



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 084**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01112004 .5**
86 Fecha de presentación : **23.05.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1158001**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2001**

54 Título: **Un ácido nucleico regulado positivamente en células cancerosas humanas, una proteína codificada de este modo y un proceso para el diagnóstico del tumor.**

30 Prioridad: **26.05.2000 EP 00110953**
15.07.2000 EP 00115369

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
4070 Basel, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

72 Inventor/es: **Kaul, Sepp;**
Preiherr, Josef y
Weidle, Ulrich

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 295 084 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un ácido nucleico regulado positivamente en células cancerosas humanas, una proteína codificada de este modo y un proceso para el diagnóstico del tumor.

5 El cáncer de mama es un problema importante de salud puesto que una de cada ocho mujeres en Europa y en los Estados Unidos sufren esta enfermedad (Moustafa, A.S., y Nicolson, G.L., *Oncol. Res.* 9 (1997) 505-525; Nicolson, G.L., *Biochem. Soc. Symp.* 63 (1998) 231-242). El tratamiento incluye cirugía, radiación, quimioterapia y combinaciones de estos, dependiendo del estadio de la enfermedad (Schwirzke, M., *et al.*, *Anticancer Res.* 19 (1999) 1801-1814). Esta enfermedad se caracteriza por un tropismo pronunciado de metástasis a los huesos que empieza con lesiones por micrometástasis en la médula ósea y que finalmente puede resultar en un episodio completo de metástasis. La metástasis ósea resulta en fracturas óseas y síndrome de depresión de la médula ósea a menudo seguido de dolor intenso, homeostasis de calcio anómala y finalmente dando la muerte de los pacientes (Coleman, R.E., y Rubens, R.D., *Br. J. Cancer* 55 (1987) 61-66).

15 El análisis de los genes involucrados en el cáncer de mama y en el cáncer en general revelan una dicotomía con una categoría de genes con expresión desregulada debido a una mutación y la otra categoría de genes con cambios en su regulación. Estos hallazgos resultaron en el agrupamiento de los genes de cáncer en dos clases: los genes de clase I, que están mutados o delecionados, y los genes de clase II, que no tienen alteraciones a nivel de DNA. (Sager, R., *Science* 246 (1989) 1406-1412; Sager, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 952-955).

Resumen de la invención

25 Según la presente invención, se proporciona una proteína y su gen relacionado, denominado PKW, regulado positivamente en células cancerosas, preferentemente en células de cáncer de mama, en comparación con sus homólogos no cancerosos. EL gen PKW codifica preferentemente un polipéptido que consiste en NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4.

30 La presente invención proporciona un ácido nucleico regulado positivamente en las células cancerosas, especialmente en células de cáncer de mama, y que codifica un polipéptido que induce a la progresión del tumor o metástasis, siendo el ácido nucleico seleccionado a partir de un grupo consistente en:

(a) NÚM. ID. SEC.: 1;

35 (b) una secuencia de ácidos nucleicos libre de la secuencia que naturalmente flanquea los extremos 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos de (a) que hibrida bajo condiciones rigurosas con una sonda de ácido nucleico de la secuencia complementaria de (a);

40 (c) una secuencia de ácidos nucleicos que, debido a la degeneración del código genético, no es una secuencia de (a) o (b), pero codifica un polipéptido que tiene exactamente la misma secuencia aminoacídica que un polipéptido codificado por una secuencia de (a) o de (b); y

45 (d) una secuencia de ácidos nucleicos que es un fragmento de al menos 138 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de (a), (b) o (c), y codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos de NÚM. ID. SEC.: 2 o NÚM. ID. SEC.: 4, con la condición de que dicha secuencia de ácidos nucleicos no sea idéntica a la secuencia complementaria de NÚM. ID. SEC.:12.

50 El ácido nucleico codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos de NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4 y tiene preferentemente una longitud de al menos 138 nucleótidos.

La presente invención, además, proporciona un polipéptido purificado con una secuencia de aminoácidos de NÚM. ID. SEC.: 2 o NÚM. ID. SEC.:4.

55 La presente invención, además, proporciona un proceso para detectar la presencia o ausencia de al menos un ácido nucleico o una mezcla de ácidos nucleicos específicos, o para diferenciar entre dos secuencias diferentes en una muestra que se cree que puede contener dicha secuencia o secuencias y se ha obtenido preferentemente de un paciente con cáncer o del que se cree que puede padecer cáncer, este proceso comprende los siguientes pasos:

60 (a) incubar dicha muestra bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda de ácido nucleico que se ha seleccionado a partir de un grupo que consiste en:

(i) una secuencia de ácidos nucleicos de NÚM. ID. SEC.:1 o un fragmento de la misma;

65 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos de (i);

- (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (i); y
- (iv) una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (ii); y

5 (b) determinar si dicha hibridación ha tenido lugar o no.

Preferiblemente, dicha secuencia no es idéntica a NÚM. ID. SEC.:12 y/o tiene una longitud de al menos 138 nucleótidos.

10 Además, la presente invención proporciona un proceso para determinar si una muestra analítica de tejido o líquido de un paciente contiene células cancerosas o se ha obtenido a partir de células cancerosas, en el que se utiliza la muestra analítica y una segunda muestra obtenidas a partir de células no cancerosas del mismo individuo o de un individuo distinto de la misma especie, este proceso comprende los siguientes pasos:

15 (a) incubar cada muestra respectiva bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda de ácido nucleico que se selecciona a partir de un grupo que consiste en:

- (i) una secuencia de ácidos nucleicos de NÚM. ID. SEC.: 1, o un fragmento de la misma;
- 20 (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a cualquier secuencia de ácidos nucleicos de (i);
- (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones rigurosas con la secuencia de (i);y
- 25 (iv) una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones restrictivas con la secuencia de (ii); y

(b) determinar la cantidad aproximada de hibridación de cada muestra respectiva con dicha sonda, y

30 (c) comparar la cantidad aproximada de hibridación de la muestra analítica con la cantidad aproximada de hibridación de dicha segunda muestra para identificar si la muestra analítica tiene una cantidad de ácido nucleico específico o de mezcla de ácidos nucleicos superior a la de la segunda muestra.

35 La invención además proporciona un método para la detección del cáncer de mama ya que PKW se expresa sólo en células de cáncer de mama o en células metastásicas del mismo.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona el nuevo gen PKW, las proteínas codificadas por este y el uso del gen PKW para el diagnóstico y tratamiento, especialmente en el campo del cáncer. En particular, la invención incluye la identificación de dicho gen PKW en células cancerosas, especialmente en células de cáncer de mama y en sustancias derivadas de células cancerosas como extractos de DNA y RNA obtenidos a partir de células. La invención también está relacionada con la detección de células cancerosas.

45 La invención comprende un ácido nucleico (PKW) que tiene una expresión regulada positivamente en las células cancerosas y que es capaz de inducir a la progresión del tumor y/o metástasis, especialmente en las células de cáncer de mama. El ácido nucleico (PKW) tiene la secuencia NÚM. ID. SEC.:1 o es un ácido nucleico que, debido a la degeneración del código genético, difiere del NÚM. ID. SEC.:1 y es preferentemente un ácido nucleico que codifica la secuencia aminoacídica de NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4.

50 La invención además comprende polipéptidos recombinantes codificados por la secuencia de ácidos nucleicos según la invención, preferentemente por la secuencia de DNA que se muestra en NÚM. ID. SEC.:1 o fragmentos de la misma que codifican preferentemente los polipéptidos de NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4.

55 El polipéptido PKW puede producirse en variaciones alélicas naturales que difieren entre individuos. Tales variaciones de los aminoácidos son normalmente sustituciones aminoacídicas. Sin embargo, también pueden ser deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos a la secuencia total. Según la invención, el polipéptido PKW- dependiendo, con respecto a la extensión y el tipo, de la célula y el tipo celular en el cual se expresa - puede ser una forma glucosilada o no glucosilada. Según la invención, los polipéptidos se pueden identificar mediante la transfección de células
60 no cancerosas negativas para PKW con vectores de expresión para PKW, el establecimiento de transfectantes estables y la evaluación de su capacidad de progresión cancerosa después del xenoinjerto en ratones atímicos (*nude mice*).

65 “Polipéptido con actividad PKW o PKW” también significa una proteína con variaciones aminoacídicas menores pero sustancialmente con la misma actividad PKW. “Sustancialmente la misma” significa que las actividades tienen las mismas propiedades biológicas y que los polipéptidos muestran al menos un 90% de homología (identidad) en la secuencia aminoacídica.

ES 2 295 084 T3

El término “molécula de ácido nucleico o ácido nucleico” significa una molécula polinucleotídica que puede ser, por ejemplo, DNA, RNA o derivados activos de DNA o RNA. No obstante, se prefieren las moléculas de DNA y/o RNA.

5 El término “hibridar bajo condiciones rigurosas” significa que dos fragmentos de ácidos nucleicos son capaces de hibridar el uno con el otro bajo condiciones de hibridación habituales descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Más específicamente, el término “condiciones rigurosas” se utiliza aquí para referirse a la hibridación en SSC 6,0 x de 45°C a 55°C, preferentemente de 50°C a 55°C, seguido de un lavado. Este lavado puede ser con SSC 2,0X a 50°C. Preferentemente, la hibridación se efectúa utilizando la Solución de Hibridación Express Hyb™ de Clontech, comercialmente disponible, que es una solución no viscosa y contiene DNA de esperma de salmón. La restricción de la concentración de sales en el paso del lavado se puede escoger, por ejemplo, a partir de SSC 2,0X a 50°C, aproximadamente, para una restricción baja, hasta SSC 0,2 x a 50°C, para una restricción alta. Además, la temperatura en el paso de lavado se puede aumentar a partir de condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta restricción de alrededor de 65°C.

La frase “ácido nucleico o polipéptido” tal y como se utiliza a lo largo de este documento se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que tiene actividad PKW y que está sustancialmente libre de sustancias celulares o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de DNA recombinante, o sustancialmente libre de precursores químicos o otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Tal ácido nucleico no contiene las secuencias que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico.

Los polipéptidos según la invención se pueden producir mediante métodos de recombinación, o sintéticamente. El polipéptido PKW no glucosilado se obtiene cuando se produce por recombinación en procariotas. Con la ayuda de las secuencias de ácidos nucleicos proporcionada por la invención es posible buscar el gen PKW o sus variantes en el genoma de cualquier célula deseada (por ejemplo, a parte de células humanas, también en células de otros mamíferos), para identificarlas y aislar el gen deseado que codifica las proteínas PKW. Tales procesos y las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidos por los expertos en el ámbito y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, y Hames, B.D., Higgins, S.G., Nucleic Acid Hybridisation - A Practical Approach (1985) IRL Press, Oxford, England. En este caso, los protocolos habituales descritos en estas publicaciones se utilizan normalmente para los experimentos.

Con la ayuda de tales ácidos nucleicos que codifican el polipéptido PKW, según la invención se puede obtener el polipéptido de un modo reproducible y en grandes cantidades. Para la expresión en organismos procariotas o eucariotas, tales como células huésped procariotas o células huésped eucariotas, el ácido nucleico se integra en vectores de expresión adecuados, según los métodos familiares para un experto en el ámbito. Tal vector de expresión contiene preferentemente un promotor regulable/inducible. Estos vectores recombinantes e introducen entonces para su expresión en células huésped adecuadas tales como, por ejemplo, *E. coli* como célula huésped procariota o *Saccharomyces cerevisiae*, línea celular PA-1 de Teratocarcinoma, sc 9117 (Büttner *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 3573-3583), células de insectos, células CHO o COS como células huésped eucariotas y las células huésped transformadas o transducidas se cultivan bajo condiciones que permitan la expresión del gen heterólogo. El aislamiento de la proteína se puede realizar según los métodos conocidos a partir de la célula huésped o a partir del sobrenadante del cultivo de la célula huésped. Tales métodos se describen por ejemplo por Ausubel I., Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, New York. También puede ser necesaria la reactivación *in vitro* de la proteína si no se encuentra en forma soluble en el cultivo celular.

El polipéptido PKW se puede purificar después de la producción por recombinación mediante cromatografía de afinidad utilizando técnicas de purificación de proteínas conocidas, que incluyen inmunoprecipitación, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de enfoque, enfoque isoeléctrico, precipitación selectiva, electroforesis, o similares.

Además, la invención comprende vectores de expresión recombinantes que son adecuados para la expresión de PKW, células huésped recombinantes transfectadas con tales vectores de expresión, así como un proceso para la producción recombinante de una proteína codificada por el gen PKW.

La invención, además, comprende un método para detectar una molécula de ácido nucleico del gen PKW, que comprende la incubación de una muestra (por ejemplo, líquidos corporales como la sangre, lisados celulares o un transcrito reverso de una muestra de RNA) con la molécula de ácido nucleico según la invención y determinando la hibridación bajo condiciones restrictivas de dicha molécula de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico diana para la determinación de la presencia de una molécula de ácido nucleico que es el gen PKW y por lo tanto un método para identificar células tumorales y preferentemente de carcinomas de mama. La detección cuantitativa se puede llevar a cabo mediante técnicas de PCR, preferentemente mediante el uso de RT-PCR cuantitativa utilizando, por ejemplo, el cicladador LightCycler® de Roche Diagnostics GmbH, DE.

Para determinar si una muestra analítica contiene células cancerosas o no, se determina la cantidad aproximada de hibridación del ácido nucleico con el ácido nucleico diana o ácidos nucleicos. No es necesario que se determine cuan-

titativamente la cantidad aproximada de hibridación, aunque se incluye una determinación cuantitativa en la presente invención. Normalmente, la cantidad aproximada de hibridación se determina cualitativamente, por ejemplo, mediante una inspección visual en detección de hibridación. Por ejemplo, si se utiliza un gel para resolver un ácido nucleico marcado que hibrida con un ácido nucleico diana en la muestra, la banda resultante se puede examinar visualmente.

5 Cuando se efectúa una hibridación de ácido nucleico aislado y que no contiene células cancerosas, obtenido de células de un individuo de la misma especie, se sigue el mismo protocolo. Se puede comparar la cantidad aproximada de hibridación en la muestra analítica con la cantidad aproximada de hibridación en la muestra que no contiene células cancerosas, para identificar si la muestra analítica contiene una cantidad superior del ácido nucleico diana o ácidos nucleicos que la muestra que no contiene células cancerosas.

10 En un método adicional según la invención, no se utiliza una segunda muestra. Para detectar si la expresión del gen PKW está regulada positivamente, se compara el nivel de mRNA de PKW con el nivel de mRNA de un gen estándar (gen de mantenimiento (ver, por ejemplo, Shaper, N.L., *et al.*, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 3 (1998) 315-324; Wu, Y.Y., *et al.*, Acta Derm. Venerol. 80 (2000) 2-3) de la célula, preferentemente mediante RT-PCR.

15 Para el examen visual en particular, se recomienda que se visualice una diferencia apreciable para evaluar que la muestra analítica contiene una mayor cantidad del ácido nucleico diana o de ácidos nucleicos.

20 Como se muestra según la presente invención, el ácido nucleico PKW se expresa en una cantidad superior en una muestra de tumor que en una muestra que no contiene células cancerosas y/o en una cantidad superior que en un gen de mantenimiento. Una muestra analítica que contiene células cancerosas tendrá una cantidad superior del ácido nucleico PKW que una muestra que no contiene células cancerosas. Para identificar una muestra analítica que contiene el ácido nucleico PKW regulado positivamente, es decir, donde las células son células cancerosas o células tumorales de un cáncer de mama, es preferible que la muestra analítica tenga una cantidad aproximada del ácido nucleico PKW que es apreciablemente superior que la cantidad aproximada en una muestra que no contiene células cancerosas. Por ejemplo, una muestra analítica con el gen PKW regulado positivamente puede tener una cantidad de gen PKW de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 60 veces mayor que una muestra que no tiene células cancerosas o al menos una cantidad de mRNA de PKW 3 veces mayor que el mRNA de un gen de mantenimiento como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH, por sus siglas en inglés) o la porfobilinógeno desaminasa.

30 En base a los ácidos nucleicos proporcionados por la invención es posible proporcionar una prueba que se puede usar para detectar ácidos nucleicos con una expresión regulada positivamente en las células tumorales humanas. Dicha prueba se puede llevar a cabo por métodos de diagnóstico de ácidos nucleicos. En este caso, la muestra a examinar entra en contacto con una sonda seleccionada a partir de un grupo que comprende:

35 a) la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en NÚM. ID. SEC.:1, fragmentos de la misma o una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una de estas secuencias de ácidos nucleicos, y

40 b) ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones restrictivas con uno de los ácidos nucleicos de a), en el que la sonda de ácido nucleico se incuba con el ácido nucleico de la muestra y se detecta la hibridación opcionalmente por medio de una pareja de unión adicional para el ácido nucleico de la muestra y/o la sonda de ácido nucleico. Para obtener un ácido nucleico mediante hibridación según el paso b), es preferible hibridarlo con una sonda seleccionada a partir del grupo de ácidos nucleicos definidos por las bases 724 a 1235 (transcrito pequeño) o bases 1831-2342 (transcrito grande) de NÚM. ID. SEC.:1, un fragmento del mismo de al menos 200 bases o una secuencia complementaria a esta.

45 La hibridación entre la sonda utilizada y los ácidos nucleicos de la muestra indica la presencia del RNA de dichas proteínas.

50 Los métodos de hibridación de una sonda y un ácido nucleico son conocidos por los expertos en el ámbito y se describen, por ejemplo, en Wa 89/06698, EP-A 0 200 362, Patente estadounidense núm. 2 915 082, EP-A 0 063 879, EP-A 0 173 251, EP-A 0 128 018.

55 En un modo de realización preferido el ácido nucleico codificante de la muestra se amplifica antes de la prueba, por ejemplo mediante la conocida técnica de PCR. Normalmente se utiliza una sonda de ácido nucleico derivatizada (marcada) dentro del marco del diagnóstico por hibridación ácidos nucleicos. Esta sonda entra en contacto con DNA, RNA o RT-DNA desnaturalizados de la muestra que está unida a un transportador y en este proceso se seleccionan la temperatura, la fuerza fónica, el pH y otras condiciones del tampón -dependiendo de la longitud y la composición de la sonda de ácido nucleico y la temperatura de fusión resultante del híbrido esperado- para que el DNA o RNA marcado se pueda unir a DNA o RNA homólogos (hibridación, ver también Wahl, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 3683-3687). Los transportadores adecuados son membranas o sustancias transportadoras basadas en nitrocelulosa (por ejemplo., Schleicher y Schüll, BA 85, Amersham Hybond, C.), nitrocelulosa reforzada o enlazada en polvo o membranas de nailon derivatizadas con varios grupos funcionales (por ejemplo, grupos nitro) (por ejemplo, Schleicher y Schüll, Nytran; NEN, Gene Screen; Amersham Hybond M.; Pall Biodyne).

65 El DNA o RNA hibridado se detecta entonces mediante la incubación del transportador con un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo después de un lavado minucioso y una saturación para evitar las uniones inespecíficas. El anticuerpo o fragmento del anticuerpo se dirige hacia la sustancia incorporada a la sonda de ácido nucleico durante la hibridación. A continuación se marca el anticuerpo. Sin embargo, también se puede utilizar un DNA directamente

ES 2 295 084 T3

marcado. Después de la incubación con los anticuerpos se lava otra vez para detectar sólo los conjugados de anticuerpo unidos específicamente. La resolución se lleva a cabo de acuerdo con los métodos conocidos mediante la marca del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo.

5 La detección de la expresión se puede llevar a cabo por ejemplo como:

- hibridación *in situ* con células enteras fijadas, con frotis de tejido fijados,

10 - hibridación de colonias (células) e hibridación en placas (fagos y virus),

- hibridación Southern (detección de DNA),

- hibridación Northern (detección de RNA),

15 - análisis de suero (por ejemplo, análisis de tipo celular de células en el suero mediante análisis slot-blot),

- posterior a la amplificación (por ejemplo, técnica de PCR).

20 Por eso la invención también incluye un método para la detección de las células de carcinoma, que comprende

a) incubar una muestra de un paciente que sufre de cáncer, seleccionada del grupo de muestras posibles: fluido corporal, células, o un extracto celular o el sobrenadante de un cultivo celular de dichas células, donde dicha muestra contiene ácidos nucleicos con una sonda de ácido nucleico que se selecciona del grupo consistente en

25 (i) el ácido nucleico que se muestra en NÚM. ID. SEC.:1 o un ácido nucleico complementario a dicha secuencia, y

(ii) ácidos nucleicos que hibridan con uno de los ácidos nucleicos de (i) y

30 b) detectar hibridación, preferentemente mediante una pareja de unión adicional del ácido nucleico de la muestra y/o la sonda de ácido nucleico o mediante radiografía de rayos X.

Además, la invención comprende un proceso para determinar si una muestra analítica originada a partir de o que contiene células humanas tiene un potencial de progresión tumoral o no, proceso que comprende los siguientes pasos:

35 (a) incubar una primera parte de dicha muestra bajo condiciones restrictivas de hibridación con una primera sonda de ácido nucleico que se escoge del grupo que consiste en:

40 (i) un ácido nucleico con la secuencia de NÚM. ID. SEC.:1 o un fragmento de este;

(ii) un ácido nucleico con una secuencia complementaria a cualquiera de los ácidos nucleicos de (i);

(iii) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (i); y

45 (iv) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (ii); y

50 (b) incubar una segunda parte de dicha muestra bajo condiciones restrictivas de hibridación con una segunda sonda de ácido nucleico, siendo esta un gen de mantenimiento o un fragmento de este;

(c) determinar la cantidad aproximada de hibridación de dicha muestra con dichas primera y segunda sonda;

55 (d) identificar si la muestra analítica contiene o no una cantidad de ácido nucleico hibridado con la primera sonda al menos 3 veces superior a la cantidad de ácido nucleico hibridado con la segunda sonda.

60 Preferentemente, la sonda de ácido nucleico se incuba con el ácido nucleico de la muestra y la hibridación se detecta opcionalmente mediante una pareja de unión adicional para el ácido nucleico de la muestra y/o la sonda de ácido nucleico. Como sondas, se prefieren ácidos nucleicos seleccionados del grupo consistente en ácidos nucleicos definidos por las bases 724 a 1235 (transcrito pequeño) o las bases 1831-2343 (transcrito grande) de NÚM. ID. SEC.:1, un fragmento de la misma de al menos 200 bases o una secuencia complementaria a esta.

65 Los ácidos nucleicos según la invención son por lo tanto marcadores de gran valor en el diagnóstico y la caracterización de tumores, especialmente de de tumores de mama.

La invención además comprende un método para producir una proteína, la expresión de la cual se correlaciona con tumores, mediante la expresión de un DNA exógeno en células huésped procariotas o eucariotas y el aislamien-

ES 2 295 084 T3

to de la proteína deseada, donde la proteína es codificada por las moléculas de ácido nucleico según la invención, preferentemente mediante la secuencia de DNA que se muestra en NÚM. ID. SEC.:1.

La proteína se puede aislar a partir de células o el sobrenadante del cultivo y purificar mediante métodos de cromatografía, preferentemente mediante cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y/o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de fase reversa.

La invención además comprende una proteína según la invención codificada por una molécula de ácido nucleico según la invención, que tiene preferentemente la secuencia expuesta en NÚM. ID. SEC.:1.

La presente invención comprende el clonaje y la caracterización del gen PKW, que está caracterizado especialmente como gen de progresión tumoral, y como un gen regulado positivamente, indicativo del potencial de progresión tumoral de las células cancerosas, preferentemente de las células de cáncer de mama.

Como se muestra en la Figura 1, el gen PKW se expresa sólo en una de las líneas celulares del carcinoma primario, la que deriva del carcinoma medular de mama. En la Figura 2 se resume esquemáticamente la tipología de los transcritos pequeño y grande del gen PKW, así como las proteínas potenciales codificadas por estos. Los transcritos pequeño y grande del gen PKW comparten 723 pb en el extremo 5' y 512 pb en el extremo 3'. El transcrito grande contiene una inserción de 1107 pb (Fig. 2A). El transcrito pequeño (pb 459-723 y 1831-1850 de NÚM. ID. SEC.:1) se debe al corte y empalme diferencial del transcrito grande. El transcrito pequeño codifica una proteína potencial de 95 aa, el transcrito largo muestra un marco de lectura abierto de 130 aa. Ambas proteínas potenciales comparten un marco de lectura abierto de 88 aa con la excepción de un aa distinto en la posición 43 (ácido nucleico de la posición 586 de NÚM. ID. SEC.:1), seguido de extensiones de 7 aa y 42 aa para la proteína pequeña y grande en distintos marcos de lectura. La diferencia en la posición 43 puede deberse a un dispositivo de la PCR o puede estar causada por un polimorfismo. La proteína de 95 aa presenta un punto isoelectrico (pI) de 11,2, el pI de la proteína de 130 aa es de 10,4. Estos hallazgos indican una localización nuclear de las proteínas codificadas por el gen PKW. Una búsqueda mostró una semejanza parcial con un clon derivado de una genoteca BAC humana (AQ548392) (NÚM. ID. SEC.:12). Sin embargo, la base de datos no proporciona ningún indicio sobre las secuencias codificantes y/o la utilidad.

Como se muestra en la Figura 3, los transcritos del gen PKW se detectaron sólo en la glándula salival, y no en otros tejidos de humanos adultos, y en un pequeño grupo de pruebas analíticas de tejidos embrionarios como el cerebro fetal, corazón, riñón, hígado, bazo, timo y pulmón. La línea celular HL-60 de la leucemia promielocítica, células HeLa, línea celular K-562 de la leucemia mielógena crónica, línea celular MOLT-4 de la leucemia linfoblástica, línea celular Raji del linfoma de Burkitt, línea celular SW 480 del adenocarcinoma colorectal, línea celular A549 del carcinoma de pulmón y línea celular G361 del melanoma, todas dieron un resultado negativo con respecto al mRNA para el gen PKW (Fig. 3). La sonda utilizada para la hibridación detecta el transcrito pequeño del gen PKW así como el grande. Un grupo de pruebas analíticas de las líneas celulares de carcinoma de mama descritas en (Schwirzke, M., *et al.*, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1409-1421) también dio resultados negativos con respecto al mRNA del gen PKW mediante el método de transferencia Northern, así como RT-PCR. Estas incluyen los subclones 4C4 y 2A5 derivados de MDA-435 (Cailleau, R., *et al.*, *In Vitro* 14 (1978) 911-915), las líneas celulares MDA-MB231 (Cailleau, R., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974) 661-674), MDA-MB436 (Cailleau, R., *et al.*, *In Vitro* 14 (1978) 911-915), ZR-75 (Engel, L.W., *et al.*, *Cancer Res.* 38 (1978) 3352-3364), T47D (Freake, H.C., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 1131-1138), Hs578 T (Hack-ett, A.J., *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (1977) 1795-1806), MCF-7 (Schiemann, S., *et al.*, *Anticancer Res.* 17 (1997) 13-20; Schiemann, S., *et al.*, *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 129-139), MCF-7_{ADR} (Schiemann, S., *et al.*, *Anticancer Res.* 17 (1997) 13-20; Lee, J.H., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (1997) 462-467), LCC-1, LCC-2 y LCC-9 (Brunner, N., *et al.*, *Cancer Res.* 53 (1993) 283-290; Brunner, N., *et al.*, *Cancer Res.* 53 (1993) 3229-3232). En resumen, se analizó la expresión del transcrito pequeño del gen PKW mediante RT-PCR en 11 carcinomas mamarios. Cuatro carcinomas fueron positivos. Parte de los resultados se muestran en la Figura 4. Dos de los carcinomas positivos correspondieron a carcinomas ductales y los otros dos encajaban con carcinomas lobulillares.

Los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

NÚM. ID. SEC.:1: cDNA del gen PKW y secuencia aminoacídica de la variante de corte y empalme grande de PKW.

NÚM. ID. SEC.:2: Aminoácidos de la variante de corte y empalme grande de PKW.

NÚM. ID. SEC.:3: cDNA y secuencia aminoacídica de la variante de corte y empalme pequeña de PKW.

NÚM. ID. SEC.:4: Aminoácidos de la variante de corte y empalme pequeña de PKW

NÚM. ID. SEC.:5: Cebador GSP1

NÚM. ID. SEC.:6: Cebador GSP2

NÚM. ID. SEC.:7: Cebador AUAP

5 NÚM. ID. SEC.:8: Cebador RTR-5

NÚM. ID. SEC.:9: Cebador RTF-6

10 NÚM. ID. SEC.:10: Cebador inverso de β -actina

NÚM. ID. SEC.:11: Cebador directo de β -actina

15 NÚM. ID. SEC.:12: Fragmento de secuencia AQ 548392.

Descripción de las figuras

20 Figura 1 El método Northern revela mRNA's expresados diferencialmente en líneas celulares derivadas de glándulas mamarias humanas normales y cánceres de mama en distintos estadios de progresión.

El RNA se extrajo de líneas celulares confluentes, se separó en un gel desnaturizante de agarosa-formaldehído al 1%, se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente y se hibridó con una sonda marcada con [α -³²P] correspondiente al fragmento subclonado adecuado como se indica en la Técnica de Cribado Diferencial.

25 Carril a: HMEC, células epiteliales mamarias normales humanas; carril b: línea celular AR derivada de cáncer de mama medular; carril c: línea celular WA derivada de carcinoma mamario ductal invasivo; carriles d, e y f: líneas celulares 1590, HG15 y KM22, derivadas de micrometástasis de cáncer de médula ósea; carril g: línea celular KS de cáncer de mama metastásico, derivada de líquidos de ascitis maligna.

Figura 2 Esquema de los transcritos del gen PKW así como proteínas potenciales codificadas por estos transcritos. Las regiones y los dominios correspondientes están marcados mediante la simbología conservada.

35 Figura 3 Matriz de tejidos múltiples

Se hibridaron un RNA poli A⁺ de distintos tejidos y líneas celulares con una sonda marcada con 32-P derivada del gen PKW. E6 corresponde a 1 μ g y H6 a 0,1 μ g de RNA poli A⁺ de la línea celular AR. El código se muestra abajo.

40 Figura 4 Detección de transcritos del gen PKW en cánceres de mama mediante RT-PCR.

Se extrajo RNA de cánceres de mama y se analizaron los transcritos correspondientes específicamente al transcrito pequeño del gen PKW, tal y como se describe en el Ejemplo 9.

45 carril 0: Marcador de peso molecular XIV (Roche Diagnostics GmbH, DE);

I: línea celular AR; II-IX: muestras de distintos cánceres de mama;

50 carril a: control de β -actina (2,5 μ g RNA + cebadores específicos para la β -actina); carril b: (2,5 μ g RNA + cebadores específicos para el gen PKW); carril c: controles negativos sin RT (retrotranscriptasa): 2,5 μ g RNA + cebadores específicos para el gen PKW.

Se analizó una alícuota (15 μ L) de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5%. Las bandas correspondientes específicamente a los mRNA's del gen PKW {137 pb) y de la β -actina (587 pb) están señaladas con flechas.

55

Ejemplo 1

Líneas celulares y cultivo celular

60 Las células epiteliales mamarias humanas (HMEC) se obtuvieron de Bio Whittaker, Heidelberg, Alemania. Las líneas celulares AR y WA del carcinoma mamario primario se obtuvieron mediante la fragmentación del tumor primario con tijeras, tratamiento con colagenasa (0,2 mg/mL en suero de ternera fetal (FCS) al 5%) y finalmente se aisló la fracción celular mediante la técnica del gradiente de Ficoll. Las células tumorales se seleccionaron con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno MUC-1 que recubría a Dynabeads® (DynaL, Noruega). Los anticuerpos contra MUC-1 se describen en WO 99/40881. Se mezclaron 5 x 10⁷ microesferas con 10⁷ células, se incubó la mezcla durante 1 h a 4°C en un dispositivo giratorio, se recogió la fracción de microesferas en un imán, se lavó dos veces con DMEM y finalmente se propagaron las células en frascos de cultivo de 75 cm² complementados con FCS al 10%. Se

65

ES 2 295 084 T3

identificaron dos clones 4 semanas después para ambas líneas celulares denominadas AR y WA. La línea celular AR se deriva de un carcinoma mamario medular invasivo, la línea celular WA se derivada de un carcinoma ductal invasivo. Las líneas celulares 1590, HG15 y KM22 se derivan de micrometástasis del cáncer de mama en la médula ósea. La fracción celular se aisló en gradiente de Ficoll, se lisaron los eritrocitos y se suspendieron las células en DMEM + FCS al 10% y las células cancerosas se aislaron en Dynabeads® acoplados con anticuerpo contra MUC-1 como se describe más abajo. La fracción de microesferas se cultivó en DMEM + FCS al 10%, 10 µg/mL de insulina y 10 µg/mL de transferrina. Ocho semanas más tarde se observó el efecto de las líneas celulares cancerosas. Se aislaron los clones mediante tratamiento con EDTA y se propagaron bajo condiciones estándares como se describe más abajo. La línea celular KS se aisló de fluido de ascitis maligna de paciente de cáncer de mama. Se recogieron 2000 mL de ascitis y se aisló la fracción celular en gradiente de Ficoll. Se sembraron 2 x 10⁷ células en frascos de cultivo de 750 cm². Se obtuvieron grupos de células cancerosas a partir de los sobrenadantes del cultivo para separarlos de los fibroblastos y las células mesoteliales crecientes con adherencia (pasos 1-4). Los pasos 5-10 dieron como resultado cultivos en crecimiento parcialmente en monocapa y en suspensión. Finalmente, las células se propagaron como una monocapa en DMEM + FCS al 10%.

Ejemplo 2

PCR de cribado diferencial de mRNA

Se llevó a cabo un cribado diferencial por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (DD-RT-PCR) siguiendo el método descrito por Liang y Pardee utilizando el equipo de RNAimage™ (GenHunter Corp. Brookline, MA) según el protocolo del fabricante.

Se aisló el RNA total a partir de los sedimentos de células congeladas de todas las líneas celulares enumeradas anteriormente, utilizando el equipo de RNeasy Midi® Kit (Qiagen, www.qiagen.de). El DNA cromosómico se eliminó de las muestras de RNA mediante digestión a 37°C durante 30 minutos con desoxirribonucleasa I sin de ribonucleasas utilizando el MessageClean Kit® (GenHunter Corp. Brookline, MA).

Se utilizó el RNA como molde para la síntesis de la primera cadena de cDNA en presencia de tres cebadores oligo-dT anclados a una base (H-T₁₁M, donde M puede ser G, A o C).

Para una reacción de 20 µL, se mezclaron 1 µL de H₂O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), 4 µL de tampón de retrotranscriptasa 5x [125 mM de Tris-Cl, pH 8,3, 188 mM de KCl, 7,5 mM de MgCl₂, 25 mM de ditioneitol (DDT)], 10 µL de mezcla de dNTP [250 µM de cada uno], 2 µL de cebador H-T₁₁M [2 µM], y 2 µL de muestra de RNA total libre de DNA [0,1 µg/µL]. Se calentó la solución a 65°C durante 5 min y se enfrió a 37°C durante 10 min, y se añadió 1 µL [100 unidades] de retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, por sus siglas en inglés). Después de incubar la mezcla a 37°C durante 1 h, se terminó la reacción mediante incubación a 75°C durante 5 min. La siguiente PCR se llevó a cabo en una reacción de 20 µL, que contenía 2 µL de la mezcla de reacción de la retrotranscripción, 9,2 µL de H₂O tratada con DEPC, 2 µL de tampón de PCR 10x [100 mM de Tris-Cl, pH 8,4, 500 mM de KCl, 15 mM de MgCl₂, gelatina al 0,01%], 1,6 µL de mezcla de dNTP [25 µM de cada uno], 2 µL del cebador H-T₁₁M respectivo [2 µM], 2 µL de un cebador arbitrario de 13 nucleótidos, [2 µM], 1 µL de α-[³⁵S]dATP [>1000 Ci/mmol] y 0,2 µL de DNA polimerasa AmpliTag [10 unidades/µL] (Perkin Elmer, Norwalk, CT). La PCR incluía un total de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 40°C durante 2 minutos, 72°C durante 30 segundos y finalmente 5 minutos a 72°C. Después de añadir 2 µL de tampón de carga a 3,5 µL de cada muestra, los productos de PCR de todas las líneas celulares se calentaron a 80°C durante 2 minutos y se cargaron en paralelo en un gel de secuenciación de poliacrilamida al 6% desnaturalizante para una electroforesis. El gel seco se expuso a una película de BioMax™ MR (Kodak) a temperatura ambiente durante de 24 a 48 h y se analizó el autoradiograma para los genes expresados diferencialmente. Las bandas correspondientes a los cDNA's de interés que se podían visualizar de forma reproducible en dos reacciones de DD-RT-PCR independientes se escindieron del gel seco, y el DNA se eluyó del gel sumergiendo la porción del gel en 100 µL de dH₂O durante 10 minutos y se hirvió durante 15 minutos. Después de añadir 10 µL de 3M NaOAc y 5 µL de glicógeno [10 mg/mL] como transportador, los fragmentos de cDNA se recuperaron mediante precipitación con 450 µL de etanol y se redisolieron en 10 µL de dH₂O. Se reamplificaron 4 µL del cDNA eluido en una segunda PCR utilizando el mismo conjunto de cebadores y las mismas condiciones, excepto las concentraciones de dNTP de 20 µM cada uno y sin radioisótopos. Como control, se escindieron porciones de gel de los carriles sin bandas visibles a la altura de los fragmentos del cDNA de interés detectados y se trataron como se describe arriba. Los productos de PCR amplificada obtenidos se analizaron en un gel de agarosa, 3% NuSieve® GTG (FMC Bio-Products, Rockland), y se purificaron utilizando el equipo de extracción de gel QIAquick™ Gel Extraction (Qiagen, DE) y se utilizaron como sondas para el análisis con el método Northern.

Ejemplo 3

Secuenciación del DNA de los fragmentos de DD-RT-PCR

Todos los fragmentos de PCR de interés se secuenciaron directamente después de la extracción y la purificación de todos los geles de agarosa. Los datos de las secuencias de nucleótidos se analizaron para estudiar las homologías con genes conocidos o EST's (etiquetas de secuencia expresada) en las bases de datos de DNA actuales.

ES 2 295 084 T3

Ejemplo 4

Método de transferencia Northern

5 Se aisló el poli A⁺-RNA del RNA total. Se cargó 1 μg de poli A⁺-RNA de las células HMEC, AR, WA, 1590, KM22, HG15 y KS uno al lado del otro en un gel de formaldehído de agarosa al 1% desnaturalizante y luego se separaron en función del tamaño mediante electroforesis. La transferencia (por adsorción) a membrana de nailon cargada positivamente se efectuó mediante transferencia por capilaridad hacia debajo. Tras el entrecruzamiento por UV Stratagene UV Strata-linkerTM 2400, www.stratagene.com), se hibridaron los transferidos. Para esto, se marcaron los productos de la DD-RT-PCR con α -[³²P]dATP para una actividad específica de 2×10^9 cpm/ μg . La prehibridación (30 min) y la hibridación (durante toda la noche) con las sondas radiactivas se llevaron a cabo en la solución de hibridación ExpressHybTM (Clontech, www.clontech.com) a 68°C, de acuerdo con la recomendación del fabricante. Las membranas se lavaron en la solución 1 (2x SCC, 0,05% SDS) a temperatura ambiente durante 30-40 minutos con agitación continua y varios reemplazamientos de la solución de lavado 1 seguido de un paso de lavado con la solución 2 (SSC 0,01X, 0,1% SDS) a 50°C durante 40 minutos con un cambio de solución nueva. Entonces las membranas se expusieron a las películas de CronexTM, Medical X-Ray Films (Sterling Diagnostic Imaging Inc., USA) a -80°C durante 3 a 72 horas. Se calculó una cantidad igual de carga y transferencia del mRNA a las membranas mediante la rehibridación de la transferencia con deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH) marcada con α -[³²P]dATP.

Ejemplo 5

Clonación de los fragmentos de DD-RT-PCR

25 El análisis mediante el método Northern se llevó a cabo primero utilizando sondas de hibridación generadas directamente mediante la reamplificación por PCR. Los fragmentos de PCR amplificados correspondientes a mRNA's expresados diferencialmente en un método Northern se subclonaron. Los fragmentos subclonados se aislaron y se almacenaron para los experimentos posteriores para verificar la expresión diferencial.

Ejemplo 6

PCR rápida de amplificación del extremo 5' del cDNA (5' RACE PCR)

35 Este método se aplicó para aislar el cDNA del gen PKW. Para identificar las secuencias 5' de ambos transcritos se realizó una PCR RACE 5' siguiendo el manual como se describe en el 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Kit, Version 2.0 (Gibco BRL, Life Technologies). La primera cadena de cDNA se sintetizó a partir del RNA total (sin digestión con desoxirribonucleasa I) utilizando el cebador específico de gen GSP1 (5' TTATCTTTATT CATTGG-3', NÚM. ID. SEC.:5) y SuperScriptTM II, un derivado de la ribonucleasa H⁻ de la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV RT). Después de la síntesis del cDNA, se purificó la solución de dNTP's y GSP1. no incorporados Se utilizó la transferasa terminal de desoxinucleotidil (TdT) para añadir colas homopoliméricas a los extremos 3' del cDNA. El cDNA con cola entonces se amplificó mediante PCR utilizando un cebador específico de gen, anidado, GSP2 (5' TGCGGGACTCGTCGTAAGTATGC-3', NÚM. ID. SEC.:6), que se hibrida por 3' a GSP1, y el cebador de amplificación universal acortado que contiene desoxinosina, AUAP (5' GGC CACGCGTCGACTAGTAC-3', NÚM. ID. SEC.:7). Después de algunas reacciones con parámetros variados también se pudo detectar el cDNA más largo (correspondiente al transcrito de 2,6 kb), además del más corto, que aparece en toda reacción. Los cDNA's enriquecidos y purificados, se clonaron y se secuenciaron.

Ejemplo 7

Matriz de expresión de tejidos múltiples humanos (Multiple Tissue Expression, MTETM)

55 Esta matriz (Clontech, Palo Alto, CA) contiene cargas normalizadas de poli A⁺-RNA de 76 tejidos humanos distintos, así como RNA's y DNA's control como se muestra en la Figura 5. La transferencia se hibridó con el cDNA del gen PKW marcada con α -[³²P]dATP según las instrucciones del fabricante, y se expuso a una película de rayos X a -70°C.

Ejemplo 8

Aislamiento del RNA de tejidos tumorales de mama

65 Se aisló el RNA total a partir de muestras de tumor congeladas. Los tejidos congelados se cubrieron con la cantidad aconsejada de tampón de lisis e inmediatamente se disgregaron y homogenizaron inmediatamente mediante un homogenizador durante 45-60 segundos u 20000 U/min. El lisado homogenizado se trató a continuación como se describe en el protocolo del fabricante.

Ejemplo 9

Reacción en Cadena de la Polimerasa-Retrotranscriptasa (RT-PCR)

5 Con tal de eliminar la contaminación de DNA genómico, las muestras de RNA total se trataron con desoxiribonucleasa I libre de ribonucleasa a 37°C durante 30 minutos. La síntesis de la primera cadena se llevó a cabo siguiendo el protocolo del equipo de síntesis de la primera cadena de cDNA para la RT-PCR Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, DE) utilizando el cebador indirecto RTR-5 (5'CCATTCATTCATTTTCAAG3', NÚM. ID. SEC.:8). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 25°C durante 25 minutos y luego a 55°C durante 60 minutos. Después de la incubación, la Retrotranscriptasa AMV se desnaturizó a 99°C durante 5 minutos. Para cada muestra se realizó una reacción de control negativo sin la Retrotranscriptasa AMV.

15 El cDNA de cadena simple resultante se amplificó mediante PCR (High Fidelity PCR Master, Roche Diagnostics GmbH, DE) utilizando un segundo cebador directo RTF-6 (5'AAAACGCATGGCTTGTC3', NÚM. ID. SEC.:9). La amplificación se realizó con un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, 10 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 57°C y 1 minuto de elongación a 72°C, seguido por ciclos bajo las mismas condiciones. Se calculó una misma carga e integridad del mRNA mediante un control RT-PCR con cebadores de β -actina (cebador indirecto 5'AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC3' NÚM. ID. SEC.: 10 cebador directo 5'CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC3' NUM. ID. SEC.:11).

Lista de referencias

- Ausubel I., Frederick M.,** *Current Protocols in Mol. Biol.* (1992), John Wiley y Sons, New York
- 25 **Brünner, N., et al.,** *Cancer Res.* 53 (1993) 283-290
- Brünner, N., et al.,** *Cancer Res.* 53 (1993) 3229-3232
- 30 **Büttner et al.,** *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 3573-3583
- Cailleau, R., et al.,** *In Vitro* 14 (1978) 911-915
- Cailleau, R., et al.,** *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974) 661-674
- 35 **Coleman, R.E., y Rubens, R.D.,** *Br. J. Cancer* 55 (1987) 61-66
- Engel, L.W., et al.,** *Cancer Res.* 38 (1978) 3352-3364
- 40 EP-A 0 063 879
- EP-A 0 128 018
- EP-A 0 173 251
- 45 EP-A 0 200 362
- Freake, H.C., et al.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 (1981) 1131-1138
- 50 **Hackett, A.J.,** *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (1977) 1795-1806
- Hames, B.D., Higgins, S.G.,** *Nucleic Acid Hybridisation - A Practical Approach* (1985) IRL Press, Oxford, England
- 55 **Lee, J.H., et al.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238 (1997) 462-467
- Liang, P., y Pardee, A.B.,** *Science* 257 (1992) 967-971
- Liang, P., et al.,** *Cancer Res.* 52 (1992) 6966-6968
- 60 **Liang, P., et al.,** *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3269-3275
- Moustafa, A.S., y Nicolson, G.L.,** *Oncol. Res.* 9 (1997) 505-525
- 65 **Nicolson, G.L.,** *Biochem. Soc. Symp.* 63 (1998) 231-242
- Sager, R.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 952-955

ES 2 295 084 T3

Sager, R., *Science* 246 (1989) 1406-1412

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

5

Schiemann, S., et al., *Anticancer Res.* 17 (1997) 13-20

Schiemann, S., et al., *Clin. Exp. Metastasis* 16 (1998) 129-139

10

Schwirzke, M., et al., *Anticancer Res.* 18 (1998) 1409-1421

Schwirzke, M., et al., *Anticancer Res.* 19 (1999) 1801-1814

15

Shaper, N.L., et al., *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3 (1998) 315-324

Patente estadounidense núm. 2,915,082

20

Wahl, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3683-3687

WO 89/06698

Wu, Y.Y., et al., *Acta Derm. Venerol.* 80 (2000) 2-3

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico regulado positivamente en células de cáncer de mama, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) NÚM. ID. SEC.: 1;

(b) una secuencia de ácidos nucleicos libre de las secuencias que flanquean naturalmente los extremos 5' y 3' de la secuencia de ácidos nucleicos de (a) que hibrida bajo condiciones restrictivas con una sonda de ácido nucleico de la secuencia complementaria de (a);

(c) una secuencia de ácidos nucleicos que, debido a la degeneración del código genético, no es una secuencia de (a) o (b), pero que codifica un polipéptido que tiene exactamente la misma secuencia aminoacídica que un polipéptido codificado por una secuencia de (a) o (b); y

(d) una secuencia de ácidos nucleicos que es un fragmento de al menos 138 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de (a), (b) o (c) y codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos de NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4,

con la condición de que dicha secuencia de ácidos nucleicos no es idéntica a la secuencia complementaria de NÚM. ID. SEC.:12.

2. Un ácido nucleico según la reivindicación 1, con una secuencia que codifica un polipéptido de los aminoácidos de SEQ ID NO:2 o NÚM. ID. SEC.:4.

3. El ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico tiene una secuencia de los nucleótidos 459 a 848 de NÚM. ID. SEC.:1 o de los nucleótidos 1 a 285 de NÚM. ID. SEC.:3.

4. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Una célula huésped transformada por un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 3.

6. Un polipéptido que induce a la progresión tumoral, en el que dicho polipéptido está codificado por un ácido nucleico seleccionado del grupo consistente en:

(a) NÚM. ID. SEC.: 1;

(b) una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones restrictivas con una sonda de ácido nucleico de la secuencia complementaria de (a); y

(c) un ácido nucleico que es un fragmento de cualquiera de los al menos 138 nucleótidos de las secuencias de (a) o (b) y codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos de NÚM. ID. SEC.:2 o NÚM. ID. SEC.:4.

7. El polipéptido según la reivindicación 6, en el que la secuencia de ácidos nucleicos de (b) hibrida en SSC 6,0X a 45°C hasta 55°C, seguido por un lavado con de aproximadamente SSC 2, 0X hasta aproximadamente SSC 0,2X a una temperatura de aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 65°C.

8. Un proceso para detectar la presencia o ausencia de al menos un ácido nucleico específico o una mezcla de ácidos nucleicos, o diferenciar entre dos ácidos nucleicos distintos en una muestra, en la que se sospecha que contiene dicho ácido nucleico o ácidos, proceso que comprende los siguientes pasos en orden:

(a) incubar dicha muestra bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda de ácido nucleico que se selecciona del grupo consistente en:

(i) un ácido nucleico con una secuencia escogida del grupo que consiste en NÚM. ID. SEC.: 1 o un fragmento del mismo;

(ii) un ácido nucleico con una secuencia complementaria a cualquier ácido nucleico de (i);

(iii) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (i); y

(iv) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (ii); y

ES 2 295 084 T3

(b) determinar si dicha hibridación tiene lugar, o no.

5 9. Un proceso para determinar si una muestra analítica originada de o que contiene células humanas tiene un potencial de progresión tumoral, en el que también se utiliza una segunda muestra originada a partir de células no cancerosas del mismo individuo o de un individuo de la misma especie, proceso que comprende los siguientes pasos:

(a) incubar dichas muestras bajo condiciones de hibridación restrictivas con una sonda de ácido nucleico sonda que se selecciona del grupo consistente en:

- 10 (i) un ácido nucleico con una secuencia de NÚM. ID. SEC.:1 o un fragmento de esta;
- (ii) un ácido nucleico con una secuencia complementaria a cualquier ácido nucleico de (i);
- 15 (iii) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (i); y
- (iv) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (ii); y

20 (b) determinar la cantidad aproximada de hibridación de cada muestra respectiva con dicha sonda y

(c) comparar la cantidad aproximada de hibridación de la muestra analítica a una cantidad aproximada de hibridación de dicha segunda muestra para identificar si la muestra analítica contiene una cantidad inferior del ácido nucleico respecto la segunda muestra.

25 10. Un proceso para determinar si una muestra analítica originada de o que contiene células humanas tiene un potencial de progresión tumoral o no, proceso que comprende los siguientes pasos:

30 (a) incubar una primera porción de dicha muestra bajo condiciones restrictivas de hibridación con una primera sonda de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) un ácido nucleico con una secuencia de NÚM. ID. SEC.:1 o un fragmento del mismo;
- 35 (ii) un ácido nucleico con una secuencia complementaria a cualquier ácido nucleico de (i);
- (iii) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (i); y
- 40 (iv) un ácido nucleico con una secuencia que hibrida bajo condiciones restrictivas con el ácido nucleico de (ii); y

(b) incubar una segunda porción de dicha muestra bajo condiciones restrictivas de hibridación con una segunda sonda de ácido nucleico que es un gen de mantenimiento o un fragmento de este;

45 (c) determinar la cantidad aproximada de hibridación de dicha muestra con dichas primera y segunda sondas;

(d) identificar si la muestra analítica contiene una cantidad al menos 3 veces superior de ácidos nucleicos hibridados con la primera sonda, en comparación con la cantidad de ácidos nucleicos hibridados de la segunda sonda.

50

55

60

65

Fig.1

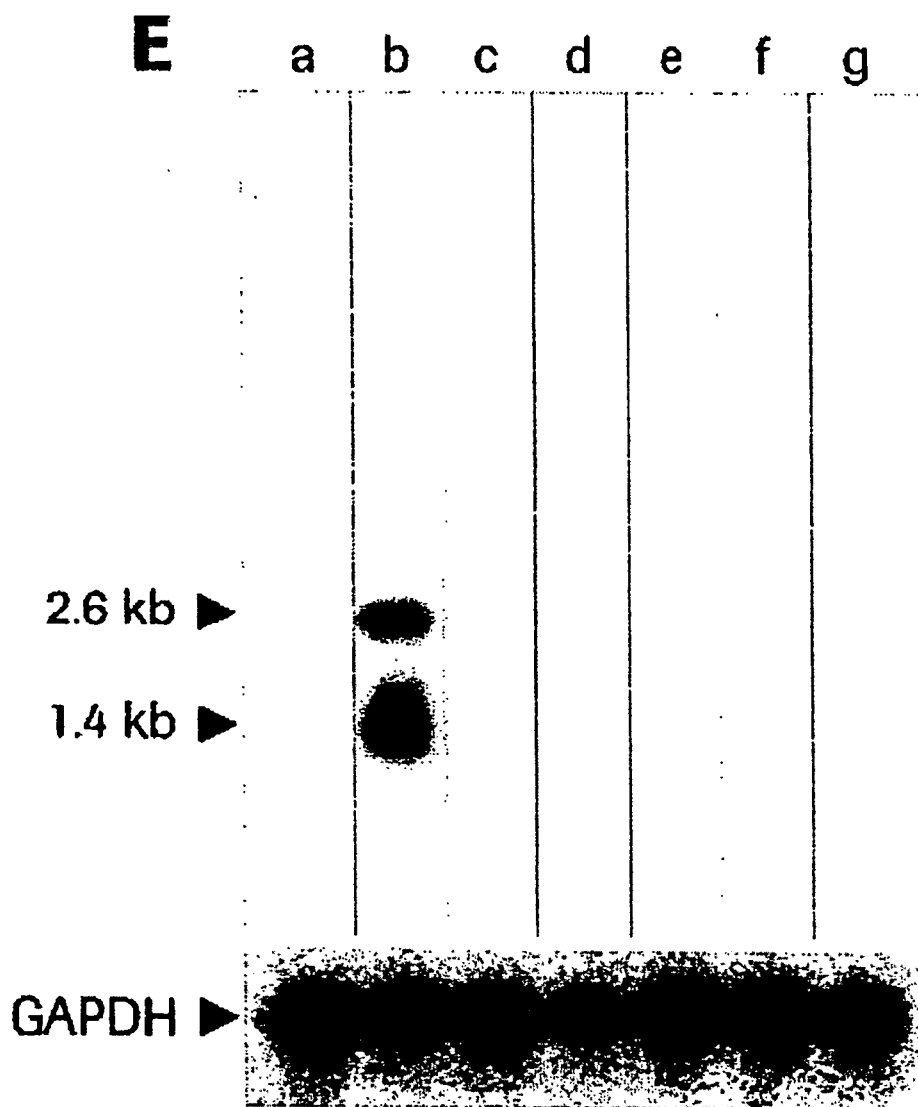


Fig.2

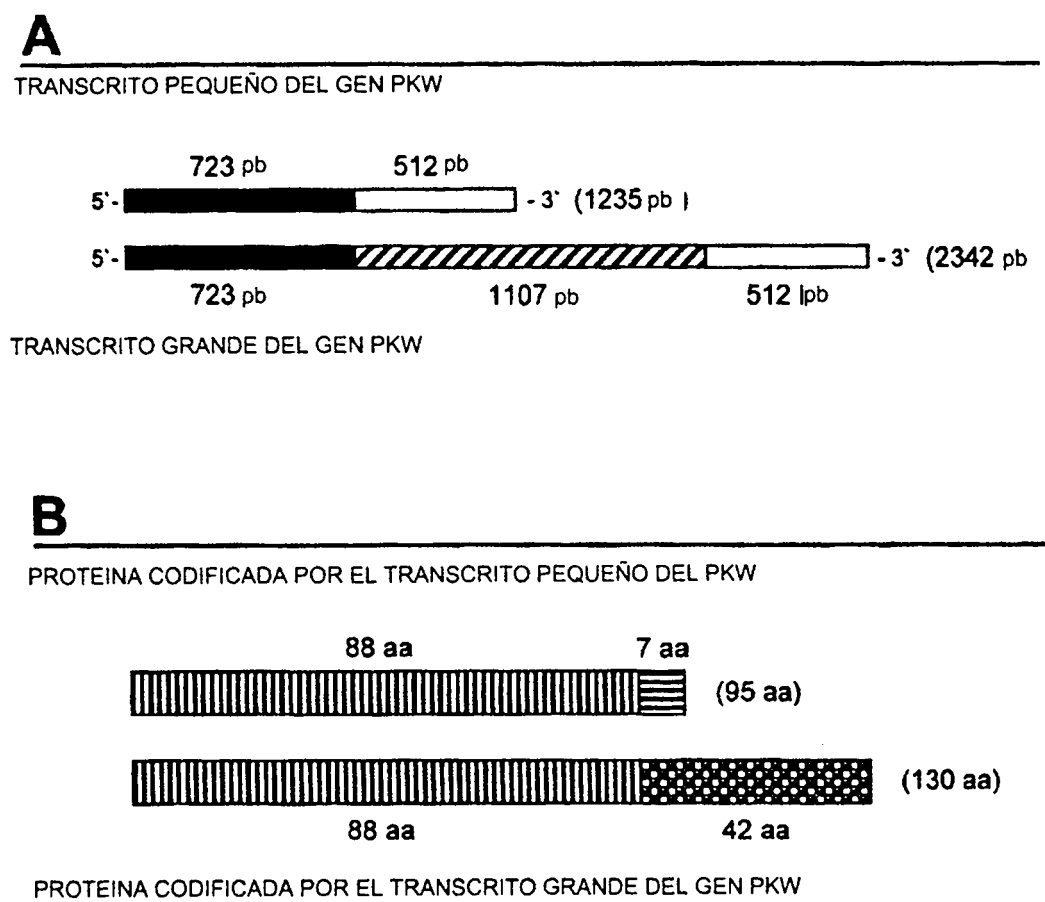
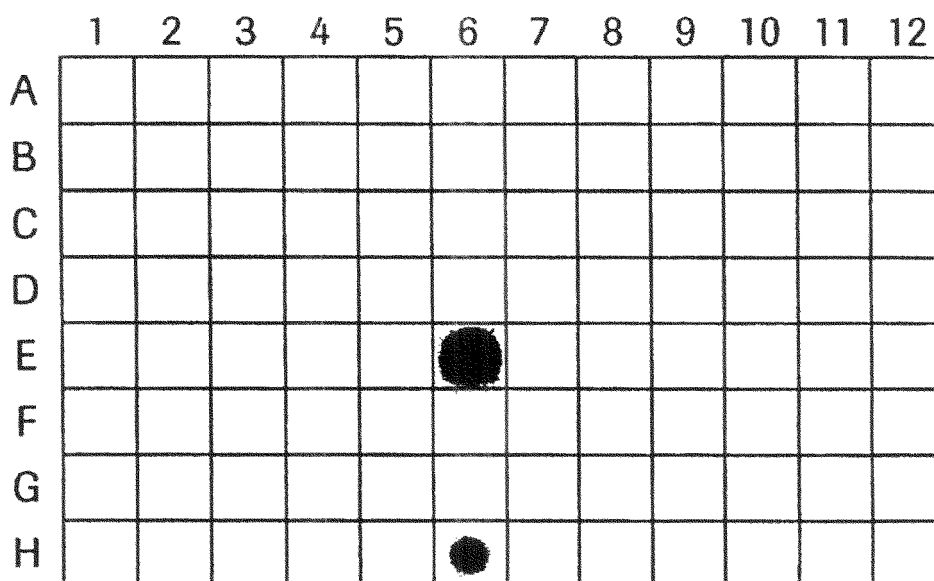


Fig.3



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transversa	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	accumbens nucleus	aorta	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	Hela S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	E. coli rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	E. coli DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	Poly r(A)
F	temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human Cyt-1 DNA
G	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adenocarcinoma SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

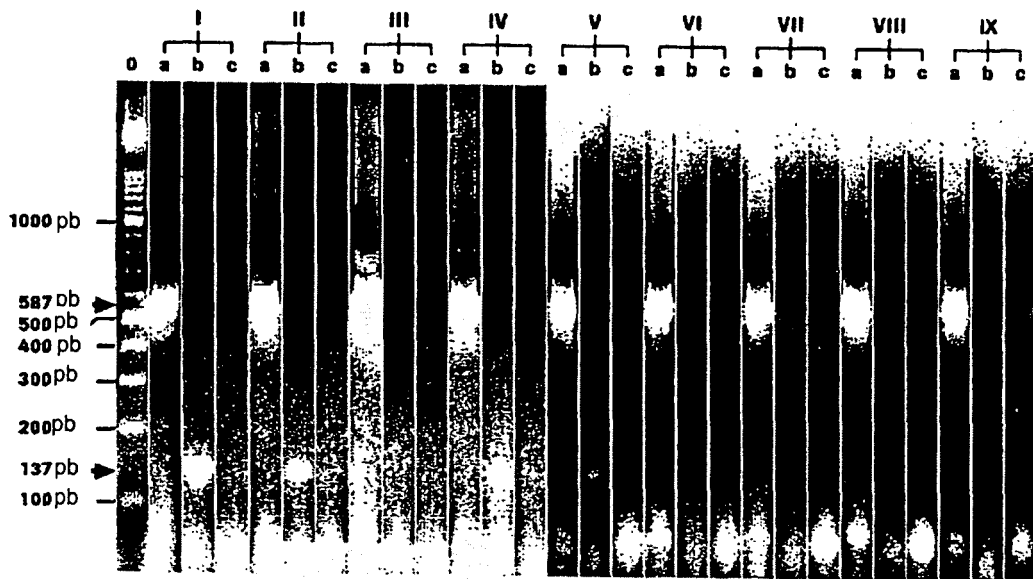
* paracentral gyrus

FIGURA / 3 (traducción cuadro)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	cerebro entero	cerebelo, izquierdo	Sustancia negra	corazón	esófago	colon, transverso	riñón	pulmón	hígado	leucemia, HL-60	cerebro fetal	RNA total de levadura
B	corteza cerebral	cerebelo, derecho	núcleo accumbens	aorta	estómago	colon, descendiente	musculatura esquelética	placenta	páncreas	HeLa S3	corazón fetal	tRNA de levadura
C	lóbulo frontal	cuero caloso	tálamo	aurícula, izquierda	duodeno	recto	bazo	vejiga urinaria	glándula adrenal	leucemia, K.562	riñón fetal	rRNA de E. coli
D	lóbulo parietal	amígdala	glándula pituitaria	aurícula, derecha	yeyuno		timo	útero	glándula tiroidea	leucemia, MOLT-4	hígado fetal	DNA de E. coli
E	lóbulo occipital	núcleo caudado	medula espinal	ventrículo, izquierdo	íleon		leucocitos sangreférrica	próstata	glándula salival	linfoma de Burkitt, Raji	bazo fetal	Poly r(A)
F	lóbulo temporal	hipocampo		ventrículo, derecho	íleoceiego		nódulos linfáticos	testículo	glándula mamaria	linfoma de Burkitt, Daudi	timo fetal	DNA C ₀ 1-1 humano
G	l. p.* de la corteza cerebral	bulbo raquídeo		tabique interventricular	apéndice		médula ósea	ovario		adenocarcinoma colorrectal SW 480	pulmón fetal	DNA humano 100 ng
H	protuberancia	putamen		punta del corazón	colon, ascendiente		tráquea			carcinoma de pulmón, A548		DNA humano 500 ng

* lobulillo paracentral

Fig.4



ES 2 295 084 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
5 <120> Un ácido nucleico con regulado positivamente en las células tumorales humanas, una proteína codificada por este y un proceso para el diagnóstico del tumor.
<130> Caso 20678
<140>
10 <141>
<150> EP00110953.7
<151> 2000-05-26
<150> EP00115369.1
15 <151> 2000-07-15
<160> 12
<170> Patente en versión. 2.1
20 <210> 1
<211> 2342
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
25 <220>
<221> CDS
<222> (459) .. (848)
30 <400> 1

aacctccacc acaacgctca cccttacaga cacactattg caggtctccg agggcctttg 60
35 ggaggccctg ctctctgcga gctgtcccgg caggacagag actcttcccg ccgcggccct 120
gccattccag gctgaggctg tgagcagcac catgacaagc tccggccgca gtggctctca 180
40 acagtgtggg tctctgacca cccgacgagc tggaagtgca gaccgctgac ctcccttgag 240
aacctactgg gttcttgcag taggctcctc agcgggtgtct aaacacgcc a ctcaggtgat 300
45 tctatgcacc atcacattgg aaactttttt cattgactgt tacttaatga gaagacttcc 360

50

55

60

65

ES 2 295 084 T3

acagggtttt ggggaaggtt ggggcagggc aaggaggaaa agccacattt acagcaattt 918
 ctgaagtctt ttcatttttt cccctgaat cacgtccata ataggatttg aatttaataa 978
 5 actgctgaag gttcctggcc ctgagtccca gtgtcctccc agccccgcc cagctgtggg 1038
 tgtgcatggg gagcggtagc agggagggtt aatgggccc ctgggacgcc gcgtgcagag 1098
 10 cagagatgaa tggcccgaaa ccctcgcgct gctctgcgcc cttcgtcatc cagtcggggg 1158
 ggtagggac tgtcagagaa aaataattta gcggccatgg ctctaactga tgtgctgcat 1218
 15 tctgggggtca aatgactttt acaaagtagt agtgctgcct ggtttctcta tcgtgagagc 1278
 tcagggctga taacatgaaa gaaaaaggca ctgcagccag aattcactga cattcttcac 1338
 20 atttcacatg agtgggacgc aggagggggg ctggggaggg tggagggatc tttcctgctt 1398
 aacagattca acagaagagt ggcaggetca gctgggtgag caaggtatcc cagcgacggg 1458
 25 ggacacgccc cagaccatgg gtgggtggggc ttctcagagg aggtggcagg agaccgagc 1518
 ctgccaaagt tgcacctaa gtcacgggca gcattaggag ggctctctcc cagtctcccc 1578
 30 accccccgt cccccctccc ccaggetgca ggggtgaagt ggcttcagg acggtcactg 1638
 gcaagtttaa gctacagaga gtgtagaaac agggtgaaaa aggaagagag aggggagtaa 1698
 35 ataagaagga ggtgtaagaa aagaccaagc caggccccag cgcccttggt aggaagtgcc 1758
 cagggactta tgtggaagcc gtccttgctg tctgccacct tgtttttact tacattgtgt 1818
 40 ttttatttga gggcgagttt ggacggcaag actgatggag attgtgggtct aatgcctct 1878
 aaccactcc ttaaaatgac caccggatgt tccacaagta cttgaaaatg aatgaatggc 1938
 45 ttcccagagag gcagaaggca ggggtgtgcc ctaccccacg ccggccaaga gttcaacaag 1998
 cattggttga caagtgaata gtgagcactt gaaccagtc acaattcaag atgagggtc 2058
 50 tgccatgacg catgtgggtc gtgtcaccct gcagtctccc tgagcagtgt ctgaggttcg 2118
 agtgggaccc tacattcgtg aagagattta tcatctcccc aggaaaaata acagattctg 2178
 55 tcttaggtgt tgtgatgtaa caatggtagc gatcacagcc ataacttaca attattgcat 2238
 acttacgacg agtcccgcac tgggctaagt gctttttaac tatgtgaaat gtttctttcc 2298
 60 ttgattgatg ccaaaatgaa taaagataat tttctgtatc tgct 2342

<210> 2

<211> 130

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 295 084 T3

<400> 2

```

5      Met Asp Pro Asp Val Val Leu Trp Ser Cys Thr Trp Lys Pro Ala Leu
      1              5              10              15
10     Arg Gly Val Ser Leu Gly Leu Trp Ala Glu Asn Leu Lys His Arg Ala
      20              25              30
15     Gly Thr Gln Val Gln Arg Leu His Arg Pro Ser Arg Arg Arg Cys Phe
      35              40              45
20     Gln Ala Pro Trp Thr Asp Ser Gly Arg Ala Ala Phe Pro Pro Ser Pro
      50              55              60
25     Arg Gly Gly Pro Ala Leu Phe Arg Ala Trp Asp Thr Ala Gln Glu Asn
      65              70              75              80
30     Ala Trp Leu Val Leu Gln Thr Gln Val Leu Thr Gly Pro Ser Asp Lys
      85              90              95
35     Gly Gln Gly Leu Arg Leu Leu Gly Ile Ser Ala Pro Glu Pro Pro Cys
      100             105             110
40     Ser Gly Thr Arg Gly Leu Arg Gly Gln Glu Ala Ser Cys Val Asp Gly
      115             120             125
      Gly Pro
      130

```

<210> 3

<211> 285

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (285)

55

60

65

ES 2 295 084 T3

<400> 3

```

    atg gat cca gac gtg gtt ttg tgg tcc tgc acg tgg aag cca gcc ctg      48
5   Met Asp Pro Asp Val Val Leu Trp Ser Cys Thr Trp Lys Pro Ala Leu
    1             5             10             15
10  cgt ggg gtg agc ctg gga ctg tgg gca gag aac ctc aag cac cgg gcc      96
    Arg Gly Val Ser Leu Gly Leu Trp Ala Glu Asn Leu Lys His Arg Ala
15             20             25             30
    ggc acc caa gtg cag aga ctg cat cgt ccc aac agg agg cgc tgc ttc 144
20  Gly Thr Gln Val Gln Arg Leu His Arg Pro Asn Arg Arg Arg Cys Phe
    35             40             45
25  cag gct ccc tgg acg gac tcc ggg agg gcg gcc ttt ccc ccc agc ccc 192
    Gln Ala Pro Trp Thr Asp Ser Gly Arg Ala Ala Phe Pro Pro Ser Pro
30             50             55             60
    aga ggt ggg cct gcc ctt ttc cga gcg tgg gac aca gcc caq gaa aac 240
35  Arg Gly Gly Pro Ala Leu Phe Arg Ala Trp Asp Thr Ala Gln Glu Asn
    65             70             75             80
40  gca tgg ctt gtc ctc cag aca cag ggc gag ttt gga cgg caa gac      285
    Ala Trp Leu Val Leu Gln Thr Gln Gly Glu Phe Gly Arg Gln Asp
45             85             90             95

```

<210> 4

<211> 95

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

55   Met Asp Pro Asp Val Val Leu Trp Ser Cys Thr Trp Lys Pro Ala Leu
    1             5             10             15
60  Arg Gly Val Ser Leu Gly Leu Trp Ala Glu Asn Leu Lys His Arg Ala
    20             25             30
65  Gly Thr Gln Val Gln Arg Leu His Arg Pro Asn Arg Arg Arg Cys Phe

```

ES 2 295 084 T3

	35	40	45
5	Gln Ala Pro Trp Thr Asp Ser Gly Arg Ala Ala Phe Pro Pro Ser Pro		
	50	55	60
10	Arg Gly Gly Pro Ala Leu Phe Arg Ala Trp Asp Thr Ala Gln Glu Asn		
	65	70	75
15	Ala Trp Leu Val Leu Gln Thr Gln Gly Glu Phe Gly Arg Gln Asp		
	85	90	95

<210> 5

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador GSP1

<400> 5

30 ttatctttat tcattttgg

19

<210> 6

<211> 23

35 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador GSP2

<400> 6

45 tgccgggactc gtcgtaagta tgc

23

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador AUAP

55 <400> 7

60 ggccacgcgt cgactagtagc

20

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

65 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador RTR-5

ES 2 295 084 T3

<400> 8
ccattcattc attttcaag 19

5 <210> 9
<211> 17
<212> DNA
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador RTF-6

15 <400> 9
aaaacgcatg gcttgtc 17

20 <210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador indirecto de la β -actina

<400> 10
30 aggttacatg gtggtgccgc cagac 25

<210> 11
35 <211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador directo de la β -actina

<400> 11
45 ccaaggccaa ccgcgagaag atgac 25

<210> 12
50 <211> 127
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<220>
55 <223> fragmento de la secuencia AQ548392, el nucleótido 1 corresponde al nucleótido 304 y el nucleótido 127
corresponde al nucleótido 430 de la secuencia completa
<300>
<308> AQ548392

60 <400> 12
tggacccccg tctacacagc ttgcttctg tccaactcaga cccctggtcc cactgcatgg 60
65 tggctctgga gctgaaattc ctaaaagcct gagtcctctg cccttgctctg acggccctgt 120
tagcacc 127