peroperatively stripped HOSE, and from total whole normal ovary. RT-PCR showed that both OBCAM and NTM are expressed in primary peroperatively stripped epithelium, whereas only NTM and not OBCAM expression is detectable in cultured HOSE. Expression of both was
25 detectable from whole ovary, despite the OSE comprising only a minor component of the total organ.

In contrast, expression of neither gene was evident to any substantial degree in a panel of RNAs isolated from ovarian, breast, lung, colon and pancreatic

cancer cell lines. By Northern blotting, expression was completely undetectable in all cell lines with two exceptions: CaOv3 (ovarian) and WX330 (small cell lung cancer), in which NTM expression was readily detectable. Interestingly, the size of NTM transcript in CaOv3 is smaller than that expected for full length NTM. RT-PCR analysis has indicated that the transcript is shorter than expected due to a 5' truncated mRNA, the precise extent of which is undetermined, and possibly arises as a result of 5' mutation coupled with the use of an intronic alternative promoter.

10 OBCAM and NTM CpG Islands are Methylated in Cell Lines and Correlates with Lack of Expression

The methylation status of both the OBCAM and NTM CpG islands was assessed by MS PCR with primer pairs to detect methylated and unmethylated alleles in a range of cancer cell lines of ovarian, breast, lung, colon and prostate origin. The results are presented in Tables 1 and 2. We assayed the same range of cell lines for the level of OBCAM and NTM expression by RT-PCR and compared the results with the methylation status determined in the MS PCR assay. A correlation between methylation of the respective CpG islands and the lack of detectable expression was found; conversely, lack of methylation correlates with gene expression. An exception to this correlation is the ovarian cancer cell line OAW28, which despite no apparent methylation, shows no expression of either gene. This may be attributable to methylation not detectable by this particular assay: it lies either outwith the region being amplified or alternatively between the MS PCR primers since MSP only detects the presence/absence of methylation at the primer binding site itself.

Table 1: NTM methylation status in cancer cell lines as determined by MS-PCR analysis.

- 5 FM=fully methylated
HM=hemimethylated
U=unmethylated

PE016	FM
PEA1	FM
PEA2	FM
OVCAR 4	FM
OVCAR 5	FM
OAW 42	FM
A2780	FM
SK-OV-3	FM
OVCAR 3	HM
PE01	HM
PEO1 CDDP	HM
PE04	HM
PE06	HM
PE014	HM
PE023	HM
OAW 28	U
59 M	U
CaOV3	U
MDA.MB.2	FM
31	
ZR75.1	FM
MCF7	FM
T47D	HM
LoVo	FM
HT-29	FM
HRT-18	FM
HCT-15	FM
SW48	FM
DU145	FM

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

88

PC-3	FM
LNCaP	HM

PANC1	FM
HELA	FM
K562	HM
FATO	U
WX330	U
HL60	U

Table 2: OBCAM methylation status in cancer cell lines as determined by MS-PCR analysis.

- 5 FM=fully methylated
 HM=hemimethylated
 FM/HM=fully or hemi-methylated
 U=unmethylated
 -=not determined

10

PE01	FM/HM
PE01 CDDP	FM
PE016	FM
OVCAR 3	FM
OVCAR 4	FM
OVCAR 5	FM
OAW 42	FM
A2780	FM
PEA1	-
PEA2	FM
PE04	FM
PE06	FM
PE014	-
OAW 28	U
59 M	U
CaOV3	U
MCF7	FM
ZR75.1	FM/HM
T47D	HM

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

89

HT-29	FM
HRT-18	FM
HCT-15	FM
SW48	FM
DU145	FM
PC-3	FM/HM
LNCaP	HM
HELA	FM
K562	HM
PANCI	HM
FATO	U
WX330	U
HL60	U

OBCAM and NTM are Methylated in Primary Ovarian Tumours

- 5 We performed MS PCR to detect methylated and unmethylated alleles for OBCAM and NTM in 13 ovarian tumour/normal (or blood) matched pairs of DNAs. A representative set of MSP assays on 13 blood/tumour pairs including a methylated DNA (Intergen) and unmethylated DNA (HL60 cell line) control samples is shown in Fig. 3, and a summary of results is
- 10 presented in Figure 6. We observed that NTM frequently accompanies OBCAM methylation and the two may be considered to be concordant. This is in agreement with the lack of survival association with LOH at OBCAM (D11S4085), which indicates that OBCAM inactivation is an early event in this process.

15

Materials and Methods

Ovarian Cancer Matched Blood (normal)/tumour paired samples

DNA from 65 matched blood (or paraffin embedded normal ovarian tissue) and paraffin-embedded ovarian tumour samples was extracted using QIAamp DNA minikit as per the manufacturer's protocol (QIAGEN)

5 Loss of Heterozygosity Analysis

PCR products from 6 fluorescently tagged polymorphic microsatellite markers from the 11q24-q25 region were amplified from the panel of matched ovarian normal/tumour DNAs: cen-D11S910-2-D11S1320-10 D11S874-D11S4085-D11S969-11qter PCR products were separated and analysed on an ABI 310 Genetic Analyzer using Genescan software (PE Biosystems).

Bioinformatics Analysis of the Human Chromosome 11q24-q25 Region:

15 BAC clones containing the six polymorphic 11q24-q25 markers used to detect LOH were identified from the High Throughput Genomic Sequences (HTGS) database in GenBank by BLAST searching with marker sequences. The sequences from identified BAC clones were then analysed using the Nucleotide Identify X (NLX) algorithm (Human Genome Mapping Project
20 Resource Centre, Hinxton, UK). In this way, a BAC contig map of the region was assembled detailing positions of known genes relative to microsatellite markers.

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

25

Total RNA extraction from cell lines was performed using TRI Reagent (Sigma, Dorset, UK). 1st strand cDNA was prepared from 1µg DNaseI-treated using a 1st strand cDNA synthesis kit (Roche, UK), and 2µl aliquots then used as template in 25µl PCR reactions. Alternatively, for smaller cell

numbers, DNaseI-treated total RNA was prepared using Absolutely RNA mini prep spin columns (Stratagene) and 1st strand cDNA prepared as described.

5 Tissue Expression

Multiple Tissue Northern (MTN) blots (Human I and Human II) and Multiple Tissue cDNA panels (Human I and Human II) were purchased from BD Clontech, Basingstoke, UK. MTNs were hybridized with full
10 length OBCAM and NTM PCR amplified cDNA probes, using ExpressHyb buffer (BD Clontech) as recommended. Blots were rehybridized with a β -Actin control probe (BD Clontech). MTC panels were screened by PCR with OBCAM and NTM primer pairs designed to amplify full-length cDNA products.

15

Methylation Specific PCR (MS PCR)

Genomic DNAs isolated from the normal/ovarian tumour matched pairs (above) and cell line panels (ovarian, breast, lung, colon and pancreatic
20 cancer) were modified by bisulphite treatment using the CpG Modification kit (Intergen) as per the recommended protocol. Control methylated DNA was purchased from Intergen. The bisulphite-modified DNA was PCR amplified with primer pairs specifically recognising the methylated and unmethylated alleles, respectively, of the human *NTM* and *OBCAM* CpG
25 islands. Primer pairs and amplification conditions were as follows.

In order to determine the extent of CpG island methylation in the OBCAM and NTM CpG islands, methylation specific PCR amplified bisulphite-treated DNA was subcloned into the pGEM-T Easy TA cloning vector

(Promega). Six subclones corresponding to each PCR product were sequenced using Big Dye (PE BioSystems) chemistry following standard methods.

5 Azacytidine and TSA Re-expression

In demethylation re-expression experiments, 5×10^6 cells (MDAMB23.1 for OBCAM; MDAMB23.1 and T47D for neurotrimin) were seeded and left to adhere for 24 hours. Cells were incubated in the presence of $10 \mu\text{M}$ azacytidine (Sigma) and $0.3 \mu\text{M}$ TSA added for the final 24 hours of the 4
10 days. Cells were harvested, RNA isolated, 1st strand cDNA synthesised and RT-PCR reactions performed with OBCAM, NTM and actin PCR primers

Transfection of OBCAM into SKOV-3

15 The full coding sequence of human OBCAM plus Kozak consensus sequence and 3'UTR overlap was PCR amplified from normal human ovarian surface epithelium RNA and subcloned into the pGEM-T Easy TA cloning vector (Promega). The PCR primer pair used for the amplification
20 were:

OPCML F1: 5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3' nucs 34-53

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

Nucleotide numbering from Genbank accession NM_002545 mRNA (NM_002454.2 Reference Sequence). The OBCAM insert was then excised
25 with NotI and resubcloned into NotI-digested pcDNA3.1 Zeo mammalian expression vector (Invitrogen). The insert sequence was then verified prior to use in transfection. Plasmid DNAs corresponding to OBCAM sense and antisense constructs and parental vector were prepared by standard methods (QIAGEN) and digested with PvuI. $1 \mu\text{g}$ and $2 \mu\text{g}$ of PvuI-linearised

constructs and vector were transfected into the clonal SKOV-3 neomycin resistant cell line SKNV3.3 in the presence of lipofectin.

Selection on Zeomycin (Invitrogen)

5

48 hours following transfection, cells were split 1:6 and cultured in the presence of Zeomycin antibiotic selection. Individual colonies were then selected for analysis 3 weeks following imposing antibiotic selection.

10 Transfections indicate that OBCAM antisense and vector control transfectants grow more rapidly than OBCAM sense transfectants suggesting that there is a functionally suppressive effect on growth.

Discussion

15

We have performed a more refined LOH analysis in EOC of the 11q24-q25 region in 65 paired normal/tumour samples and identified a high rate 56% of LOH within the OBCAM gene at marker D11S4085. In addition, LOH of 40% within the homologous gene, neurotrimin (NTM or NTM), at markers
20 D11S1320 and D11S874, was also detected. Analysis of clinicopathological parameters shows no association of LOH with adverse patient survival, indicating that loss of these genes is an early event in ovarian carcinogenesis. It also proves that neither is the survival gene detected in our previous LOH studies. Methylation specific PCR of DNA isolated from
25 43 matched normal/ovarian tumour pairs and 6 tumour-only DNAs has identified rates of CpG island methylation of 76% for both OBCAM and NTM, with 86% concordance between genes. Bisulphite sequencing confirmed the presence of extensive methylation within the CpG islands from both genes. Of 12 EOC lines, OBCAM was fully methylated in 75% of

cell lines, 0% were partially methylated and 25% were unmethylated. For HNT/NTM, in 13 EOC lines, 54% were fully methylated, 23% partially methylated, 23% unmethylated. Re-expression of both genes was accomplished by azacytidine treatment with Trichostatin A (TSA),

5 providing conclusive evidence that CpG island methylation is the mechanism underlying the lack of expression of these genes. It is apparent from the MS-PCR studies that methylation of the OBCAM CpG island is found with that of NTM, and may be a prerequisite for NTM methylation to occur. This combined with the LOH data suggests that of the two genes,

10 OBCAM is the more important in the early events of the disease. Consequently, we have transfected OBCAM into a clonal derivative of the ovarian cancer cell line SKOV-3, under the control of the CMV promoter, and show the following effects. Three observations suggest NTM/OBCAM function as suppressors. Firstly there is evidence that some sense NTM

15 transfected SKOV3 clones demonstrate suppression of tumorigenicity as compared with antisense clones, but clonal heterogeneity of SKOV3 made this data difficult to interpret. Furthermore, there was some evidence that morphologically there was contact inhibition associated with sense NTM transfected SKOV3 clones. Finally, we have noticed that antisense OBCAM

20 and vector control transfected clonal derivative of SKOV3 (SKNV3.3) demonstrates faster growth compared with sense OBCAM transfected into the same SKOV3 clonal line. There is an apparent 50% reduction in growth rates of the OBCAM SKOV3 transfected clones as compared with the antisense OBCAM SKOV3 transfected clonal cell lines. By correlating the

25 LOH and methylation studies, we provide evidence for the existence of two inactivating hits in accordance with Knudsen's classical 2-hit mechanism of tumour suppressor gene inactivation (Knudsen AG, 1971 Proc Natl Acad Sci 68(4) p820-823). It also highlighted tumour samples in which only one

inactivating mechanism (either LOH or methylation) was present, allowing us to target these samples for detection of mutations in the OBCAM gene.

This is the first description of the involvement of the IgLON family, and in particular of OBCAM and Neurotrimin, in the development of any form of cancer, or indeed, in any form of human disease.

Example 2: SKNV3.3 is methylated for OBCAM and does not express OBCAM

The cell line SKNV3.3 is a neomycin resistant clonal derivative of the ovarian cancer cell line SKOV3. We have shown by quantitative RT-PCR that it does not express OBCAM and by MS-PCR that OBCAM CpG island is methylated. Furthermore, demethylation following *in vitro* exposure of SKNV3.3 to 5'-aza-2'-deoxycytidine results in re-expression of OBCAM. It was therefore selected for OBCAM functional studies.

The OBCAM CpG island is fully methylated as determined in the MS-PCR assay. Consequently, OBCAM expression in SKNV3.3 is repressed by this epigenetic mechanism. In order to prove that CpG island methylation is the mechanism of repression of OBCAM expression, SKNV3.3 cells were exposed to the 5-aza-2'-deoxycytidine and assayed for OBCAM re-expression by RT-PCR, Southern blotting and hybridisation with an OBCAM specific probe.

1x10⁵ SKNV3.3 (Passage 6) cells were seeded into 25cm³ tissue culture flask in 10ml media. The media was replaced after 24 hours and 5'-aza 2'-deoxycytidine (Sigma A3656) added to give a final concentration of 20µM. A duplicate flask of cells received no azacytidine exposure (control). After 4

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

96

days the cells from both flasks were harvested and DNaseI-treated total RNA prepared using the Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene). First strand cDNA was synthesised using the 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) and 2µl aliquots cDNA used per RT-PCR reaction.

5

Actin RT-PCR was performed to confirm the integrity of the 1st strand cDNA from control and azacytidine-treated SKVN3.3 cells. Equal aliquots of each Actin PCR reaction separated on an agarose gel confirmed the integrity of both samples and the equal concentration of cDNA per sample.

10

OBCAM RT-PCR reaction:

OPCML F4/R6 RT-PCR (474bp product) performed in a 25µl reaction.

PCR primers used are (nucleotide numberings correspond to GenBank Accession No. NM_002545)

15

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

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

Products from the OBCAM PCR reactions were size separated on a 2% agarose gel, Southern blotted overnight onto MSI nylon membrane, and the

20

DNA then UV crosslinked to the membrane.

OBCAM Exon2 F2/ OPCML R6 PCR product, purified through a QIAquick PCR purification column (QIAGEN), was labelled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. PCR primers were as follows (nucleotide numberings correspond to

25

GenBank Accession No. NM_002545):

OBCAM Exon 2 F2: 5'-ATAGACCCCTCGTGTGATCAT-3' nucs
300-319

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

Following overnight hybridisation, the blot was washed to remove unbound probe, and the blot exposed to X-ray film for 1 hour at -70°C and then developed.

- 5 Re-expression of OBCAM is clearly evident in SKNV3.3 cells exposed to $20\mu\text{M}$ 5'-aza 2'-deoxycytidine for 4 days. In contrast, no OBCAM expression is detectable in control SKNV3.3 cells after 4 days with no 5'-aza 2'-deoxycytidine treatment (Fig. 13). Actin PCR product was amplified to equal intensity from both control and treated cells, confirming the
10 integrity of the isolated RNA and synthesised 1st strand cDNA.

Example 3: Functional Studies of OBCAM in SKVN3.3 (SKOV3 clonal derivative)

15 *OBCAM Transfection into SKNV3.3*

The full coding sequence of human OBCAM plus Kozak consensus sequence and 3'UTR overlap was PCR amplified from normal human ovarian surface epithelium RNA and subcloned into the pGEM-T Easy TA
20 cloning vector. The PCR primer pair used to amplify nucleotides 34-1110 (NM_002454.2 Reference Sequence) was:

OPCML F1: 5'-AGTTGTGGCTGTCGAGAATG-3' nucs 34-53

OPCML R1: 5'-TCAGAGGACCTAGGATTCT-3' nucs 1110-1091

25

amplifying a 1077bp PCR product. The OBCAM insert was then excised with NotI and resubcloned into NotI-digested pcDNA3.1 Zeo (zeomycin-resistant) mammalian expression vector (Invitrogen) in both the sense and antisense orientations. The insert sequence was then verified prior to use in

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

98

transfection. Plasmid DNAs corresponding to OBCAM sense and antisense constructs and parental vector were prepared by standard methods (QIAGEN) and digested with PvuI.

- 5 1µg and 2µg PvuI-linearised constructs and vector were transfected into the neomycin-tagged SKOV-3 clonal derivative cell line, SKNV3.3.

- Cell lines were maintained in RPMI 1640 with heat inactivated 10% Fetal Calf Serum (FCS) and penicillin (100units/ml) streptomycin (100µg/ml) and
10 G418 and Zeocin (Invitrogen) as appropriate.

- 2x10⁵ SKNV3.3 cells were seeded per 60mm dish in 4ml of media. 24 hours later when 50% confluent, the cells were transfected separately with 2µg of linearised constructs: OBCAM sense or antisense pcDNA3.1 zeo
15 constructs, or pcDNA3.1 zeo vector containing no insert, using LIPOFECTIN Reagent (Life Technologies GIBCO BRL) according to the manufacturers protocol. Forty-eight hours after transfection, each plate of cells was split one in six and transfected cells were then selected with 250µg/ml zeocin. At three weeks colonies were picked into 24 well plates
20 and clonal cell lines established.

OBCAM suppresses growth in vitro:

- Transfection of OBCAM into SKNV3.3 cells results in suppressed growth
25 compared with SKNV3.3 control cells *in vitro* (figure not shown).

OBCAM Suppresses Tumour Growth and Spread in vivo:

Log phase SKNV3.3 control and OBCAM transfected cells were harvested and 5×10^6 cells injected either intraperitoneally (i.p.) or subcutaneously (s.c.) into the flanks of *nude* mice, with 6 s.c. and 3 i.p. injections per cell line. Size measurements of s.c. tumours were taken weekly for 4 weeks.

5 Mice that received cells via i.p. injection were sacrificed 65 days post injection and tumours removed from the peritoneal cavity, weighed and photographed.

Transfection of OBCAM into SKNV3.3 results in markedly suppressed subcutaneous tumour growth (Fig. 14) comparing SKNV3.3 cells transfected with the OBCAM 'sense' expression construct (Sense transfectants) and control SKNV3.3 cells (Controls).

10

Transfection of OBCAM into SKNV3.3 almost completely abolished tumour growth and intra-peritoneal spread, comparison with the tumour growth and i.p. spread observed with SKNV3.3 parental cells (Figure 21; see Example 8).

15

OBCAM Transfection Enhances Cell Aggregation:

Log phase SKNV3.3 control and OBCAM transfected cells were trypsinised and resuspended in media containing 10% FCS. 1×10^6 cells were resuspended in 1ml of media and passed through a 21 gauge needle to ensure creation of a single cell suspension. Cell suspensions were then

20

25 incubated in 5% CO₂ at 37°C. At defined time points, aliquots were removed by a wide bore pipette, and single cells were counted with a haemocytometer.

OBCAM transfection into SKNV3.3 (sense expressing construct) results in enhanced rate of aggregation of cells compared with that observed for control SKNV3.3 cells (Fig. 15). Transfection of the OBCAM anti-sense expressing construct results in a reduced rate of cell aggregation compared with the parent SKNV3.3.

Example 4: Exon Structure of the Human OBCAM Gene

The exon structure of the human OBCAM gene was determined in a bioinformatic analysis. The Human OBCAM mRNA reference sequence NM_002545.2 was compared with available Human Genome Project sequence in the GenBank HTGS database using a BLAST2 homology search. The comparison identified that OBCAM consists of at least 7 exons. The derived exon structure with the location of intron-exon boundaries are shown in Fig. 16. The exonic sequence is highlighted in yellow and intron sequence flanking the exons is in plain text. Nucleotide numberings relate to the corresponding to the GenBank database sequence (accession numbers for which are given). The nucleotide sequence for Exon 1 is incomplete in the area encompassing the exon/intron 1 boundary due to lack of available Human Genome Project Sequence in GenBank Accession AC027631.4.

Example 5: OBCAM Mutation Detection by Single Strand Conformation Polymorphism Electrophoresis (SSCPE)

Following bioinformatic analysis prediction of the structure of the human OBCAM gene primers to amplify the 7 identified exons of the OBCAM gene were designed. Exon 2 was analysed with two overlapping primer sets due to size limitation of PCR product useful for SSCPE analysis. DNA samples used in SSCPE analysis were extracted from ovarian tumour and

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

101

matched normal tissue paraffin-embedded archival ovarian tumours, and ovarian cancer cell lines.

OBCAM exon specific primers used were as follows. PCR product sizes are given in parentheses.

In Fig. 16, the locations of sense and antisense primers for SSCPE are highlighted in single and double underlining, respectively. Intronic and exonic sequences are non- and bold-highlighted, respectively.

10

Exon 1 (188bp)

OBCAM EX1 F3: 5'-GACCAGGACTGTGCGGCTGC-3'

nucs 54514-54533 AC027631.4

OPCML R3: 5'-CGTCACGTTGTCCATAGCTT-3'

15 nucs: 188-169 NM_002545.2

Exon 2/1 (175bp): (Nucleotide numbering from GenBank AC012234.6)

OBCAM EX2 F1: 5'-CACCACCTCCCTGCCTCACTG-3'

nucs 75226-75245

20 OBCAM EX2 R1: 5'-CATCCACATTTTGGATCATG-3'

nucs 75400-75381

Exon 2/2 (180bp): (Nucleotide numbering from GenBank AC012234.6)

OBCAM EX2 F2: 5'-ATAGACCCTCGTGTGATCAT-3'

25 nucs 75331-75350

OBCAM EX2 R2: 5'-TGGCAACCCAGATCCAGCT-3'

nucs 75510-75491

Exon 3 (179bp): (Nucleotide numbering from GenBank AP000843.3)

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

102

OBCAM EX3 F1: 5'-CAGGTATTTCTTCTATCCTG-3'

nucs 37032-37051

OBCAM EX3 R1: 5'-GTCCTCCAGGTCAGCACCTT-3'

nucs 37210-37191

5

Exon 4 (214bp): (Nucleotide numbering from GenBank AP000843.3)

OBCAM EX4 F1: 5'-TGGTTACACAGTTTCCTGAT-3'

nucs 2881-2900

OBCAM EX4 R1: 5'-AGAACCCCTGGCTGCAGGT-3'

10 nucs 3094-3075

Exon 5 (195bp): (Nucleotide numbering from GenBank AP000843.3)

OBCAM EX5 F1: 5'-GTGCGTGCATGCCTGTGCAT-3'

nucs 3466-3485

15 OBCAM EX5 R1: 5'-CAGAACTGTCCAGGTGTCAT-3'

nucs 3660-3641

Exon 6 (198bp): (Nucleotide numbering from GenBank AP000843.3)

OBCAM EX6 F1: 5'-TAGCAATGTCTCCCTCTTG-3'

20 nucs 4028-4047

OBCAM EX6 R1: 5'-GCATCCAGGCTTCCAGCACT-3'

nucs 4225-4206

Exon 7 (176bp): (Nucleotide numbering from GenBank AP000843.3)

25 OBCAM EX7 F1: 5'-TCCTTGGGTGTATGCTAATG-3'

nucs 19945-19964

OBCAM EX7 R1: 5'-GCGTTGCTCAGAGGACCTAG-3'

nucs 20120-20101

SSCPE for each OBCAM exon has been performed on ovarian cancer matched normal/tumour DNAs, tumour DNAs and cell lines. In keeping with the high rate of LOH and CpG island methylation observed for OBCAM, the expected frequency of somatic mutation is low. A somatic mis-sense mutation which has been detected by SSCPE and sequencing is described below.

Somatic OBCAM Mutation in the PEO Ovarian Cancer Cell Line Series

SSCPE of OBCAM Exon2 F1/R1 PCR products identified a 'band shift' in DNA from a series of cell lines derived from an ovarian cancer patient during the course of her disease. PEO1 represents a platinum sensitive ovarian cancer cell line derived from the patient early in the course of her disease. The platinum resistant cell line PEO4 was derived from the same patient upon relapse after cisplatin chemotherapy. The cell line PEO1CDDP was derived from PEO1 by *in-vitro* cisplatin exposure and represents an *in-vitro* model of platinum resistance. Fibroblast DNA, representing normal DNA, was isolated from the patient at the same the PEO4 cell line was established (PEO4 Fibroblasts).

The Exon2 F1/R1 PCR products amplified from PEO1, PEO1CDDP, PEO4 and PEO4 Fibroblasts were sequenced with the same primers as used in the original PCR. Sequence trace files (Fig. 17) clearly indicate a heterozygous peak corresponding to the presence of both a C and a G nucleotide at position 334 (GenBank Accession No NM_002545, shown in Figure 7) in PCR products from PEO1, PEO1CDDP, and PEO4. Position 334 (NM_002545) is homozygous for a C in the PCR product from PEO4 Fibroblast (marked by *). The wild type sequence (NM_002545 reference nucleotide sequence) contains a C residue at this position, altering a CCA

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

104

codon to CGA. Translation (using Expasy) of the nucleotide sequence encompassing this position predicts that the corresponding wild type amino acid proline (P) is altered to an arginine (R), corresponding to amino acid residue 95 of the immature OBCAM protein sequence (Fig. 18). This residue is believed to be located in the first immunoglobulin domain of OBCAM (Figure 7 and GenBank Accession No NP_002536).

PEO4 Fibroblasts are homozygous wild type (proline) whereas PEO1, PEO1CDDP, and PEO4 are heterozygous wild type/mis-sense mutant (proline/arginine). Substitution of an arginine residue for a proline at this position may result in an altered OBCAM structural confirmation, and therefore altered OBCAM function.

As all the cell lines derived during the time course of this patient's disease contain this mis-sense mutation, we can surmise that the mutation was an early event in the course of their disease. As PEO4 Fibroblasts, corresponding to normal DNA, are wild type, this alteration is a somatic event.

This is the first somatic mutation identified for OBCAM in cancer, including ovarian cancer.

Example 6: OBCAM is unmethylated in normal human ovary

We have extracted DNA and RNA from 5 normal human ovary specimens. OBCAM MS-PCR of these specimens shows that the OBCAM CpG island is unmethylated. The 600bp amplified MS-PCR product contains 58 CpGs. Sequencing across the OBCAM MS-PCR product from these normal ovaries showed no evidence of methylated CpGs within the product.

In contrast, sequencing the MS-PCR product from ovarian cancer cell lines and primary tumours that are methylated in the MS-PCR assay, show extensive methylation across the region of CpG island amplified.

5

Example 7. OBCAM CpG island is methylated in ovarian tumours and unmethylated in normal ovary.

DNA from two examples of ovarian tumours and from two examples of normal ovaries were chemically modified by bisulphite treatment. Methylation specific PCR was then performed with primers designed to discriminate Methylated (M) and Unmethylated (U) OBCAM CpG island bisulphite modified DNA. A 529bp methylated or unmethylated specific PCR product was amplified specifically from the ovarian tumour or normal ovary DNAs, respectively, using the primers detailed above (OBCAM CpG Island Sequencing). The PCR product amplified corresponds to nucleotides 25-553 of Fig. 19 (OBCAM CpG Island Bisulphite Sequencing). PCR products were then subcloned into pGEM-T Easy and individual subclones, representing individual alleles, were then sequenced and the presence or absence of methylated C nucleotides at CpGs scored. Fig. 20 represents the extent of methylated CpG Cs present in the examples of ovarian tumours and of normal ovaries. The nucleotide numbering is the location of CpG Cs as shown in Fig. 19, and the CpG number is the sequential numbering of the CpGs located within the 526bp of the OBCAM CpG island sequenced. The results of sequencing of six alleles are shown for each of the two examples of ovarian tumour and two alleles for each of the examples of normal ovary. The black filled square represents a methylated CpG, the empty square represents an unmethylated CpG, and the square containing vertical lines represents

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

106

cases where the methylation status of the CpG was not determined. Fig. 20 shows that the CpG island to be extensively methylated in ovarian tumours and unmethylated in normal ovary.

5

CLAIMS

1. A method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of
 - 5 (i) obtaining a sample containing nucleic acid from the patient;
and
 - (ii) contacting the said nucleic acid with
 - 10 (a) a nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM
gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which
hybridises selectively to OBCAM cDNA, or a mutant
allele thereof, or their complement; or
 - (b) a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM
15 gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which
hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele
thereof, or their complement; or
 - (c) both (a) and (b).

2. A method of predicting the relative prospects of a particular outcome
of a cancer in a patient comprising the steps of
 - 20 (i) obtaining a sample containing nucleic acid from the patient;
and
 - (ii) contacting the said nucleic acid with
 - 25 (a) a nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM
gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which
hybridises selectively to OBCAM cDNA, or a mutant
allele thereof, or their complement; or
 - (b) a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM
gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

108

hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
(c) both (a) and (b).

- 5 3. A method of determining the progression of cancerous disease in a patient comprising the steps of
- (i) obtaining a sample nucleic acid from the patient wherein the OBCAM gene of the patient has been lost or inactivated;
 - 10 (ii) contacting the said nucleic acid with a nucleic acid which hybridises selectively to the NTM gene or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement.
- 15 4. A method according to any one of Claims 1 to 3 wherein it is determined whether the nucleotide corresponding to nucleotide 334 as numbered in Figure 7 in the nucleic acid from the patient is the same as that in Figure 7 or not.
- 20 5. A method according to Claim 4 wherein the determination involves a nucleic acid according to Claim 56.
6. A method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of
- 25 (i) obtaining a sample containing the OBCAM or NTM gene from the patient;
 - (ii) (ii) determining the degree of methylation of the OBCAM or NTM gene; comparing the level of methylation of

- the OBCAM or NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample; and
- (iv) if the patient sample has a higher degree of methylation of the OBCAM or NTM gene compared to the control sample this is indicative of cancer.
- 5
7. A method of predicting the relative prospect of a particular outcome of a cancer patient comprising the steps of
- 10 (i) obtaining a sample containing the OBCAM or NTM gene from the patient;
- (ii) determining the degree of methylation of the OBCAM or NTM gene;
- (iii) comparing the level of methylation of the OBCAM or NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample; and
- 15 (iv) if the patient sample has a higher degree of methylation of the OBCAM or NTM gene compared to the control sample this is indicative of a lower chance of a successful outcome.
- 20
8. A method of determining the progression of a cancerous disease in a patient comprising the steps of
- 25 (i) obtaining a sample from the patient containing the NTM gene from the patient;
- (ii) determining the degree of methylation of the NTM gene;
- (iii) comparing the level of methylation of the NTM gene from the patient sample with the level of methylation in a control sample;

and if the level of methylation of NTM is increased compared to the control sample this is indicative of a progression in the disease.

- 5 9. A method according to any one of Claims 6 to 8 wherein methylation of the OBCAM or NTM CpG island is analysed.
10. A method according to any one of the preceding claims wherein the cancer or tumour is an ovarian cancer or tumour or a colon cancer or
10 tumour.
11. A method according to any one of Claims 1-2 wherein the nucleic acid is contacted with a nucleic acid according to option (a) and the cancer is ovarian cancer.
15
12. A method according to any one of Claims 1-2 wherein the nucleic acid is contacted with a nucleic acid according to option (b) and the cancer is colorectal cancer.
- 20 13. A method according to any one of the preceding claims wherein the sample is a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found.
14. A method according to Claims 1 to 11 wherein the sample is a
25 sample of ovary and the cancer is ovarian cancer.
15. A method according to any one of Claims 1 to 9, 12 or 13 wherein the sample is a sample of colon and the cancer is colorectal cancer.

16. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which selectively hybridises to the DNA of said OBCAM or NTM gene or the said OBCAM or NTM cDNA sequence, or a mutant allele thereof, or their complement, further comprises a detectable label.
17. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which selectively hybridises as said is single-stranded.
18. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which selectively hybridises as said has fewer than 10000 base pairs when the nucleic acid is double-stranded or bases when the nucleic acid is single-stranded.
19. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which selectively hybridises as said has fewer than 1000 base pairs when the nucleic acid is double-stranded or bases when the nucleic acid is single-stranded.
20. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which hybridises as said has from 10 to 100 base pairs when the nucleic acid is double-stranded or bases when the nucleic acid is single-stranded.
21. A method according to any one of the preceding claims wherein the nucleic acid which hybridises as said has from 15 to 30 base pairs when the nucleic acid is double-stranded or bases when the nucleic acid is single-stranded.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

112

22. A method according to any one of Claims 1 to 2 wherein the nucleic acid which hybridises as said comprises a portion of OBCAM cDNA.
23. A method according to any one of Claims 1 to 2 wherein the nucleic acid which hybridises as said comprises a portion of NTM cDNA.
24. A method according to Claim 22 or 23 wherein the portion is a single-stranded portion.
25. A method according to Claim 24 wherein said portion is capable of amplifying a portion of the OBCAM gene or the NTM gene or the OBCAM cDNA or mRNA or the NTM cDNA or mRNA in a nucleic acid amplification reaction.
26. A method of diagnosing cancer in a patient comprising the steps of
- (i) obtaining a sample containing protein derived from the patient; and
 - (ii) determining:
 - (a) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the OBCAM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the OBCAM polypeptide; or
 - (b) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the NTM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the NTM polypeptide; or
 - (c) both (a) and (b).

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

113

27. A method of predicting the relative prospects of a particular outcome of a cancer in a patient comprising the steps of
- 5 (i) obtaining a sample containing protein derived from the patient; and
- (ii) determining:
- 10 (a) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the OBCAM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the OBCAM polypeptide; or
- (b) the relative amount, or the cellular location, or physical form, of the NTM polypeptide, or the relative activity of, or change in activity of, or altered activity of, the NTM polypeptide; or
- 15 (c) both (a) and (b).
28. A method according to any one of Claims 26 to 27 wherein the cancer is ovarian cancer or colon cancer.
- 20 29. A method according to any one of Claims 26 to 28 wherein the sample is a sample of the tissue in which cancer is suspected or in which cancer may be or has been found.
30. A method according to any one of Claims 26 to 28 wherein the sample is a sample of ovary and the cancer is ovarian cancer.
- 25 31. A method according to any one of Claims 26 to 28 wherein the sample is a sample of colon and the cancer is colorectal cancer.

32. A method according to any one of Claims 26 to 31 wherein the relevant amount, or cellular location, of the OBCAM polypeptide is determined using a molecule which selectively binds to OBCAM polypeptide or a natural variant or fragment thereof.
- 5
33. A method according to any one of Claims 26 to 31 wherein the relevant amount, or intracellular location, of the NTM polypeptide is determined using a molecule which selectively binds to NTM polypeptide or a natural variant or fragment thereof.
- 10
34. A method according to Claim 32 or 33 wherein the molecule which selectively binds the OBCAM or NTM polypeptide or a natural variant or fragment thereof is an anti-OBCAM or anti-NTM antibody.
- 15
35. A method according to Claim 34 wherein the anti-OBCAM antibody is one as defined in Claim 55.
- 20
36. A method according to any one of Claims 32 to 35 wherein the molecule which selectively binds to OBCAM or NTM comprises a detectable label.
- 25
37. A method according to any one of Claims 26 to 31 wherein the relevant amount, or cellular location, of the OBCAM or NTM polypeptide is determined by assaying or detecting the activity of the OBCAM or NTM polypeptide.
38. Use of a nucleic acid which selectively hybridises to:

- (a) the OBCAM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- (b) the NTM gene, or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to NTM cDNA, or a mutant allele thereof, or their complement; or
- (c) both (a) and (b)
- in the manufacture of a reagent for diagnosing cancer.
- 10 39. Use of a molecule which selectively binds to:
- (a) OBCAM polypeptide or a natural fragment or variant thereof; or
- (b) NTM polypeptide or a natural fragment or variant thereof
- in the manufacture of a reagent for diagnosing cancer.
- 15 40. Use of a nucleic acid as defined in Claim 38 in a method of diagnosing cancer.
41. Use of a molecule which selectively binds to:
- (a) OBCAM polypeptide or a natural fragment or variant thereof; or
- 20 (b) NTM polypeptide or a natural fragment or variant thereof
- in a method of diagnosing cancer.
42. A use according to either one of Claims 39 or 41 wherein the molecule selectively binds a variant of OBCAM polypeptide in which the proline at residue 95 as numbered in Figure 7 is an arginine.
- 25 43. A method of determining loss of heterozygosity in a tissue sample, the method comprising the steps of (i) obtaining a sample containing

- nucleic acid derived from the tissue and (ii) comparing a microsatellite profile of the said nucleic acid with that of a reference (homozygous) tissue, the microsatellite(s) being chosen by reference to either;
- 5 (a) the OBCAM gene; or
(b) the NTM gene; or
(c) both (a) and (b).
44. A method of treating cancer in a patient comprising the step of
10 administering to the patient a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM or NTM gene or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM or NTM cDNA.
45. A method of treating cancer in a patient comprising the step of
15 administering to the patient a nucleic acid which encodes the OBCAM and/or NTM polypeptide or a functional variant or portion or fusion thereof.
46. Use of a nucleic acid as defined in Claim 44 in the manufacture of a
20 medicament for treating cancer.
47. A method of treating cancer in a patient comprising the step of
administering to the patient an effective amount of OBCAM and/or
25 NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof to ameliorate the cancer.
48. Use of OBCAM or NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof in the manufacture of a medicament for treating cancer.

49. A method of treating cancer in a patient comprising the step of administering to the patient an effective amount of a compound which inhibits the function of a mutant OBCAM or NTM polypeptide found in a tumour cell, or which upregulates expression of wild-type OBCAM or NTM polypeptide.
50. A method of treating a cancer in which the OBCAM and/or NTM gene is methylated in a patient comprising the step of administering to the patient an effective amount of a compound which decreases or inhibits DNA methylation of the OBCAM and/or NTM gene.
51. A method for increasing the expression of the OBCAM and/or NTM gene in a cell comprising the step of administering to the cell an effective amount of a compound which decreases or inhibits DNA methylation.
52. A method according to Claim 51 wherein the cell is in a patient.
53. Use of a compound which inhibits the function of a mutant OBCAM or NTM polypeptide, or which upregulates expression of wild-type OBCAM or NTM polypeptide, in the manufacture of a medicament for treating cancer.
54. An antibody which reacts with a mutant OBCAM or NTM polypeptide or fragment thereof, wherein said mutant OBCAM or NTM is a mutant found in a cancer cell and/or comprises an inserted amino acid sequence shown in Figure 9.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

118

55. An antibody according to Claim 54 wherein the mutant OBCAM has an arginine at residue 95 as numbered in Figure 7 instead of a proline.
- 5 56. A nucleic acid which selectively hybridises to a nucleic acid encoding a mutant OBCAM or NTM polypeptide, wherein said mutant OBCAM or NTM is a mutant found in a cancer cell and/or wherein the nucleic acid comprises an inserted sequence shown in Figure 9.
- 10
57. A kit of parts comprising a nucleic acid which hybridises selectively to the OBCAM or NTM gene or a mutant allele thereof, or a nucleic acid which hybridises selectively to OBCAM or NTM cDNA or a mutant allele thereof, and means for detecting a mutation in the OBCAM or NTM gene wherein said mutation is a mutation in OBCAM or NTM found in a cancer cell.
- 15
58. A use according to Claim 38 or a nucleic acid according to Claim 56 or a kit according to Claim 57 wherein the gene or nucleic acid is an OBCAM mutant allele with a guanine at nucleotide 334 as numbered in Figure 7 in place of a cytosine.
- 20
59. A kit of parts comprising:
- 25 (a) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the OBCAM gene or a mutant allele thereof, or at least two nucleic acid which hybridise selectively to OBCAM cDNA or a mutant allele thereof; or

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

119

(b) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated methylated OBCAM gene or a mutant allele thereof; or

5 (c) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated unmethylated OBCAM gene or a mutant allele thereof; or

(d) both (a) and (b), or (a) and (c), or (b) and (c), or (a), (b) and (c)

and a source of bisulphite

10

60. A kit of parts comprising:

(a) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the NTM gene or a mutant allele thereof, or at least two nucleic acid which hybridise selectively to NTM cDNA or a mutant allele thereof; or

15

(b) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated methylated NTM gene or a mutant allele thereof; or

(c) at least two nucleic acids which hybridise selectively to the bisulphite-treated unmethylated NTM gene or a mutant allele thereof; or

20

(d) both (a) and (b) both (a) and (b), or (a) and (c), or (b) and (c), or (a), (b) and (c)

25 and a source of bisulphite.

61. A kit according to Claim 59 or 60 further comprising control methylated DNA.

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

120

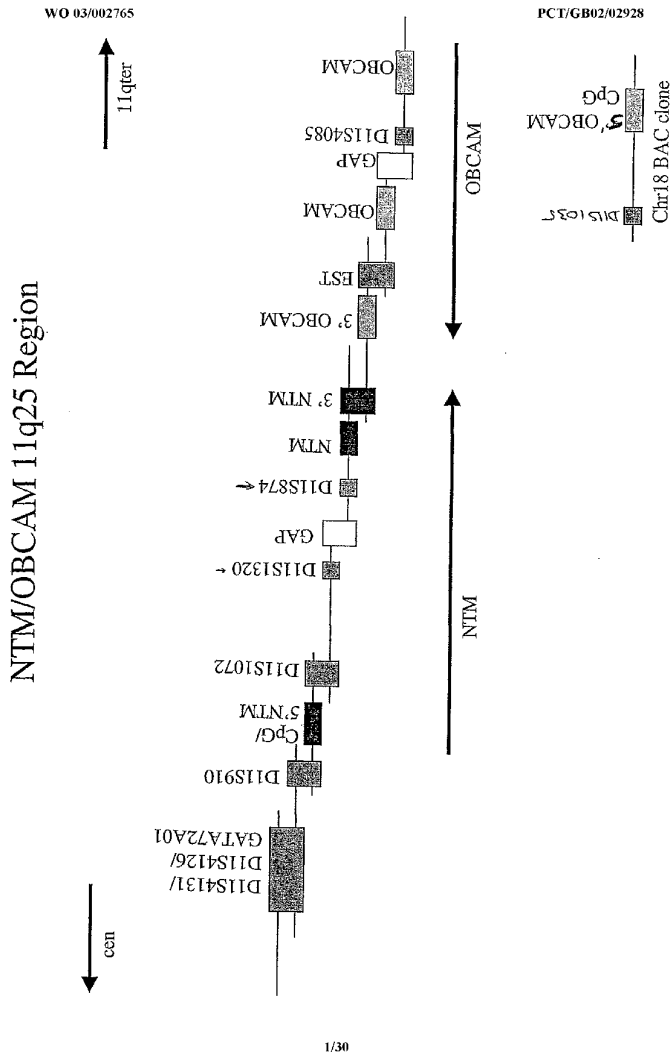
62. A kit according to any one of Claims 59 to 61 further comprising a DNA polymerase.
63. A gene therapy vector which is capable of expressing the OBCAM or NTM polypeptide or a functional fragment or variant or fusion thereof in a mammalian cell.
64. A pharmaceutical composition comprising a gene therapy vector including a nucleic acid which encodes the OBCAM or NTM polypeptide or a functional variant or portion or fusion thereof and pharmaceutically acceptable carrier.
65. A pharmaceutical composition comprising a gene therapy vector including a nucleic acid which selectively hybridises to the OBCAM or NTM gene, or a mutant allele thereof, or an OBCAM or NTM cDNA, or a mutant allele thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.
66. A pharmaceutical composition comprising OBCAM or NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.
67. A nucleic acid as defined in any one of Claims 63 to 65 for use in medicine.
68. OBCAM or NTM polypeptide or a fragment or variant or fusion thereof, for use in medicine.

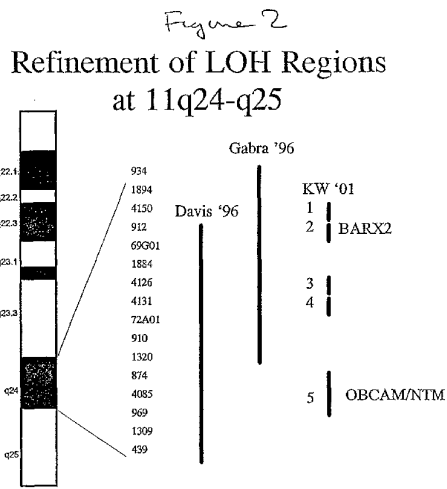
WO 03/002765

PCT/GB02/02928

121

69. A method of identifying a compound which modulates OBCAM function the method comprising contacting OBCAM gene or cDNA or polypeptide or a portion thereof with a test compound and determining its effect.
- 5
70. A method of identifying a compound which modulates NTM function the method comprising contacting NTM gene or cDNA or polypeptide or a portion thereof with a test compound and determining its effect.
- 10
71. A method according to any one of claims 1 to 13, 16 to 25 wherein the sample is blood.
72. A method of identifying a compound which may be useful in treating cancer the method comprising the steps of Claim 69 or 70.
- 15
73. Any novel method of diagnosis, prognosis or treatment of cancer as herein disclosed.





WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Ovarian LOH Rates:

	No. analysed	No. informative	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

Colorectal LOH Rates:

	No. analysed	No. informative	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

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

RESULTS

MOLECULAR ANALYSIS

66% (43/65) of the ovarian tumours and 69% (27/39) of the colorectal tumours had LOH involving at least 1 locus within the 11q24 region. 8 tumours in each group had LOH at all informative loci.

The figure below shows how the markers have been reordered and documents the number of cases with LOH as a percentage of the number of informative cases for each marker.

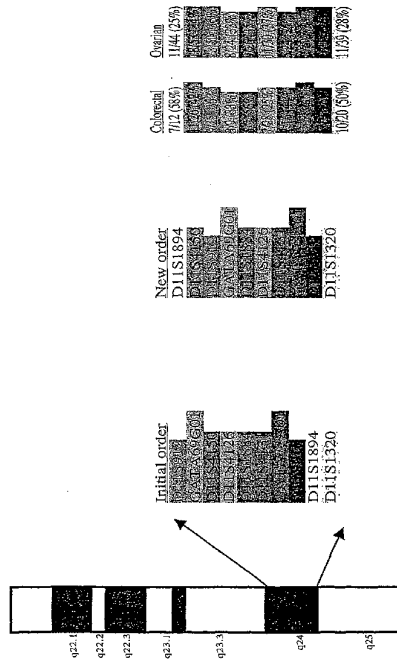
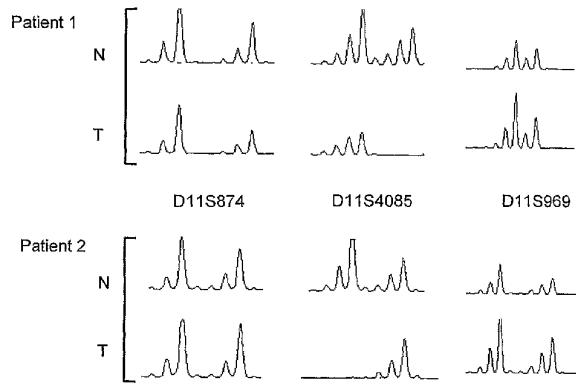


Figure 5

Complete LOH at D11S4085 is flanked by retention of heterozygosity



WO 03/002765

PCT/GB02/02928



Case	Neurotrimin	OBCAM	Overall
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
OVER ALL	8/11=73%	11/13 = 85%	9/11=82%

OVERALL METHYLATION RATE = 11/13 = 85%

M = methylated

U = unmethylated

WO 03/002765 PCT/GB02/02928

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

[Search](#) [History](#) [Alerts](#) [Index](#) [Help](#) [Clipboard](#)

[Display](#) [Default View](#) [HTML](#) [Save](#) [Add to Clipboard](#)

1: NM_002545 Homo sapiens [PubMed](#), [Protein](#), [Related Sequences](#), [Taxonomy](#), [OMIM](#), [LinkOut](#)
opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like (OPCML), mRNA

LOCUS NM_002545 3110 bp mRNA FRI 02-APR-2001
DEFINITION Homo sapiens opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like (OPCML), mRNA.
ACCESSION NM_002545
VERSION NM_002545.2 GI:13518022
KEYWORDS
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3110)
AUTHORS 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.
TITLE A sequence-tagged site map of human chromosome 11
JOURNAL Genomics 17 (3), 699-725 (1993)
MDLINE 94063915
PUBMED 8244387

REFERENCE 2 (bases 1 to 3110)
AUTHORS Struyk,A.F., Canoll,P.D., Wolfgang,M.J., Rosen,C.L., D'Eustachio,P. and Salzer,J.L.
TITLE Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules
JOURNAL J Neurosci 15 (3), 2141-2156 (1995)
MDLINE 95198094
PUBMED 7891157

REFERENCE 3 (bases 1 to 3110)
AUTHORS Shark,K.B. and Lee,N.M.
TITLE Cloning, sequencing and localization to chromosome 11 of a cDNA encoding a human opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM)
JOURNAL Gene 155 (2), 213-217 (1995)
MDLINE 95237612
PUBMED 7721093

COMMENT **REVIEWED REFSEQ:** This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [L34774.1](#), [U79251.1](#). On Apr 3, 2001 this sequence version replaced [gi:4505504](#).
Summary: This gene encodes a member of the IgLON subfamily in the immunoglobulin protein superfamily. The encoded protein is localized in the plasma membrane and may have an accessory role in opioid receptor function. This gene has an ortholog in rat and bovine. The opioid binding-cell adhesion molecule encoded by the rat gene binds opioid alkaloids in the presence of acidic lipids, exhibits selectivity for mu ligands and acts as a GPI-anchored protein. Since the encoded protein is highly conserved in species during evolution, it may have a fundamental role in mammalian systems.

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..3110
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"

```

WO 03/002765 /chromosome="11" PCT/GB02/02928
/map="11"
gene 1..3110
/ gene="OPCML"
/ note="OPCM; OPCM"
/ db_xref="LocusID:4978"
/ db_xref="MIM:60632"
CDS 51..1088
/ gene="OPCML"
/ note="opiate binding-cell adhesion molecule"
/ codon_start=1
/ db_xref="LocusID:4978"
/ db_xref="MIM:60632"
/ product="opioid-binding cell adhesion molecule precursor"
/ protein_id="NP_002536.1"
/ db_xref="GI:4505505"
/ translation="MGVCGYLFPLPKCLVVSLELLFLVPTGVVPSGDATFPICAMDN
VTVRQGESATLRCTIDDRVIRVAVLNRSITLYAGNDKWSIDPRVILLVNTPTQYSIMI
QNVLDVDEGPYTCVQITNHPKTSRVHLIVQVPPQIMNISDITVNEGSSVILLCLAI
GRPEPTVWRHLSVKEGQGFVSEDEYLLISD LKRDQSGEYBCSALNDVAAPVVRVKI
TVNTPYISKAMNIGVSVQKGLLSCEASVWAEQWFKEETRLATLGDWRLEKKG
RMSYLLFNFVSSKIYGYNTCVATHKLNTHASITLYGDAVIDGVHSRSLACLWLS
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
RIGIN
1 gaccaggact gtgaggctgc cggagtcctg ggaagttgtg gctctcgaga atgggggtct
61 ggggtaeact gttcctgccc tggagtgccc tegtgtcctg gctctcagg cbtctgtcc
121 tcttcccacc aggagtgccc gtgctgagcg gagatgcacc ctctcccaca gctatggaca
181 acgtgaaggt ccgcaagggg gtagcgcca cctcaagtg taccatgat gaccggtaa
241 ccgggtggcg ctggctaaac ccagccacca tctctaccg tgggaatgac aagtgtcca
301 tagaccctcg tgtgatac cttgtcaata caccaacca gtacagcacc atgatccaaa
361 atgtggatgt gtatgacgaa ggtccgtaca cctgctctg gcagcagacc aatcatcca
421 aaacgtcccg ggttcaacta atagtcaag ttctcctea gatcatgat atctctcag
481 acatcaactgt gaatgagga agcagtgta cctgtctgt tctgtctatt ggcagaccag
541 agccaactgt gacatggaga cactgtcag tcaagaaag ccaggcttt gtagtgag
601 atgagtaact ggaatctct gactcaagg gagaacagtc cgggagtac gaatgcagg
661 cgttgaacga tctgctgccc cccagtgctc ggaagtaaa atcaactgta aactatccc
721 cctatatctc aaaagccaag aacactgggt ttccagtcg tcagaagggc atcctgagct
781 gtaagacctc tgcagtcacc atgctgaa tccagtggtt caaggaagaa accaggttag
841 ccactggctc ggaatggaat aggattgaaa acaaaggccg catgccaat ctgacttct
901 tcaatgttct tgaagaagat tatgggaact atactgtgt gggccagaa aagcttggga
961 acaccaatgc cagcatcaca ttgtatggc ctggagcag cattgatgg gtaaacagg
1021 cctcaagagc actggctgt ctctggcat cagggaacct cttagccac ttctcctea
1081 agttttgata gaaatctca ggtcctctga gcaagcctg ctctctat atcaagattt
1141 aatctacaet gggagagaca aaccagcttg ggtcttttt ttttttttt ttttttttt
1201 gatttgtttt ctcttttttt ttgttttttt gtttttttt ttttttttt atgttgaatg
1261 agtggggttg ggggggggtt gggcagggtt ctaccacgtg taggataatc atcatgtt
1321 ggtccaaaa atggggctgt ctctgtacc ctgaccctt cctttctct tctctctct
1381 ctcatcatala ttcccaacaa catcctctgc cacacacac aaaaagtaag ttcatltgg
1441 gcaaaaatgt agcttcacaa taacacacct gaagacacaa ctgactatc aacatgtgc
1501 acagcaagag ctacatccaa gttctctatt atctgtgatt atltctctaa tgacaatgla
1561 catatgccc catccatggt aattattatc taatccatt aggttcacg tcttttttt
1621 ctgggacact atccaatata atccatattc atagattca atatgatga ttgtgcaatc

```

WO 03/002765

PCT/GB02/02928



```

1681 ttctgtagcc tcccgctct acatcctcc tccacoatct gcagtttt gaagcttggg
1741 gctatgcatg aaaccaaca ctaaattttg caagtoaagt gaccaaaaa gggggaggca
1801 ttttgaagat agaacctcta ttttaaaaag agaagtcoa ctcataaag tgattgatag
1861 gggctgatt tatttaggtt ttgtcaagct atctatcaa gtaatggtac agttaccat
1921 ctactcaaat atctgattta tctcaccatc caattatcta cccactgtc ttctctcta
1981 gcaatctatt tactgtttat caatctatca atgtaattgt ctaacactcc ttctattct
2041 ctccctacta ctactatca atctatcccc atatgaatct ctaacoatct tgatctctc
2101 ccactgtatt catttataca ccatcagcag acattggcat ctccaaaat atcttcoac
2161 ttctgtgaaa gccaacgata tccacaggta acaaaatca aaagcaatac cctgtgtgt
2221 ggactcttta aaatctggtt tctatccac ccaagggaga cactaacaga taggccaag
2281 tagcaageta atgatcagtc actcactatt cccggaagag cctgtgtttt ctaaaaact
2341 tcttgggaa gcagatcagc ctgaaaagt tctgatttag actgtgtttt ccttttgca
2401 ctgaaggac aaagtgcca gctttatgc ttctctaac cctcaagaa agtaactgtc
2461 aggaacctat ggtggcttt ccttagcaga aagaactga gaaaaaaca catctgtctc
2521 tgcaatgeaa agtgaagagt cccccgctc gagtgggatg actcagcta gactcctt
2581 tctgtccag tctgtgttta atctgtttga aaactatcca gtaaaagct gatggaggcc
2641 aattacatgg cgggtgatt gacaactctg gtatttgttt caggagctc ttctaaactg
2701 agggcaactg agcaactgac ttaatttca agcacttgat taacaaca caagcaactg
2761 agggagaaaa gtgtcagtg cacagttcc tctgatgcag ctgcttctcc aatggctttg
2821 gggaaact taccagctc ttcagttca aagcagacc agcatacaaa caagactga
2881 gccacctttg ctgtctgtc tctgggagc agaagagctc atccagcaa gttgctggg
2941 attcaaaata aaggactgc agaccgaca ggtgtgctgc agggactgat ccacagagag
3001 gatgagatg cagcatcaat cgcagacctg cctgcctca gttgaaaaa ctttctagcc
3061 cctcagctca aaaaaaaa aatagagca ccaaaaaaa aaaaaaaaa

```

Restrictions on Use | Write to the HelpDesk
 NCBI | NLM | NIH

WO 03/002765 PCT/GB02/02928

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMM

Search Nucleotide Protein Genome Structure PopSet Taxonomy OMM

Display Detail View HTML Save Add to Clipboard

1: NM_016522 Homo sapiens neurotrimin (HNT), mRNA

LOCUS NM_016522 1839 bp mRNA PRI 02-NOV-2000
 DEFINITION Homo sapiens neurotrimin (HNT), mRNA.
 ACCESSION NM_016522
 VERSION NM_016522.1 GI:7705412
 KEYWORDS
 SOURCE human.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Homnidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1839)
 AUTHORS Struyk AF, Canoll PD, Wolfgang MJ, Rosen CL, D'Eustachio P and
 Salszer JL
 TITLE Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially
 expressed neural cell adhesion molecules
 JOURNAL J. Neurosci. 15 (3 Pt 2), 2141-2156 (1995)
 MEDLINE 95198094
 PUBMED 7891157
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1839)
 AUTHORS Li, G., Jin, J., Tan, X., Hu, S., Yuan, J. and Qiang, B.
 TITLE Cloning and identification of human neurotrimin full length cDNA
 JOURNAL Unpublished
 COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final
 NCBI review. The reference sequence was derived from AF126426.1.
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..1839
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="11"
 /map="11q25"
 gene 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="MGVCGYLFLEFWKCLVSVSLRLLFLVPTQVPPVRSQDATFPKAMDN
 VTRQSSATLRCTIDNRVTRVAVLNRSTILYAGNDKWLDFRVLVLSNTQTQYSIEI
 QNVVYDQSPYTCVQIDMHPKTSVHLIVQVSPKIVLSSDTSINSGNLSLTCIAT
 GRPEPTVTRHISPKAVGFUSEDEYLEIQGITREOSGDYECASNDVAPVFRVKT
 VNKLPYISBAKGTGVVQKSTLQCRASVPSAEFCMYKDKRLIEGKIGVKVNRPF
 LSKLIPFNVSERHDYGNVTCVASNKLGHNTASIMLFCPGAVSEVSNQTSRRAGCVWLLP
 LLVHLLKLF"
 misc_feature 409..630
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"
 misc_feature 709..879
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"
 misc_feature 970..1170
 /note="IG; Region: Immunoglobulin"
 BASE COUNT 464 a 506 c 503 g 366 t
 ORIGIN
 1 ggggaagcag cagagagggga gcccctttg gccctctcc gtggaaccgg ttttcggagg
 61 ctggcaaaag ccgagggctgg atttggggga ggaatattag actcggagga gctcgcgcgc

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

```

121 tttttctctc cccggcctc cgggtcgcg cgggttcacc gctcagccu cgcgctcct
181 ccgaccccca ccaacttctc gtctcgcgc gggggcgctg tgcctgctg ctgcccaggt
241 tccgggaagt tctggtctc gagaatgggg gtctgtgggt acctgttccct gccctggaag
301 tgcctcgttg tctgtctct caggctgctg ttcctgtac ccacaggagt gccctgccc
361 agcggagatg caacttccc caagctatg gacaacgta cggtcggca gggggagc
421 gccacctca ggtgcactat tgacaaccgg gtcccccgg tggcctgctt aaaccgcgc
481 acctcctct atgtgggaa tgacaagtgg tgcctggatc ctgcctggt cctctgagc
541 acaccccaa cgcagtacag catcggatc cgaacgtgg atgtgtatga cgaagccct
601 tacactgct cggtcgac agacaacc ccaagacct ctaggatca cctcattgtg
661 caagtatct ccaaaattgt agatattct teagatctt ccaatgatga agggaacaat
721 attagctca cctgcatgac aactggtaga ccagagccta cggttacttg gagacacatc
781 totcccagg cggttggctt tgtgagtga cagcaactc tggaaattca gggcatcacc
841 cgggaacagt caggggacta cagtgctgct gctccaatg acgtggccgc gccctggta
901 cggagagtaa aggtcacctg gaactatcca ccatcattt cagaagccaa gggtagcgtt
961 gtcccctgg gacaaaagg gacactgcag tgtgaagcct cagcagctcc ctcagcagaa
1021 tccagtggt acaaggatga caaaagactg attgaggaa agaaaaggggt gaaagtggaa
1081 aacagacctt tccctcaaa actcactctc tcaatgtct ctgaacatga ctatgggaa
1141 tacactgctc tggctccaa caagctggc cacacaatg ccagatcat gctatttgg
1201 ccaggcgcg tccgagagt ggcacagcg acgtcagga gggcaggctg cgtctgctg
1261 ctgctcttc tggcttga cctgctctc aaatttgat gtgagtcca ctcccacc
1321 cggaaagggc tgcgccacc accaccacca acacaacagc aatggcaaca ccagacaa
1381 ccaatcagat atatacaat gaaattagaa gaaacacagc ctcatgggac agaaattga
1441 gggagggaa caaagaatac ttgggggaa aaagatctt aaaaagaa ttgaaattg
1501 cctgcagat atttagtac aatggagtct tctttcca aacgggaga acacagcaca
1561 cccgcttg accactgca agctcactg tcaacctct ttggtccag tgtggcag
1621 gctcagcct ctctcccac agactgccc cagtggaac atctgggag tggccatccc
1681 aaattcaatc agtccataga gacgaacaga atgagacct cggcccaag cgtgctctt
1741 cggcccaag cgtggcctg cgggcactt gtagactgt gccaccag cgtgtgtgt
1801 gaaactgaa ataaaaagag caaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

[Restrictions on Use](#) | [Write to the HelpDesk](#)
 NCB | NLM | NIH

WO 03/002765

Translated NTM Isoforms

PCT/GB02/02928

+33bp isoform

```

atgggggtctgtgggtacctgttctcgtccctggaagtgcctcgtggtcgtgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgttctcgtgtacctcagggagtgccgtgcccagcggagatgccaccttcccaaa
L L F L V P T G V F V R S G D A T F P K
gctatggcaacgtgacggtcggcagggggagagcgcaccctcagtgcaactattgac
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
aagtgggtcctggatcctcgggtggctcctctctgagcaacacccaacgcagtcacagcgc
K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
gagatccagaacgtggatgtgtatgacgagggcccttacacctgctcggtcagacagac
E I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
aaccacccaagacctcagggtccacctcattgtgcaagtatctccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
atttctcagatctccattaatgaaaggaacaatattagcctcactcgcatagcaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagacctcaggttacttggagacacatctctccaaagcggttggccttctg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
agtgaagcgaatacttggaaattcagggcatcaaccgggaacagtcaggggactcagag
S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y E
tgcagtgcctccaatgacgtggcggcccggtgtaaggagtaaggtcaccgtgaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccacatattcagaagccaaggtacaggtgtcccgtgggacaaaagggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcagtgtagacctcagcagtcacctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
L Q C B A S A V P S A E F O W Y K D D K
agactgattgaagaaagaaaggggtgaaagtggaaacagacaccttctctcaaaaactc
R L I R G K K G V K V E N R P F L S K L
atcttctcaatgtctctgaacatgactatgggaactcacttgcgtggcctccaacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggccaacccaatgccagcatcgtatattgaagtgaactacagccctgaccctc
L G H T N A S I M L F E V K T T A L T P
tggaaaggtccaggcgcgtcagcaggtgagcaacggcagctcagaggggcaggtgc
W X G P G A V S E V S N G T S R R A G C
gtctggctgctcctctctggtcttgcacctgctctcaaalttga
V W L L P L L V L H L L L K F *

```

Figure 9

WO 03/002765
+69bp isoform

PCT/GB02/02928

atgggggtctgtgggtacctgttctgcccctggaagtcctcgtggctgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgttctctgtaccacaggagtgcccgtgcgccagcggagatgccaccttccccaaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
gctatggacaacgtgacggctccggcaggggagagcgccacctcagggtcactattgac
A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
aaccgggtcaaccgggtggcctggcctaaaccgcagcaccatcctctatgctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
aagtggctcctggatcctcgggtgctcctctgagcaacacccaaacgcagtcagcctc
K W C L D P R V V L L S N T Q T Q Y S I
gagatccagaacgtggatgtgatgacgagggcccttacacctgctcgggtcagacagac
R I Q N V D V Y D E G P Y T C S V Q T D
aaccacccaaagacctctagggtccacctcattgtgcaagtatccccaaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P K I V E
atcttctcagatctcattaatgaagggaacaatatagcctcacctgcacatgcaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagagcctcaggttacttggagacacatctctccaaagggttggccttggg
G R P E P T V T W R H I S P K A V G F V
agtgaagcgaataacttggaaattcagggcctcaccgggaaacagtcaggggactacgg
S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y B
tgcagtgctccaatgacgtggcggcccgctggtacggagagtaaggctaccgtgaaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccaccatacattcagaagccaaggggtacaggtgtcccctgggacaaaaggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcagtgtaagcctcagcagtcctcctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
L Q C E A S A V P S A E F Q W Y K D D K
agactgatgaagaaagaaaggggtgaaagtggaaaaacagaccttctcctcaaaactc
R L I E G K K G V K V E N R P F L S K L
atctcttcaatgtctctgaaactgactatgggaactacacttgcgtggcctccacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggccacccaatgocagcatcgtctattgaaactaaatgagcctcagagctcaact
L G H T N A S I M L F E L N E P T S S T
ttgtgcaagagtgaaactcagccctgaccccttggaaaggtccaggcgcctcagc
L L Q E V K T T A L T P W K G P G A V S
gaggtgagcaacggcagctcagggaggcaggtgcgtctggctgctcctctctgggtc
E V S N G T S R R A G C V W L L P L L V
ttgcaactgcttctcaattttga
L H L L L K F *

WO 03/002765
+108bp isoform

PC/T/GB02/02928

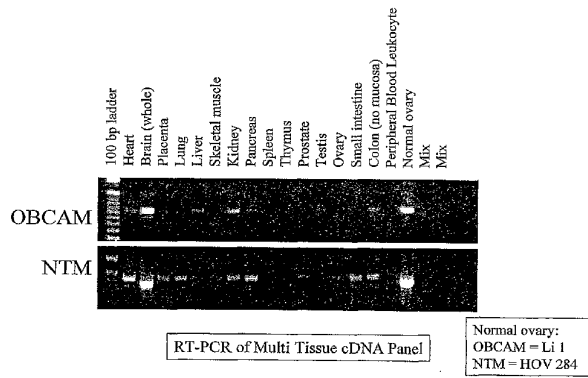
```

atgggggtctgtgggtacctgttctctgcccctggaagtgcctcgtggctgtgtctctcagg
M G V C G Y L F L P W K C L V V V S L R
ctgctgttctctgtaccacacaggagtgcocgtgocgacggagatgccaccttccccaaa
L L F L V P T G V P V R S G D A T F P K
gctatggacaacgtgacgggtccggcagggggagagcgcacccctcaggtgcaactatgac
A M D N V T V R Q G E S A T L R C T I D
aacgggtcaccgggtggcctggcctaaacgcagcaccatcctctatgctgggaatgac
N R V T R V A W L N R S T I L Y A G N D
aagtgtgcttggatcctcgcgtggctcctctgagcaacacccaaacgcagtcacagctc
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
aacacccaaagaccttaggggtccacctcattgtgcaagtatccccaaattgtagag
N H P K T S R V H L I V Q V S P R I V B
attctctcagatctccattaatgaagggaacaattagcctcacctgcatagcaact
I S S D I S I N E G N N I S L T C I A T
ggtagaccagagcctacgggttaactggagacacatctctcccaaagcgggtggcttctgtg
G R F E P T V T W R H I S P K A V G F V
agtgaagacgaatacttggaaatcagggcatcaccgggaaacagtcaggggactacgag
S E D E Y L E I Q G I T R E Q S G D Y E
tgcagtgctccaatgacgtggcgcgcgcctgtgtaaggagtaaggtaaccgtgaaac
C S A S N D V A A P V V R R V K V T V N
tatccacatacattcagaagccaagggtacaggtgtccccgtgggacaaaagggggaca
Y P P Y I S E A K G T G V P V G Q K G T
ctgcagtgtaagcctcagcagtcacctcagcagaattccagtggtacaaggatgacaaa
L Q C E A S A V P S A E F Q W Y K D D K
agactgattgaaggaagaaaggggtgaaagtggaaaacagaccttctctcaaaaactc
R L I E G K K E V K V E N R P P L S K L
atctctctcaatgtctctgaaatgactatgggaactacacttgcgtggcctccaacaag
I F F N V S E H D Y G N Y T C V A S N K
ctgggccacccaatgccagcatcctctatcttgatggctcctaaagtgaatgtggaa
L G H T N A S I M L F * W L L S * L W E
tcataattggaactaaatgagcctacagctcaactttgttgcagaagtgaactaca
S * L E L N E P T S S T L L Q E V K T T
gccctgaccttggaaaggtccaggcgcgltcagcaggtgagcaacggcacgtcgagg
A L T P W K G P G A V S E V S N G T S R
agggcaggtcgcgtctggtctgctcctctctgtgtctgcaactgcttctcaaatgtga
R A G C V W L L P L L V L H L L L K F *

```

Figure 10

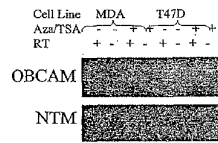
IgLONs are Highly Expressed in Normal Ovary



WO 03/002765

PCT/GB02/02928

IgLON Re-Expression



- Cell Lines: MDAMB23.1, T47D.
- Azacytidine + Trichostatin A
- Re-expression of OBCAM and NTM
 - confirms epigenetic regulation of transcription

Figure 11

WO 03/002765

PC1/GB02/02928

OBCAM MS-PCR Primers

Primer Set	Sense Primer 5'→3'	Antisense Primer 5'→3'	Size	Start Genomic Position	End Genomic Position
OBCAM1-W	AGCGTCCAG TGGAGGGCA CGGGC	CAITGGGCTG CAATGGGCTC CCGG	135	25	160
OBCAM1-M	AGCGTITTAG TGGAGGGTA CGGGC	CAITGGGCTA CAATGGACTC CCGG	135	25	160
OBCAM1-U	AGGTTITTAG TGGAGGGTA TGGGT	CAITCACACTA CAATCAACTC CCGA	135	25	160
OBCAM2A-W	CAGCGGATG GACACGCACA CC	AAACGGGCGC CCTTGGCAGC G	229	151	380
OBCAM2A-M	TAGCGGATGGATAAGTATATC	AAACGGGAGC CCTTGGCAAC G	229	151	380
OBCAM2A-U	TAGTGTGATG GATACTGATA TT	AAACAACAAC CCTTCAACAAC A	229	151	380
OBCAM2B-W	CAACTTCTGC GCTGGCATGG GC	AAACGGGCGC CCTTGGCAGC G	154	226	380
OBCAM2B-M	TAATTTTTCG GTTGGTATCG GC	AAACGGGAGC CCTTGGCAAC G	154	226	380
OBCAM2B-U	TAATTTTTCG GTTGGTATCG GT	AAACAACAAC CCTTCAACAAC A	154	226	380
OBCAM3A-W	GCGCGGTT CTCTCCGCTG GCGC	TCCCGTGGC GCCTCGGAGC GAGCG	182	371	553
OBCAM3A-M	GCGTGGGTT TTTTCCGTTG GCGC	TCCCGATAC CCTCGAAGAC GAAACG	182	371	553
OBCAM3A-U	GCTGTGHT TTTTGTGTTG GTGT	TCCCAATACC CCTCAACAAC AACA	182	371	553
OBCAM3B-W	GCGCGTCCG GCGTCAATCC C	TCCCGTGGC GCCTCGGAGC GAGCG	134	419	553
OBCAM3B-M	GCGCGTCCG GCGTCAATTTT C	TCCCGATACC CCTCGAAGAC GAAACG	134	419	553
OBCAM3B-U	GCTGTGHTG GGTATTTT T	TCCCAATACC CCTCAACAAC AACA	134	419	553

NTM MS-PCR Primers

Primer Set	Sense Primer 5'→3'	Antisense Primer 5'→3'	Size	Start Genomic Position	End Genomic Position
------------	--------------------	------------------------	------	------------------------	----------------------

WO 03/002765

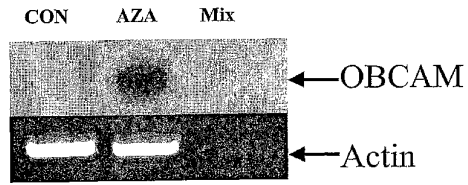
PC/T/GB02/02928

		n	
NTM1 1-W	CACAGCCTGG GCGGGGCGG GC	160	190
NTM1 1-M	TATAGHTTGG GTTGGGCGG GC	160	190
NTM1 1-U	TATAGHTTGG GTTGGGCGG GT	160	190
NTM1 2-W	CACAGCCTGG GCGGGGCGG GC	111	141
NTM1 2-M	TATAGHTTGG GTTGGGCGG GC	111	141
NTM1 2-U	TATAGHTTGG GTTGGGCGG GT	111	141
NTM2 1-W	GGCGCTGAG CTTGGGCTCC GCG	121	386
NTM2 1-M	GGTGGTGGG TTTGGCGTTT GCG	121	386
NTM2 1-U	GGTGGTGGG TTTGGCGTTT GTG	121	386
NTM2 2-W	AGCGAGCTACCGAGCTTGGGGCGCC	65	321
NTM2 2-M	AACGAACTACCGA ACTTAAACCGCC	65	321
NTM2 2-U	AACAACTACCGA ACTTAAACCGCC	65	321
NTM3 1-W	AGATCTGGAG GAGTCTGGCC	151	925
NTM3 1-M	AGATCTGGAG GAGTCTGGCC	151	925
NTM3 1-U	AGATCTGGAG GAGTCTGGCC	151	925
NTM3 2-W	TCCCGCGCC TCCCGGTCG CCG	121	955
NTM3 2-M	TTTTGGGTTTTGGGTCGT GCG	121	955
NTM3 2-U	TTTTGGGTTTTGGGTCGT GTT	121	955
	TGGCAGCAGC TCCATCCCTG ACCG		
	TAACAACAAC TCCATCCCTA ACCG		
	TAACAACAAC TCCATCCCTA ACCA		
	AGCGAGCGGG CCGGCTGGCG GCG		
	AACGAACGAA CGA ACTAAG ACG		
	AACAACAAA CA ACTAACA ACA		
	TGGCGAGGA GGGAGGGCC GGGCG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG GAACG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG AACCA		
	TGGCGAGGA GGGAGGGCC GGGCG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG GAACG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG AACCA		
	TGGCGAGGA GGGAGGGCC GGGCG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG GAACG		
	TAAACGAAA AAAAAAACCG AACCA		
	ACTTCCCGA ACTCCGGCAG CCG		
	ACTTCCCGA ACTCCGACAA CCG		
	ACTTCCCGA ACTCCGACAA CCA		
	ACTTCCCGA ACTCCGGCAG CCG		
	ACTTCCCGA ACTCCGACAA CCG		
	ACTTCCCGA ACTCCGACAA CCA		

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Figure 13



WO 03/002765

PCT/GB02/02928

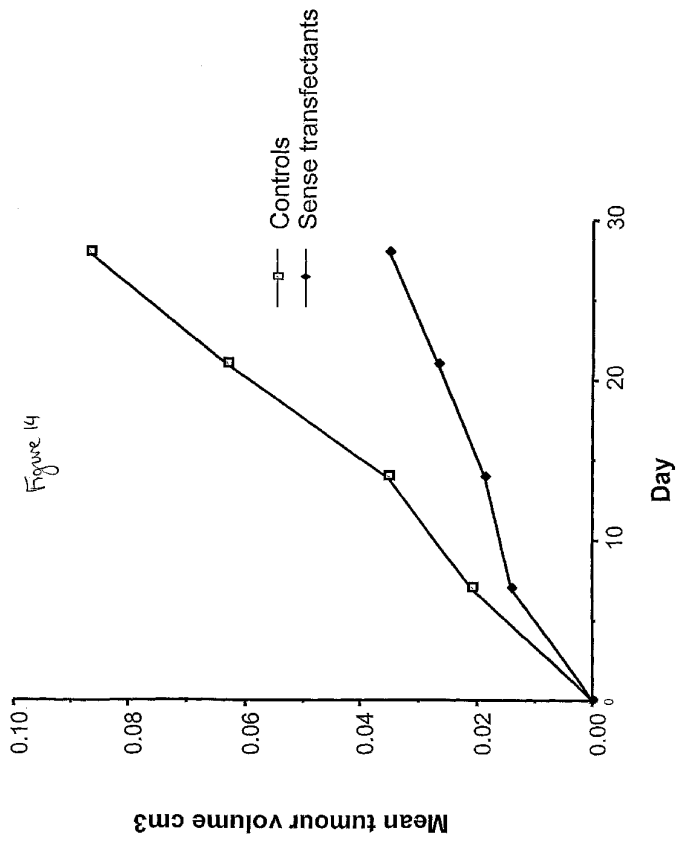
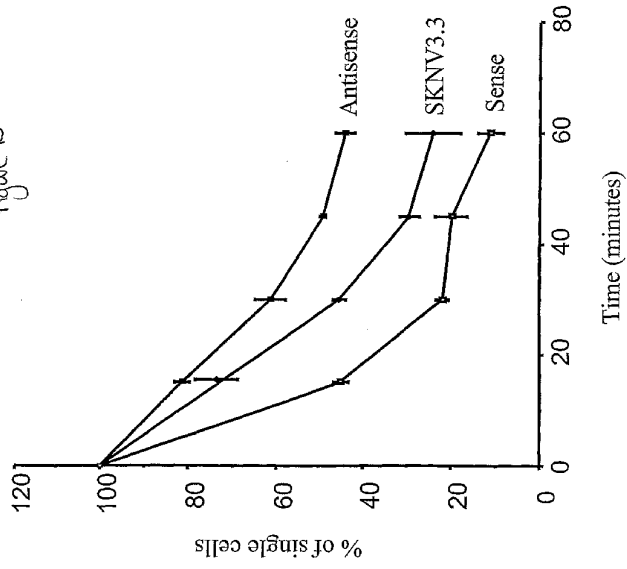


Figure 15



WO 03/002765

PC/T/GB02/02928

Figure 16 (page 1 of 4)

Exon 1 (Coding Sequence) AC027631.4: 166bp

Exon 1 (Coding Sequence) AC027631.4: 166bp

54481 cgtctccaga gcccgctggt gcgcgggggc ggggaccagg actgtgcgc tgcggagtc
 54541 ctgggaagt gtgctgtcg agaattgggg tctgtgggta cctgttctg cctgggaagt
 54601 gctcgtggt cgtgtctctc aggtctctgt tcttcttacc cacaggagct gcccgtcgc
 54661 aggaagatgc caccttccc aagctatgg acaactgac ggtccggcac cggcaagagcg
 54721 ccactctcan nnnnnnnnn nnnnnnnnn

Exon 2 AC012234.6: 233bp

75121 ttttagcact gtgttttgtt gtttcaatta ctctcaaaa tgcaacgtct tatttaccat
 75181 attatataat ctctccactc tctctcttcc ccttcttct ccttccaca ctctctgct
 75241 cactgcaggt gtacctaga tgaccggta accgggtgg cctggctaaa ccgcagcacc
 75301 atctctacg ctgggaatga caatggctc atagaccctc gtgtgatcat cctggctcaat
 75361 acaccaacc agtacagcat catgatccaa aatgtgatg tgtatgacga aggtccgtac
 75421 acctgctctg tgcagacaga caatcaatccc aaacgtccc gggttcaact aatagtgcac
 75481 ggttaagtcg agctggatct ggggttggca ttccgtcag tgatggaggy gaagaacagt
 75541 gttggtgttt gttctacctg tgtgcggaaga cacaaaagtc atcttctct actgaatcca
 75601 gagtttgact atatgtcttg gaatgttccc catcgaatgg gtaacttaact aagtgtgta

22/30

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Figure 16 (page 2 of 4)

Exon 3 AP000843.3: 126bp

36961 atttattata aaaaacatgct atacaasaat ttgtaggcta acacctcctt ttaagtgcaa
 37021 agaattatc tcaggtattt cttctatcct gtttctctac agttctcct **cagatcaatga**
 37081 **atatctctc agacatcact gtgaatgagg gaagcagtgt gacctgtgt tgtcttgeta**
 37141 **ttggcagacc agagccaact gtgacatgga gacacctgtc agtcaaggt aagggtctga**
 37201 gctggaggag gttttcagag gtagtatgt aaagctctgg ctcttatgca caacagagct
 37261 tcagggaatca gaaaacattt tghtaatccag tcaatagaata tcaaacaggc aatatgcacc
 37321 aattgctggc tatttcattt caaagaagg attcatagag gaaatttgc aaatgatggt

Exon 4 AP000843.3: 138bp

2821 tctgatggt ttttctcttc ctctctctac aatctctaga tgtgaatag gttctgtccc
 2881 tggttacaca gtttctgat tgttctctgt ctgctctctt ctccocagaa **ggccagggt**
 2941 **ttgtaagtga ggatgagtac ctgggatct ctgacatcaa ggcgaccag tccggggagt**
 3001 **acgaaatgca cgcgttgaac gatgtcgtg cggccgatgt ggggaaagta aaaaatcactg**
 3061 **taaacgtga gtggacctcc agccagggag tctggggaa aagacggcac agggagttag**
 3121 tggacaatct ggtaatgga gtgccatttt ccaaaaggacc caggttctctg ccaacaggaa
 3181 aatacttcat cagatggctt tggccacctt ggcctccctg ccatttctcc ctggaatctt

23/30

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Figure 16 (page 3 of 4)

Exon 5 AP000843.3: 121bp

3361 aatgattat tttactgga agaggggttg tcacaagaaa tccatttaca tagcaaatgg
 3421 ctggatgtgc ccttcctctc ttcaogaaa tcactctgtg tgtgctgog tgcctgcoctg
 3481 tgcattgtgtg tgtgtgtgtt tcccacagat **cctccctata tctcaaaagc caagaacact**
 3541 **ggtgtttcag tgggtcaaaa gggcactctg agctgtgaag cctctgcaat cccatggct**
 3601 **gaattccagt ggttcaagga agaaaccagg** taccttttaa atgagaccctg gacagttctg
 3661 agccagagct gatggtctat cccacatgg gagaaagatg aggatgaaga aaaggggaaa
 3721 gataagggcaa aacagaaata taactatgcc tctttgttaa caaagtctat tttacaacg
 3781 agaaaaaaaa tggagggaggc tggggaagtgg agaaaaatgaa ctgaccatga ttctgaaatct

Exon 6 AP000843.3: 152bp

3901 ggcaagagca tcatttccct tctctcctg ttggacactg aagtgttag ggtttgagtt
 3961 tgaaggacga gattagtgg agaaagagt ttggtgagga ggaggcoctc ttgttagaat
 4021 gaattgatag caatgtcttc cctcttgca **gttagcact gttctggatg gaatgagat**
 4081 **tgaaacaaa ggcgcgatgt ccactctgac tttctcaat gtttcagaaa aggattatgg**
 4141 **gaactatct tgtgtggcca cgaacaagct tgggaacacc aatggcagca tcacattgta**
 4201 tgtgtgagtc tggaaacctg gatggcagttg gctcagccac atggggaagc ttgagggact
 4261 caggagggag gaagttgcaa tctgtgtggc ctgttccat caatcctact caaccacca
 4321 cctgtagata agacatactt ctccctgcca tccccttagc atggccatgca gagatagtta

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

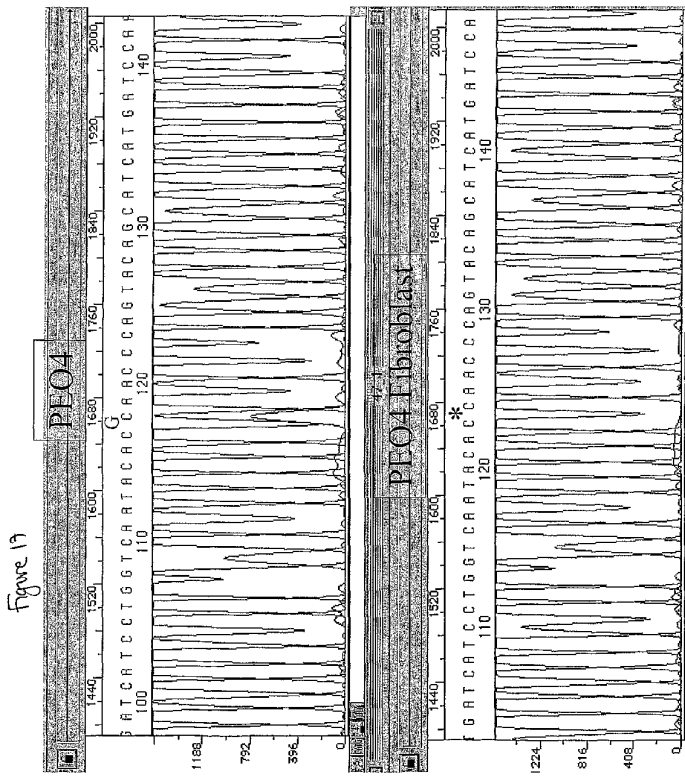
Figure 16 (page 4 of 4)

Exon 7 (Coding Sequence) AP000843.3: 101bp

19861 ttgttttagac ttggaatggt cagcggaaag gtggaaggtg ggaagcaatgt atgtgtatatt
 19921 gcttgtcagg gaagaactat ggtgtcctttg ggtgtatgct aatgggtctg tctctctctc
 19981 ccttacacag **ggcctggagc agtcattgat ggtgtaaacct cggcctccag agcactggcct**
 20041 **tgctctcggc taccaggac cctcttagcc cactcttcca tcaagttttg** auaagaaatc
 20101 staggctctc tgagcaaggc ctgcttctcc atatacacaga ctttaactca cactcgggag
 20161 agcaaaccaag cttgggcttc tttttgtttt tttctgttat tctagatttg tttctttttt
 20221 gttttgtttt atbtgtttgt ttgottttat tccagcttg aatgagtggg gttggggggcg

WO 03/002765

PCT/GB02/02928



WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Figure 18

Wild Type OBCAM Present in PEO4 Fibroblast DNA:

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

Somatic OBCAM Mis-sense Mutation in PEO1, PEO1CDDP,
PEO4 DNA:

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

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

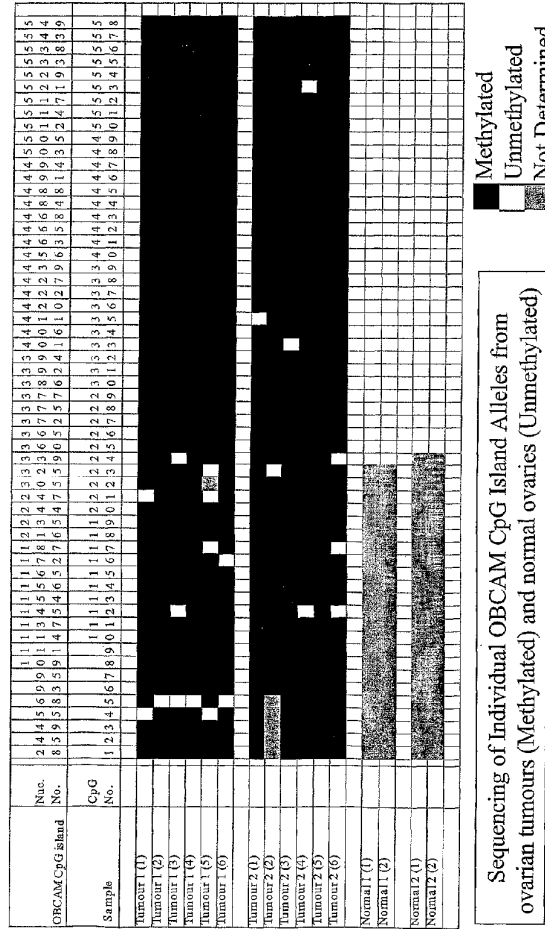
Figure 19 OBCAM CpG Island Bisulphite Sequencing

1 ATTGAGATTT GCCACTTTGG GGACAGGGGT CCAGTGGAGG GGCACGGGGC
 51 TTTCGAGGT GGTCTCTGG AGTGGGTGC ACTCCACCTC TGGGGGGCC
 101 CAGGACAGCG CGCGTCAGG GCTGGACTTG GCTGGGGGG GAGCGGATTG
 151 CAGCGCGATG GACACGCACA CCGGTGCCCC ATCTGGCGTG GGCAGGGTAG
 201 TTCAGCTCTC CAGGGCGGGG TTCTCAACT TCTGGGCTGG CATCGGGGAG
 251 GGAAGGTGCC AGTGTCAATT TTCAGTTTC TCTTTCCCC AGAACTCCCT
 301 CTCCCGCCCT CCCCTCTCC TCCCGGCTCC CCCACCCCG CCCCCTCTGT
 351 AGGGGAAGCC GCTGCGAGGG GCGCGGGTT CTCTCCGCTG GCGCGGGTGT
 401 CGGACGGAG CGAATGGG CCGGTGGGG CTCATCCCC CAGGCATCCC
 451 CAGCCGGTG GCGCGGGCG AGTTAAGT GGGCGCCCG CTTGGGATG
 501 AGCGCGCAGT CCGCGCCCG ATGGAGCTGC TGCCATGACA ACCCCGGCGG
 551 GAGAGAAAGT GCGGTCAAGG GGTGCTCC GGGAGGAAG GGGCGCGGAG
 601 TCCGGGCCC GCGCGTCGG GGTGCTCC GGGAGGAAG GGTCTCGTCC
 651 CCGGGGCGG CCGTGAGCG TGGCTCCCG GCGTCCCGC GTCTCGTGCC
 701 GCGTCCCCG AGGAAGCGG GCGCGCGTC CGCCCAGTC CCGTGGCC
 801 CCGAGTCCC CCGGGGGG GCTCCCCCG CTGGCCGCGA GTCGGCCGACC
 851 GGGCTGCAGA GGACGGCCAC CGACCGGACG ACCCTGTGC GCCGGTGGG
 901 TCCCGCCTT GGAACTTTT GCCGCCTTG GGTCCAGAT GCGAGACTT

WO 03/002765

PCT/GB02/02928

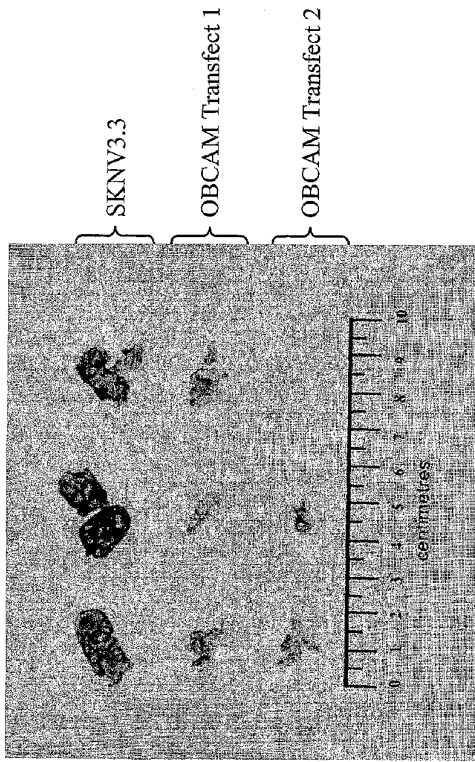
Figure 20
 OBCAM CpG Island is
 Methylated in Ovarian Tumours and
 Unmethylated in Normal Ovary



WO 03/002765

PCT/GB02/02928

Figure 21
OBCAM Expression in SKNV3.3 Almost Completely Abolishes Tumorigenicity in *Nude* Mice



【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/002765 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB02/02928
- (22) International Filing Date: 20 June 2002 (20.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0115673.6 27 June 2001 (27.06.2001) GB
60/305,137 16 July 2001 (16.07.2001) US
60/330,792 31 October 2001 (31.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED [GB/GB]; 61 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SELLAR, Grant, Clark [GB/GB]; Imperial Cancer Research Fund Medical Oncology Unit, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU (GB); GABRA, Hami [GB/GB]; Imperial Cancer Research Fund Medical Oncology Unit, Western General Hospital, Crewe Road, Edinburgh EH4 2XU (GB).
- (74) Agent: MILES, John, S.; Eric Potter Clarkson, Park View House, 58 The Ropewalk, Nottingham NG1 5DD (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NI, NZ, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
10 July 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/002765 A3

(54) Title: METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER BASED ON THE OBCAM AND NTM GENES

(57) Abstract: The invention provides methods of diagnosis, prognosis and treatment of cancer related to the OBCAM and NTM genes. The methods are particularly suited to ovarian and colorectal cancers.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/02928
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, EMBASE, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAJIMA OSAMU ET AL: "Expression of opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM) and neurotrimin (NTM) in E. coli and their reactivity with monoclonal anti-OBCAM antibody." NEUROREPORT, vol. 8, no. 14, 1997, pages 3005-3008, XP009010402 ISSN: 0959-4965 abstract; figure 3 the whole document	54-56
Y	---	1-73
Y	WO 01 19845 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 22 March 2001 (2001-03-22) claims 1-32 ---	1-73
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search: 20 May 2003		Date of mailing of the international search report: 27/05/2003
Name and mailing address of the ISA: European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 940-2940, TX: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 940-3016		Authorized officer: Stachowiak, O

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/GB 02/02928

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 46281 A (BAKER KEVIN P; CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); GURNEY AUSTIN ()) 16 September 1999 (1999-09-16) cited in the application page 48, line 1 -page 49, line 35; claim 2; figure 221 ---	1-73
Y	EP 1 077 259 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 21 February 2001 (2001-02-21) column 10, line 14-18; claims 1-10 ---	1-73
Y	WO 00 61754 A (VERNET CORINE; CURAGEN CORP (US); FERNANDEZ ELMA (US); SHIMKETS RI) 19 October 2000 (2000-10-19) cited in the application page 9, line 10 -page 10, line 9; claims 5,34,62 page 2, line 10 -page 3, line 33 ---	1-73
Y	GOVITRAPONG P ET AL: "TRANSFECTION OF NG108-15 CELLS WITH ANTISENSE OPIOID-BINDING CELL ADHESION MOLECULE CDNA ALTERS OPIOID RECEPTOR-G-PROTEIN INTERACTION" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 268, no. 24, 25 August 1993 (1993-08-25), pages 18280-18285, XP000602144 ISSN: 0021-9258 abstract ---	1-73
A	KANNAN K ET AL: "Cell surface expression of lysosome-associated membrane protein-2 (Lamp2) and CD63 as markers of in vivo platelet activation in malignancy." EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 55, no. 3, 1995, pages 145-151, XP009010448 ISSN: 0902-4441 abstract ---	1-73
A	GIL O D ET AL: "Neurotrophin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions" JOURNAL OF NEUROSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 22, 15 November 1998 (1998-11-15), pages 9312-9325, XP002236302 ISSN: 0270-6474 abstract --- -/--	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/02928
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LANE CYNTHIA M ET AL: "Alteration of OBCAM conformation as a result of opioid receptor expression and opioid ligand treatment." BRAIN RESEARCH, vol. 698, no. 1-2, 1995, pages 15-22, XP001148021 ISSN: 0006-8993 page 21, last paragraph	1-73
P,X	SELLAR GRANT C ET AL: "OBCAM, an IgLON cell adhesion molecule from 11q25, is frequently inactivated in sporadic epithelial ovarian cancer." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 43, March 2002 (2002-03), page 146 XP001147458 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; San Francisco, California, USA; April 06-10, 2002, March, 2002 ISSN: 0197-016X the whole document	1-73
P,Y	FURUTA KOH ET AL: "Expression of lysosome-associated membrane proteins in human colorectal neoplasms and inflammatory diseases." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 159, no. 2, August 2001 (2001-08), pages 449-455, XP001148081 ISSN: 0002-9440 abstract	1-73
T	SELLAR G C ET AL: "OBCAM, an IgLON cell adhesion molecule from 11q25, is frequently inactivated in sporadic epithelial ovarian cancer." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 86, no. Supplement 1, June 2002 (2002-06), page S24 XP009010333 British Cancer Research Meeting 2002; Glasgow, UK; June 30-July 03, 2002, June, 2002 ISSN: 0007-0920 the whole document	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 02/02928

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 44-45, and 47 are directed to a method of treatment of the human/animal body (...'administering...'), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/02928

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0119845	A	22-03-2001	AU 7586900 A	17-04-2001
			CA 2388419 A1	22-03-2001
			EP 1218399 A1	03-07-2002
			JP 2003509039 T	11-03-2003
			WO 0119845 A1	22-03-2001
WO 9946281	A	16-09-1999	US 6391311 B1	21-05-2002
			AU 3072199 A	27-09-1999
			CA 2321677 A1	16-09-1999
			US 2003072745 A1	17-04-2003
			US 2003073131 A1	17-04-2003
			US 2002127584 A1	12-09-2002
			WO 9946281 A2	16-09-1999
			US 2003073169 A1	17-04-2003
			US 2003032101 A1	13-02-2003
			US 2003032102 A1	13-02-2003
			US 2003027262 A1	06-02-2003
			US 2003032103 A1	13-02-2003
			US 2003022293 A1	30-01-2003
			US 2003040053 A1	27-02-2003
			US 2003027263 A1	06-02-2003
			US 2003032104 A1	13-02-2003
			US 2003073170 A1	17-04-2003
			US 2003027264 A1	06-02-2003
			US 2003017540 A1	23-01-2003
			US 2003027265 A1	06-02-2003
			US 2003032105 A1	13-02-2003
			US 2003032106 A1	13-02-2003
			US 2003027266 A1	06-02-2003
			US 2003008352 A1	09-01-2003
			US 2003022294 A1	30-01-2003
			US 2003027267 A1	06-02-2003
			US 2003027268 A1	06-02-2003
			US 2003073171 A1	17-04-2003
			US 2003027269 A1	06-02-2003
			US 2003027270 A1	06-02-2003
			US 2003032107 A1	13-02-2003
			US 2003073172 A1	17-04-2003
			US 2003022295 A1	30-01-2003
			US 2003040054 A1	27-02-2003
			US 2003032108 A1	13-02-2003
			US 2003022296 A1	30-01-2003
			US 2003017541 A1	23-01-2003
			US 2003044916 A1	06-03-2003
			US 2003032109 A1	13-02-2003
			US 2003032110 A1	13-02-2003
			US 2003027271 A1	06-02-2003
			US 2003087373 A1	08-05-2003
			US 2003027272 A1	06-02-2003
US 2003032111 A1	13-02-2003			
US 2003027273 A1	06-02-2003			
US 2003040055 A1	27-02-2003			
US 2003017542 A1	23-01-2003			
US 2003027274 A1	06-02-2003			
US 2003036117 A1	20-02-2003			
US 2003044917 A1	06-03-2003			
EP 1077259	A	21-02-2001	EP 1077259 A1	21-02-2001

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 02/02928

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1077259	A	WO 9958668 A1	18-11-1999
WO 0061754	A	19-10-2000	
		AU 4216800 A	14-11-2000
		CA 2365910 A1	19-10-2000
		EP 1169445 A2	09-01-2002
		WO 0061754 A2	19-10-2000
		US 2003003462 A1	02-01-2003
		US 2002172999 A1	21-11-2002
		US 2002168716 A1	14-11-2002
		AU 4729401 A	17-09-2001
		CA 2401552 A1	15-09-2001
		EP 1261712 A2	04-12-2002
		WO 0166747 A2	13-09-2001
		US 2003087816 A1	08-05-2003
		US 2002155115 A1	24-10-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100107836

弁理士 西 和哉

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 グラント・クラーク・セラー

イギリス・EH4・2XU・エジンバラ・クリュー・ロード・(番地なし)・ウエスタン・ジェネラル・ホスピタル・インペリアル・キャンサー・リサーチ・ファンド・メディカル・オンコロジー・ユニット

(72) 発明者 ハニ・ガブラ

イギリス・EH4・2XU・エジンバラ・クリュー・ロード・(番地なし)・ウエスタン・ジェネラル・ホスピタル・インペリアル・キャンサー・リサーチ・ファンド・メディカル・オンコロジー・ユニット

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 4B024 AA01 AA11 AA12 BA61 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12
 DA02 EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ20 QQ42 QQ53 QQ79 QR08
 QR32 QR42 QR55 QR62 QR66 QR82 QS10 QS25 QS34 QS36
 QX01
 4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA44 DC50 NA14 ZB261 ZB262
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	癌		
公开(公告)号	JP2004535806A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003508729	申请日	2002-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	癌症研究科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	癌症研究科技有限公司		
[标]发明人	グラントクラークセラー ハニガブラ		
发明人	グラント・クラーク・セラー ハニ・ガブラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q1/6809 C12Q2523/125 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/154 C12Q2600 /156 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68. A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024 /AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024 /GA18 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063 /QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084 /DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2001015673 2001-06-27 GB 60/305137 2001-07-16 US 60/330792 2001-10-31 US		
其他公开文献	JP4272512B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了与OBCAM和NTM基因相关的癌症的诊断，预后和治疗的方法。本发明的方法非常适用于卵巢癌和结肠直肠癌。

