

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 925**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06817642 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **02.07.2008 EP 1937831**

54 Título: **Uso de N-miristoiltransferasa en tejido no tumoral para el diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

27.09.2005 US 720474 P

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

06.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SASKATCHEWAN (100.0%)
BOX 5000 RPO UNIVERSITY 110 GYMNASIUM
PLACE
SASKATOON, SK S7N 4J8, CA**

72 Inventor/es:

**SHARMA, RAJENDRA, KUMAR y
SHRIVASTAV, ANURAAG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 925 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

Uso de N-miristoiltransferasa en tejido no tumoral para el diagnóstico de cáncer

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos de diagnóstico para la detección del cáncer.

5 Antecedentes de la invención

10 El cáncer es una de las causas principales de muerte prematura a nivel mundial. Además, el cáncer colorrectal es la segunda causa principal de muerte por cáncer en el mundo occidental. El cáncer colorrectal puede curarse si se diagnostica a tiempo. Uno de los protocolos de tratamiento principales para cáncer colorrectal es la cirugía. Sin terapia adicional, la cirugía cura normalmente el cáncer de colon de Duke A que invade la submucosa y la enfermedad de Duke B1 que invade la capa muscular (Cohen *et al.*, En: DeVita *et al.* (eds.), Cancer Principles and Practice of Oncology, 5ª ed., págs. 1144-1197. Nueva York: Lippincott-Raven.).

15 El enfoque de pronóstico primario para identificar diferencias entre pacientes en estadios tempranos de la enfermedad es el sistema tumor-nodo-metástasis (TNM) (Graziano *et al.* (2003) Ann Oncol. 14, 1026-1038). Sin embargo, el desenlace de supervivencia varía entre pacientes con estadios de enfermedad patológicos similares. Ha habido demandas crecientes para especificar los marcadores moleculares de cáncer colorrectal más agresivo con el fin de identificar la enfermedad con mucha anticipación y prescribir una terapia apropiada para los pacientes. En respuesta, son necesarias nuevas estrategias terapéuticas para combatir el cáncer colorrectal.

20 Se conoce que la actividad N-miristoiltransferasa (NMT) es altamente elevada en el cáncer colorrectal (Magnuson *et al.* 1995, J. Natl. Cancer Inst. 87, 1630-1635). La NMT es una enzima que cataliza la miristoilación de proteínas implicadas en diversas funciones biológicas incluyendo oncogénesis (Rajala *et al.* (2000) Mol. Cell. Biochem. 204, 135-155; Selvakumar *et al.*, (2002) Int. J. Mol. Med. 10, 493-500).

25 La actividad N-miristoiltransferasa está aumentada en tumores colónicos de ratas en comparación con los de mucosa colónica que parece normal (Magnuson *et al.* (1985) J. Natl. Cancer Inst. 87, 1630-1635.). De manera interesante, la actividad NMT en la mucosa que parece normal de ratas que portan cáncer de colon era similar a la actividad encontrada en la mucosa colónica de ratas control, sugiriendo que la actividad NMT elevada está restringida al sitio tumoral. Se observa actividad NMT superior en tumores colónicos de ratas en comparación con la mucosa normal o que parece normal correspondiente. Además, se observó un aumento de varias veces en la actividad NMT en comparación con la mucosa que parece normal adyacente, en pólipos y tumores en estadio B1 ubicados en el colon descendente cerca del recto.

30 Además del modelo de rata, también se observó actividad y expresión de NMT elevadas en adenocarcinoma humano en comparación con las de mucosa que parece normal (Magnuson *et al.*, (1995) J. Natl. Cancer Inst. 87, 1630-1635; Raju *et al.*, (1997) Exp. Cell Res. 235, 145-154.). La actividad NMT en mucosa que parece normal es similar a la de la enfermedad de Crohn y el vólvulo, indicando que la actividad NMT elevada es específica del cáncer y no es una respuesta no específica a condiciones inflamatorias o lesiones no cancerosas. Rajala *et al.* (Cancer 2000; 88 (9):1992-1999) mostraron una expresión aumentada en NMT en tejido de vesícula de pacientes con cáncer de vesícula.

35 Sin embargo, el trabajo previo no ha establecido NMT como marcador para el cáncer, dada la limitación de que la expresión y actividad elevadas de NMT en la región tumoral no es accesible para fines de pronóstico/diagnóstico hasta que se realiza una colonoscopia y está disponible una muestra de tejido para el análisis de proteína.

40 El documento WO 2004/016758 concedido a Madden (Genzyme) da a conocer un método para el diagnóstico de glioma. El método comprende detectar la expresión de un producto, tal como N-miristoiltransferasa 1 (NMT1), en una muestra de tejido cerebral de la que se sospecha que es neoplásica y comparar la expresión de ese producto con la expresión de dicho producto en tejido cerebral normal (control), en el que la sobreexpresión de dicho producto en la primera muestra de tejido en comparación con el control es indicativa de que el primer tejido es neoplásico.

45 Existe la necesidad de tecnologías no invasivas o mínimamente invasivas que puedan usarse para detectar cáncer.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para la detección del cáncer.

50 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la detección de cáncer que comprende las etapas de obtener una muestra de tejido no tumoral de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer; y detectar un aumento del nivel de N-miristoiltransferasa (NMT) o actividad N-miristoiltransferasa (NMT) en relación con un valor control.

En una realización adicional, se proporciona un método para la detección de cáncer colorrectal que comprende las etapas de obtener una muestra de sangre de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer; separar las células

mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre y detectar N-miristoiltransferasa o actividad N-miristoiltransferasa en dichas células mononucleares de sangre periférica.

- 5 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit para la detección de cáncer, que emplea el método inventivo. El kit comprende un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa e instrucciones para su uso. Adicionalmente, se da a conocer un uso de un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa (NMT), para la detección de NMT elevada en una muestra de tejido no tumoral para el diagnóstico de cáncer.

- 10 Adicionalmente, una realización de la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa (NMT) para la detección de NMT elevada en una muestra de tejido no tumoral para el diagnóstico de cáncer. El kit puede usarse en la detección de cánceres epiteliales, por ejemplo, cáncer colorrectal. La muestra de tejido no tumoral puede ser, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica.

Además, se proporciona un método para la detección de cáncer colorrectal que comprende las etapas de obtener una muestra de médula ósea de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer; separar las células de médula ósea de la muestra y detectar un aumento de N-miristoiltransferasa o actividad N-miristoiltransferasa en las células de médula ósea.

- 15 Otros aspectos y características de la presente invención resultarán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras la revisión de la siguiente descripción de realizaciones específicas de la invención junto con las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 20 Ahora se describirán realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas.

La figura 1 ilustra la actividad NMT en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células de médula ósea (CMO) de ratas normales y que portan tumor de colon.

La figura 2 muestra los resultados de análisis de inmunotransferencia de tipo Western de células mononucleares de sangre periférica y células de médula ósea.

- 25 La figura 3 ilustra el análisis inmunohistoquímico de células de sangre periférica de ratas control, que carecen de tinción de NMT.

La figura 4 ilustra el análisis inmunohistoquímico de células mononucleares de sangre periférica de ratas que portan tumor, mostrando tinción fuerte como evidencia de expresión de NMT intensa.

La figura 5 muestra el análisis inmunohistoquímico de tinción de NMT en médula ósea de rata normal.

- 30 La figura 6 muestra el análisis inmunohistoquímico de tinción de NMT en médula ósea de rata con tumor colónico.

La figura 7 muestra la tinción de NMT negativa de linfocitos.

La figura 8 muestra la tinción de NMT negativa en monocitos de frotis de sangre periférica en sujetos control.

La figura 9 muestra un frotis de sangre periférica de un paciente con cáncer de colon, que ilustra la tinción positiva de macrófagos.

- 35 La figura 10 es un frotis de sangre periférica de un paciente con cáncer de colon, que ilustra la tinción positiva de neutrófilos, linfocitos y macrófagos.

La figura 11 muestra la tinción de NMT en médula ósea de sujetos control.

La figura 12 muestra tinción nuclear intensa y algo de tinción citoplásmica para NMT en médula ósea de un paciente con cáncer de colon.

- 40 **Descripción detallada**

En general, la presente invención proporciona un método para la detección de cáncer que comprende las etapas de obtener una muestra de tejido no tumoral de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer; y detectar un aumento del nivel de N-miristoiltransferasa (NMT) o actividad N-miristoiltransferasa (NMT) en relación con un valor control.

- 45 Previamente, se creía que sólo el tejido tumoral contenía niveles o actividad elevados de NMT. Sin embargo, según la invención, pueden obtenerse tejidos no tumorales y un aumento de NMT o actividad NMT también es indicativo de cáncer. Los tejidos no tumorales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a sangre o médula ósea. El uso de muestras de sangre para la detección de NMT o actividad NMT proporciona la ventaja adicional de que extraer una muestra de sangre de un paciente es mínimamente invasivo. Por tanto, no se requiere un procedimiento quirúrgico ni invasivo para extraer el tejido tumoral. Puede extraerse la muestra de sangre, por ejemplo, en la consulta de un

médico durante una revisión física anual, lo que permitiría que el método se realice de manera rutinaria en un gran número de sujetos. La exploración y detección tempranas aumentarán enormemente la probabilidad de un desenlace positivo en los casos en los que se detecta cáncer.

5 Cuando la muestra de tejido no tumoral es sangre, es especialmente ventajoso aislar o separar las células mononucleares de sangre periférica y evaluar la NMT o actividad NMT en estos tipos de células.

10 Pueden realizarse una variedad de metodologías o ensayos de laboratorio para detectar NMT o actividad NMT. Por ejemplo, puede usarse análisis inmunohistoquímico, en el que se detecta el nivel de NMT cuantificando la unión entre NMT y un anticuerpo anti-NMT. Puede usarse un anticuerpo policlonal o monoclonal, por ejemplo, el anticuerpo policlonal anti-NMT tal como se describió por Raju *et al.* (1996) *Protein Expr. Purif.* 7:431-437. Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, puede clonarse un epítipo o parte de un anticuerpo policlonal que puede unirse a NMT en un anticuerpo monoclonal para su uso con la invención, usando técnicas de laboratorio convencionales.

15 Puede detectarse cualquier cáncer que conduzca a un aumento en el nivel de o la actividad NMT en tejido no tumoral usando el método de la invención. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen adenocarcinomas y cánceres epiteliales. Entre estos cánceres a modo de ejemplo, el método se usa ventajosamente para detectar cánceres colorrectales. Tal como se hizo referencia en el presente documento, el término "cáncer colorrectal" se usa para describir un cáncer del colon o recto, que puede ser o no un adenocarcinoma. Un ejemplo de un cáncer colorrectal es cáncer de colon.

20 En el caso en el que se detecta la actividad NMT y se evalúa en relación con un valor control, puede usarse una reacción de miristoilación de proteína con miristoil-CoA para detectar la actividad. Es ventajoso evaluar esta actividad en células mononucleares de sangre periférica aisladas de una muestra de sangre. Por tanto, según una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de cáncer de colon que comprende las etapas de obtener una muestra de sangre de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer; separar las células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre y detectar N-miristoiltransferasa o actividad N-miristoiltransferasa en las células mononucleares de sangre periférica.

25 Puede obtenerse un valor control con el fin de evaluar NMT o la actividad NMT frente a un intervalo de valores convencionales o "normales", de manera que puedan detectarse valores anómalos. Pueden usarse los propios valores previos de un sujeto como valor "control", para aquellos individuos que se están monitorizando para el desarrollo de cáncer de manera regular. Por ejemplo, aquellos individuos de los que se sospecha que tienen una susceptibilidad familiar al cáncer pueden examinarse inicialmente a través de una variedad de medios, incluyendo niveles de NMT y/o niveles de actividad NMT y si resultan pruebas negativas, pueden usarse los niveles de NMT y/o niveles de actividad NMT obtenidos como control para el individuo frente al cual evaluar mediciones futuras. De esta manera, el valor control puede personalizarse. Alternativamente, puede evaluarse el nivel de NMT o nivel de actividad NMT frente a una variedad de niveles encontrados en una población control no cancerosa. En este caso, puede usarse el intervalo de valores proporcionado para definir un intervalo de confianza seleccionado apropiadamente por el médico o evaluador clínico que evalúa la prueba. En el caso en el que se usen medios inmunohistoquímicos para evaluar una muestra frente a un control, puede seleccionarse el intervalo de confianza, por ejemplo a un valor de desde el 80% hasta el 95%, que puede depender de parámetros tales como el número de observaciones consideradas para llegar al valor control y la variabilidad dentro de y entre sujetos.

30 El método de la invención puede realizarse usando un kit que contiene reactivos seleccionados requeridos para realizar el método en un entorno de laboratorio clínico típico. Por ejemplo, el kit puede incluir un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa para la detección de NMT, junto con instrucciones para el uso del kit. De esta manera, la prueba puede realizarse en una muestra de sangre enviada a cualquier laboratorio clínico una vez que se obtiene el kit. El kit es particularmente ventajoso en la detección de cáncer de colon, usando células mononucleares de sangre periférica aisladas de una muestra de sangre de un sujeto. Este uso de un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa (NMT) para la detección de NMT elevada en una muestra de tejido no tumoral es ventajosamente un método conveniente y mínimamente invasivo para la detección y el diagnóstico de cáncer.

35 Previamente, no se consideraba la NMT para su uso en la detección de cáncer debido a la limitación de que la expresión y actividad elevadas de NMT en la región tumoral no es accesible para fines de pronóstico/diagnóstico hasta después que se realiza la colonoscopia y está disponible una muestra tisular para su análisis. Sin embargo, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que la detección de NMT en muestras de sangre derivadas de sujetos animales que portan tumor y pacientes con cáncer humanos es indicativa y predictiva de cáncer. Por tanto, puede usarse el kit *in vitro* según la invención para la detección de NMT como herramienta de diagnóstico para la detección del cáncer.

40 Pueden observarse las siguientes características en sujetos que portan tumor: la presencia de actividad NMT en la sangre; elevación de la actividad y expresión de NMT en células mononucleares de sangre periférica (CMSP); y elevación de la actividad y expresión de NMT en médula ósea (MO).

Los anticuerpos anti-NMT, tales como anticuerpos anti-NMT monoclonales o policlonales pueden usarse para

análisis inmunohistoquímico. La evidencia inmunohistoquímica para tinción positiva de NMT en la sangre y MO de huéspedes que portan tumor puede usarse para detectar la presencia de tumores.

Se proporciona una herramienta de pronóstico/diagnóstico simple para el cáncer, y en particular: cáncer colorrectal, que no requiere cirugía ni biopsia. Además, este marcador para cáncer colorrectal en sangre periférica no está asociado con una respuesta inflamatoria debido al crecimiento del tumor como es el caso de otros marcadores de cáncer colorrectal, por ejemplo, tal como se notificó por Erlinger *et al.* (2004) JAMA. 291, 585-590.

Ejemplo 1

DetECCIÓN DE NMT COMO MARCADOR DE CÁNCER COLORRECTAL

En este ejemplo, se detecta NMT en sangre periférica y médula ósea y se muestra que es un marcador predictivo de la presencia de tumores.

Material y métodos. Se adquirió ácido [9,10-³H]-mirístico (39,3 Ci/mMol) de Perkin Elmer (Boston, EE.UU.). La acil CoA sintetasa de *Pseudomonas*, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ditioneitol (DTT), inhibidor de tripsina de soja, pepsina y benzamidina eran de Sigma Chemical Co. (Toronto, Canadá). Se sintetizó el sustrato de péptido derivado de los extremos N-terminal de proteína cinasa A dependiente de AMPc (GNAAAANKRR) por el Alberta Peptide Institute, Canadá, y se publicó esta secuencia previamente por King y Sharma (Anal Biochem, 1991; 199:149-153). Se adquirió el anticuerpo anti-NMT monoclonal de BD Biosciences (Mississauga, Canadá). Se produjo anticuerpo anti-NMT policlonal en el laboratorio. Se purificó NMT recombinante tal como se describió por Raju *et al.* (1996) Protein Expr. Purif. 7, 431-437. Se obtuvo membrana de PVDF de BioRad Laboratories (Hercules, EE.UU.). Los agentes de quimioluminiscencia eran de Perkin Elmer Life Sciences. Se adquirieron anticuerpos secundarios conjugados con HRP y anti-von Willebrand para inmunohistoquímica de Dako Corporation (Carpenteria, EE.UU.). Se obtuvieron reactivos de laboratorio generales de Sigma Chemical Co. y eran de calidad analítica.

Tumores colónicos inducidos por azoximetano en ratas. Se obtuvieron veinte ratas Sprague-Dawley (peso, machos: 250,8 ± 15,5; hembras: 168,1 ± 9,02) de Charles River Canada (St. Constant, Canadá). Se aclimataron las ratas durante una semana y se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento o control. Se administraron a doce ratas (seis machos y seis hembras) ocho inyecciones subcutáneas semanales de azoximetano (10 mg/kg de peso corporal) en solución salina. Se administraron a ocho ratas control (cuatro machos y cuatro hembras) ocho inyecciones semanales sólo de solución salina. Se administraron a los animales alimento para ratas y agua a voluntad y se alojaron dos por jaula. Se controlaron la temperatura, humedad y luz a 22°C, el 50% y 12/12 horas (luz/oscuridad) respectivamente. Todos los animales se cuidaron según las directrices del Canadian Council of Animal Care Subcommittee of the National Research Council (Consejo canadiense del subcomité de cuidado de animales del Consejo de investigación nacional). Se sacrificaron los animales tras 30 semanas mediante asfixia con CO₂. Se extrajo sangre periférica de la cola y se prepararon frotis de sangre sobre una portaobjetos de vidrio para estudios inmunohistoquímicos. Se extrajo sangre de la arteria principal en un Vacutainers™ que contenía EDTA para la separación de células mononucleares. Se extrajeron los colonos seguido por aclarado de solución salina helada para eliminar el contenido. Además, se cortaron longitudinalmente los colonos y se abrieron en plano sobre una superficie helada para contar el tamaño y el número de tumores.

Separación de células mononucleares de sangre periférica. Se usaron inmediatamente muestras de sangre periférica para la separación de células mononucleares. Se diluyó un mililitro de sangre con un volumen igual de medio RPMI (sin suero). Se puso sangre periférica diluida sobre 8 ml de Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences, EE.UU.) en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó a 800 x g (Beckman, modelo TJ-6, EE.UU.). Entonces se extrajeron cuidadosamente células de la interfase plasma/ficoll sin alterar las capas. Se transfirieron las células a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron con un volumen igual de PBS. Entonces se resuspendieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas en medio RPMI y se determinaron los recuentos celulares y la viabilidad. Además, se lisaron CMSP en tampón RIPA que contenía PMSF 1 mM, DTT 10 mM y cóctel inhibidor de proteasa al 1% (Sigma, Canadá).

Aislamiento de médula ósea. Se obtuvo médula ósea (MO) aclarando PBS en los fémures de ratas mediante una aguja de calibre 22 y una jeringa. Se homogeneizó la médula ósea en tampón RIPA tal como se mencionó anteriormente. Para estudios inmunohistoquímicos, se fijó la MO en formaldehído y, tras deshidratación en concentraciones crecientes de etanol y xileno, se incrustó en parafina. También se obtuvieron células de médula ósea (CMO) de los fémures de ratas. Se agitaron las CMO cuidadosamente para preparar una suspensión celular única y se lavaron posteriormente tres veces en PBS. Se incubaron entonces las CMO durante 24 h en aire humidificado y CO₂ al 5% a 37°C. Tras el lavado, las células restantes adheridas a las placas de cultivo de plástico eran macrófagos de médula ósea. Se lisaron las células en tampón RIPA tal como se mencionó anteriormente y se sometieron a análisis de tipo Western y ensayo de NMT. Se prepararon suspensiones celulares únicas de CMO a partir de médula ósea y se cultivaron en medio RPMI durante 24 h y se lisaron en tampón RIPA para la actividad y expresión de NMT. Se incrustó la médula ósea total en parafina para el análisis inmunohistoquímico.

Ensayo de N-miristoiltransferasa. Se sometió a ensayo la actividad N-miristoiltransferasa tal como se describió por King y Sharma (1991) Anal Biochem. 199, 149-153. En resumen, se sintetizó [³H]miristoil-CoA tal como se describió

anteriormente (Raju *et al.*, (1999) *Methods Mol. Biol.* 116, 193-211). La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 40 mM, pH 7,4, EGTA 0,1 mM, MgCl₂ 10 mM, ATP 5 mM, LiCoA 1 mM, ácido [³H]mirístico 1 μM (7,5 μCi) y acil-CoA sintetasa de *Pseudomonas* 0,3 unidades/ml en un volumen total de 200 μl. Se llevó a cabo la reacción durante 30 min. a 30°C. La conversión a [³H]miristoil-CoA fue generalmente superior al 95%. La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 40 mM, pH 7,4, EGTA 0,5 mM, 2-mercaptoetanol 0,45 mM, Triton X-100 al 1%, sustrato de péptido (500 μM) y NMT en un volumen total de 25 μl. Se inició la reacción de transferasa mediante la adición de [³H]miristoil-CoA recién generada y se incubó a 30°C durante 30 minutos. Se finalizó la reacción dejando caer alícuotas de 15 μl de mezcla de incubación sobre discos de papel de fosfo celulosa P81 y secando bajo una corriente de aire caliente. Se lavaron los discos de papel de fosfo celulosa P81 en dos cambios de Tris-HCl 40 mM, pH 7,3 durante 60 minutos. Se cuantificó la radiactividad en 7,5 ml de mezcla de centelleo líquido Beckman Ready Safe™ en un contador de centelleo líquido Beckman. Se expresó una unidad de actividad NMT como 1 pmol de miristoil-péptido formado por min.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western esencialmente tal como se describió por Towbin *et al.* (1979) *Proc Natl Acad Sci USA.* 76, 4350-4354. Se sometieron a electroforesis las muestras sobre SDS-PAGE y se transfirieron a la membrana de PVDF. Se incubó la membrana de PVDF trans-inmunotransferida con tampón de bloqueo (PBS-Tween™ 20 más leche en polvo al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear la unión no específica. Tras el lavado, se incubó la inmunotransferencia a 4°C durante la noche con anticuerpo monoclonal frente a NMT-1 (1:250, dilución en tampón de bloqueo). Tras el lavado, se incubó la inmunotransferencia con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (1:5000, dilución en tampón de bloqueo) y se detectó la banda de NMT usando el reactivo de quimioluminiscencia y expuesto a películas de rayos X.

Inmunohistoquímica. Se usó la técnica de estreptavidina-avidina marcada (Warnke *et al.*, (1980) *J. Histochem Cytochem.* 28, 771-776) para localizar los anticuerpos primarios tras la recuperación de antígeno con microondas. Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron: CD3 (policlonal, dilución 1:80, Neomarkers, Fairmont, CA), CD20 (monoclonal, dilución 1:20, Dako, Mississauga, ON) y NMT (policlonal, dilución 1:50). Se evaluaron los resultados de tinción inmunohistoquímica de manera semicuantitativa como sigue: número de positivos de células mononucleares: ninguno; rara vez; 10%; 10-30%, 30-50%, >50%. Se evaluó la intensidad de tinción como ausente, débil, moderada o fuerte.

Otros métodos. Se estimaron las proteínas mediante el método de Bradford (Bradford (1976) *Anal Biochem.* 72, 248-254). Se usó el programa GraphPad Prism® para calcular los intervalos de confianza al 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En treinta semanas, todos los animales inyectados con azoximetano desarrollaron al menos dos tumores en el colon con un máximo de cuatro en dos casos. Las ratas control parecían sanas sin ningún tumor de colon. La evaluación histológica de estos tumores mostró que oscilaban entre adenoma (pólipo) y tumores C2 altamente invasivos, basándose en el sistema de clasificación de Duke modificado (Astler *et al.* (1954) *Ann Surg.* 139, 846-852).

Actividad N-miristoiltransferasa en células mononucleares de sangre periférica y médula ósea. Se midió la actividad N-miristoiltransferasa en las CMSP y CMO de control (n = 8) y ratas que portan tumor (n = 12). La actividad NMT era significativamente superior en CMSP y CMO de ratas que portan tumor en comparación con ratas control (P = 0,001).

La figura 1 muestra la actividad NMT en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y células de médula ósea (CMO) de ratas normales y que portan tumor de colon. Se evaluaron células mononucleares de sangre periférica aisladas de sangre periférica de rata control o que porta tumor para determinar la actividad NMT tal como se describió en "Materiales y métodos". Se sometió a ensayo la actividad NMT usando sustrato de péptido derivado de proteína cinasa dependiente de AMPc. Los valores son la media ± DE de tres experimentos independientes.

La figura 1 ilustra que la actividad NMT era aproximadamente tres veces superior en CMSP de ratas que portan tumor, frente a animales control. De manera interesante, se observó de manera comparativa la actividad NMT más alta (casi diez veces) en las CMSP de dos ratas que portan tumor con tumores C2 altamente invasivos. Mientras, se observó una actividad NMT aproximadamente seis veces superior en las CMO de las ratas que portan tumor de colon. Se notifica la actividad NMT elevada por primera vez en la muestra de sangre. Este aumento de la actividad NMT en las CMSP puede servir como herramienta de diagnóstico para el cáncer de colon.

Expresión de N-miristoiltransferasa en células mononucleares de sangre periférica y médula ósea. Se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para investigar si la actividad superior de NMT en CMSP y CMO de ratas que portan tumor se debe al aumento absoluto en la producción de NMT o a la eliminación del inhibidor o la aparición del activador de NMT. La expresión de NMT en CMSP y CMO era tres veces superior en ratas que portan tumor en comparación con ratas control. La actividad NMT es directamente proporcional a la expresión de proteína en CMSP y CMO de ratas que portan tumor.

La figura 2 muestra el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de células mononucleares de sangre

periférica y células de médula ósea de ratas normales y que portan tumor colorrectal. Se sometieron las proteínas (25 µg) de CMSP o CMO de ratas control o que portan tumor a SDS-PAGE al 10%, se trans-inmunotransfirieron sobre membrana de nitrocelulosa y se estudiaron mediante sonda con anticuerpo anti-NMT humana monoclonal (dilución 1:250) tal como se describió en “Materiales y métodos”.

- 5 La **figura 2** muestra que hay sobreexpresión de NMT en las CMSP y CMO de ratas que portan tumor como consecuencia del desarrollo del tumor.

10 **Inmunohistoquímica.** Una vez que se estableció que hay actividad elevada y sobreexpresión de NMT en las CMSP de huésped que porta tumor, se determinó entonces la incidencia del cáncer de colon a través de una técnica de diagnóstico rutinario. La actividad NMT y el análisis de inmunotransferencia de tipo Western implican procedimientos largos de separación de células mononucleares que entonces se lisan para obtener una muestra de proteína para su análisis. Por tanto se evaluó el potencial de NMT como herramienta de diagnóstico para cáncer de colon mediante estudios inmunohistoquímicos de sangre. Se usaron anticuerpos tanto anti-NMT monoclonales como anti-NMT policlonales para estudios inmunohistoquímicos. Un anticuerpo policlonal anti-NMT mostró tinción inmunohistoquímica y se usó para análisis inmunohistoquímico. Se tiñeron frotis de sangre y se estudiaron mediante sonda con anticuerpos anti-CD3, anti-CD20 y anti-NMT para estudios inmunohistoquímicos. En sangre periférica, se observó que la mayoría de las células mononucleares eran células T CD3+ (75-80%) mezcladas con un número menor de células B CD20+ (10-15%) (datos no mostrados).

15 La **figura 3** y la **figura 4** ilustran los resultados de análisis inmunohistoquímico de frotis de células de sangre periférica de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) incubadas con anticuerpo anti-NMT tal como se describió en “Materiales y métodos”. La **figura 3** muestra que las células mononucleares de sangre periférica (principalmente linfocitos) de ratas control carecían de tinción de NMT. La **figura 4** muestra la expresión de NMT intensa observada en las células mononucleares de sangre periférica de ratas que portan tumor colorrectal como evidente a partir de tinción fuerte (véanse las flechas). En casos con tumores, la expresión de NMT era de moderada a fuerte en más del 50% de células mononucleares (**figura 4**) mientras que estaba ausente en los controles (**figura 3**).

20 Se observó la sobreexpresión de NMT en casos de células mononucleares de ratas con tumores C2 altamente invasivos. También se detectó la positividad de NMT en los neutrófilos de sangre periférica. No se observó la expresión de NMT en monocitos. Los resultados de expresión de NMT notablemente distintos obtenidos del modelo animal son útiles en el establecimiento de una herramienta de diagnóstico simple en muestras de sangre humana de pacientes con cáncer colorrectal. Se estudió adicionalmente la expresión de NMT en médula ósea de ratas normales y con tumor colónico.

25 La **figura 5** y la **figura 6** ilustran el análisis inmunohistoquímico de portaobjetos de médula ósea preparados a partir de bloques incrustados en parafina de médula ósea de ratas normales y que portan tumor colónico, respectivamente. Se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico tal como se describió en “Materiales y métodos”.

30 La **figura 5** muestra que la tinción de NMT citoplásmica en células de médula ósea normales (véase la flecha) era de débil a apenas visible. La **figura 6** muestra que la NMT se teñía intensamente en médula ósea de ratas que portan tumor. Además de su sobreexpresión, una observación interesante adicional es que el análisis inmunohistoquímico de médula ósea de animal que porta tumor mostró tinción nuclear de NMT (véanse las flechas que indican zonas de ubicación nuclear de NMT). La presencia de NMT en el núcleo de la médula ósea en caso de cáncer de colon puede servir como marcador de diagnóstico/pronóstico.

Estudios preliminares indicaron que también se observó una expresión superior en pacientes humanos.

35 Sin querer limitarse a la teoría, es posible que la actividad NMT elevada en CMSP durante la carcinogénesis colónica pueda deberse a la demanda superior de miristoilación en diversas proteínas/oncoproteínas que se sobreexpresan y activan durante la tumorigénesis. Por ejemplo, los niveles de las tirosina cinasas miristoiladas, pp60c-src y pp60c-yes son varias veces superiores en lesiones preneoplásicas colónicas y neoplasias en comparación con células de colon normales (Bolen *et al.*, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84, 2251-2255; Termuhlen *et al.*, (1993) J. Surg. Res. 54, 293-298; Weber *et al.*, (1992) J. Clin. Invest. 90, 815-821). Uno de los posibles desenlaces de la alta actividad NMT en neoplasia puede ser la miristoilación aberrante de proteínas que de otro modo no están habitualmente miristoiladas. Por ejemplo, la N-miristoilación del p21 ras celular normal dio como resultado una actividad de transformación potente (Buss *et al.*, (1989) Biochem. Soc. Trans. 17, 867-869). La miristoilación de H-ras y K-ras alteró la ubicación subcelular y afectó significativamente a la activación de MAP cinasa (Cadwallader *et al.*, (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 4722-4730).

Ejemplo 2

N-miristoiltransferasa como marcador de diagnóstico para cáncer colorrectal en seres humanos

40 El cáncer colorrectal es la segunda causa principal de muertes por cáncer en el mundo occidental. Si se detecta a tiempo, el cáncer colorrectal es una de las formas más tratables de cáncer. Desafortunadamente, se examina a muy pocas personas. La N-miristoiltransferasa (NMT) cataliza la miristoilación de diversas proteínas incluyendo las

oncoproteínas. Los datos proporcionados en este ejemplo demuestran la alteración de la actividad NMT durante la progresión del cáncer colorrectal en seres humanos y establece la NMT como marcador de para el cáncer.

El diseño experimental usado en este ejemplo implica muestras de sangre periférica y médula ósea extraídas de pacientes con cáncer de colon humanos y sus controles. Se determinó la actividad y expresión de NMT tal como se notificó en el ejemplo 1. Se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos usando procedimientos convencionales.

Los resultados presentados en este ejemplo demuestran la expresión y ubicación alterada de NMT en la sangre periférica y médula ósea en pacientes con cáncer de colon. Los análisis inmunohistoquímicos revelaron tinción de débil a negativa para NMT en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de controles, mientras que se observó positividad fuerte en pacientes con cáncer de colon con CMSP. Se localizó la NMT en la mayoría de los casos en los núcleos de las células mononucleares de médula ósea (MO) de los pacientes con cáncer de colon, mientras que la NMT permaneció citoplásmica en los especímenes de médula ósea control.

La expresión de NMT notablemente diferente demuestra el uso de este marcador como herramienta de investigación para la selección o el diagnóstico de pacientes en riesgo de o de los que se sospecha que tienen cáncer de colon.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las fuentes de productos químicos y bioquímicos son tal como se describieron anteriormente (Shrivastav *et al.*, Cancer Res 2003; 63 (22):7975-8). Se sintetizó el sustrato de péptido derivado de los extremos N-terminales de proteína cinasa A dependiente de AMPc (GNAAAAKKRR) por el Alberta Peptide Institute, Canadá. Se adquirieron anticuerpos monoclonales de BD Biosciences (Mississauga, Canadá). Se produjeron anticuerpos policlonales frente a NMT humana purificada en conejos blancos Nueva Zelanda y se ha descrito la especificidad de este anticuerpo previamente por Raju *et al.*, Exp Cell Res 1997; 235 (1):145-54.

Extracción de muestras de sangre. Se extrajeron muestras de sangre periférica de los pacientes con cáncer de colon (n = 8) y controles (n = 5) tras consentimiento informado según las directrices de la Universidad de Saskatchewan. Se prepararon frotis de sangre para estudios inmunohistoquímicos.

Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se usaron inmediatamente muestras de sangre periférica para la separación de células mononucleares. Se aislaron CMSP usando Ficoll-Paque™ según procedimientos convencionales. Entonces se resuspendieron las CMSP aisladas en medio RPMI y se determinaron los recuentos y la viabilidad celulares. Además, se lisaron las CMSP en tampón RIPA que contenía PMSF 1 mM, DTT 10 mM y el 1% de cóctel inhibidor de proteasa.

Inmunohistoquímica. Se prepararon secciones de cinco µm de grosor de médula ósea a partir de bloques de archivo y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio. Se usaron secciones de médula ósea de tres pacientes con cáncer de colon y tres controles sin historia de ninguna clase de cáncer. Se usó la técnica de estreptavidina-avidina marcada para localizar los anticuerpos primarios tras la retirada de antígeno con microondas. Los anticuerpos primarios usados en este estudio fueron: anti-CD3 (policlonal, dilución 1:80, Neomarkers, Fairmont, CA), anti-CD20 (monoclonal, dilución 1:20, Dako, Mississauga, ON) y anti-NMT (policlonal, dilución 1:50). Se evaluaron los resultados de tinción inmunohistoquímica de manera semicuantitativa como sigue: número de positivos de células mononucleares: ninguno; rara vez; 10%; 10-30%, 30-50%, >50%. Se evaluó la intensidad de tinción como ausente, débil, moderada o fuerte.

Ensayo de N-miristoiltransferasa. Se sintetizó [³H]miristoil-CoA y se sometió a ensayo la actividad N-miristoiltransferasa tal como se describió anteriormente (Shrivastav *et al.*, Cancer Res 2003;63 (22):7975-8). La mezcla de ensayo contenía Tris-HCl 40 mM, pH 7,4, EGTA 0,5 mM, 2-mercaptoetanol 0,45 mM, Triton X-100 al 1%, sustrato de péptido (500 µM) y NMT en un volumen total de 25 µl. Se inició la reacción de transferasa mediante la adición de [³H]miristoil-CoA recién generada y se incubó a 30°C durante 30 min. Se expresó una unidad de actividad NMT como 1 pmol de miristoil-péptido formado por min.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se llevó a cabo SDS-PAGE usando procedimientos convencionales y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió previamente por Shrivastav *et al.*, Cancer Res 2003; 63 (22):7975-8, y se estudiaron mediante sonda con anticuerpo monoclonal frente a NMT-1 (1:250, dilución en tampón de bloqueo).

Se estimaron las proteínas mediante el método de Bradford usando BSA como patrón.

RESULTADOS

Se tiñeron frotis de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon y controles sanos y se estudiaron mediante sonda contra anticuerpos anti-CD3, anti-CD68, anti-CD20 y anti-NMT. En sangre periférica, la mayoría de las células mononucleares eran células T positivas CD3 (75-80%) mezcladas con un número menor de células B positivas CD20 (<5%). La positividad de CD68 estaba presente en aproximadamente el 15% de las células, en la mayoría de los casos monocitos.

La **figura 7** y la **figura 8** muestran tinción de NMT en las células mononucleares (incluyendo linfocitos y monocitos) y neutrófilos en los frotis de sangre periférica de los controles sanos que oscilaban entre positividad negativa y rara vez, débil. Se observó tinción de NMT fuerte en linfocitos (véase la flecha en la **figura 7**), monocitos (véanse las flechas en la **figura 8**) y neutrófilos en el frotis de sangre del paciente con cáncer de colon.

- 5 La **figura 9** muestra un frotis de sangre periférica de un paciente con cáncer de colon, que ilustra la tinción positiva de macrófagos.

La **figura 10** es un frotis de sangre periférica de un paciente con cáncer de colon, que ilustra la tinción positiva de neutrófilos, linfocitos y macrófagos.

- 10 La **figura 11** y la **figura 12** ilustran el análisis inmunohistoquímico de secciones de médula ósea de sujetos control y pacientes con cáncer de colon, respectivamente. En la **figura 12**, se encontró que la NMT estaba ubicada en los núcleos así como en el citoplasma de las células mononucleares de médula ósea de los pacientes con cáncer de colon, mientras que la NMT permaneció citoplásmica en los especímenes de médula ósea control, tal como se muestra en la **figura 11**.

- 15 La expresión de NMT notablemente diferente ilustra la capacidad de este marcador para servir como herramienta de investigación para la selección y/o el diagnóstico de pacientes en riesgo de o de los que se sospecha que tienen cáncer de colon. Además, la ubicación alterada de NMT en MO de huéspedes que portan tumor puede servir como herramienta de investigación añadida para fines de diagnóstico.

- 20 Para evaluar la especificidad de la prueba, se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica de la sangre periférica de un paciente con leucemia linfocítica crónica (LLC). La tinción de NMT era negativa en las células linfoides del paciente con LLC.

- 25 La actividad NMT elevada en CMSP durante la carcinogénesis colónica puede deberse a la gran demanda de miristoilación de diversas proteínas/oncoproteínas que se sobreexpresan y activan durante la tumorigénesis. Por ejemplo, los niveles de las tirosina cinasas miristoiladas, pp^{60c-src} y pp^{60c-yes} son varias veces superiores en lesiones preneoplásicas colónicas y neoplasias en comparación con células de colon normales (Biscardi *et al.*, Adv Cancer Res 1999 (76:61-119). Uno de los posibles desenlaces de la alta actividad NMT en neoplasia puede ser la miristoilación aberrante de proteínas que de lo contrario no están habitualmente miristoiladas. Por ejemplo, la N-miristoilación del p21 ras celular normal dio como resultado una actividad de transformación potente. La miristoilación de H-ras y K-ras alteró la ubicación subcelular y afectó significativamente a la activación de MAP cinasa.

- 30 Las realizaciones descritas anteriormente de la presente invención pretenden ser sólo ejemplos. Pueden efectuarse alteraciones, modificaciones y variaciones a las realizaciones particulares por los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención que se define solamente por las reivindicaciones adjuntadas al presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de cáncer colorrectal que comprende la etapa de: en una muestra de tejido no tumoral obtenida de un sujeto del que se sospecha que tiene cáncer, detectar un aumento del nivel de (i) expresión de N-miristoiltransferasa (NMT) o (ii) actividad N-miristoiltransferasa (NMT), en relación con un valor control en el que la muestra de tejido no tumoral es sangre o células de médula ósea.
5
2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de tejido no tumoral comprende células mononucleares de sangre periférica.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra de tejido no tumoral es una muestra de sangre y el método además comprende separar las células mononucleares de sangre periférica de la muestra de sangre, y en el que la detección se realiza sobre dichas células mononucleares de sangre periférica.
10
4. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra de tejido no tumoral es una muestra de médula ósea y el método además comprende separar las células de médula ósea de la muestra, en el que la detección se realiza sobre dichas células de médula ósea.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de NMT se detecta usando análisis inmunohistoquímico.
15
6. El método de la reivindicación 5, en el que el nivel de NMT se detecta cuantificando la unión entre NMT y un anticuerpo anti-NMT.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-NMT es un anticuerpo policlonal.
8. El método de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-NMT es anti NMT-1.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la actividad NMT se detecta usando una reacción de miristoilación de proteína con miristoil-CoA.
20
10. Uso de un anticuerpo anti-N-miristoiltransferasa según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

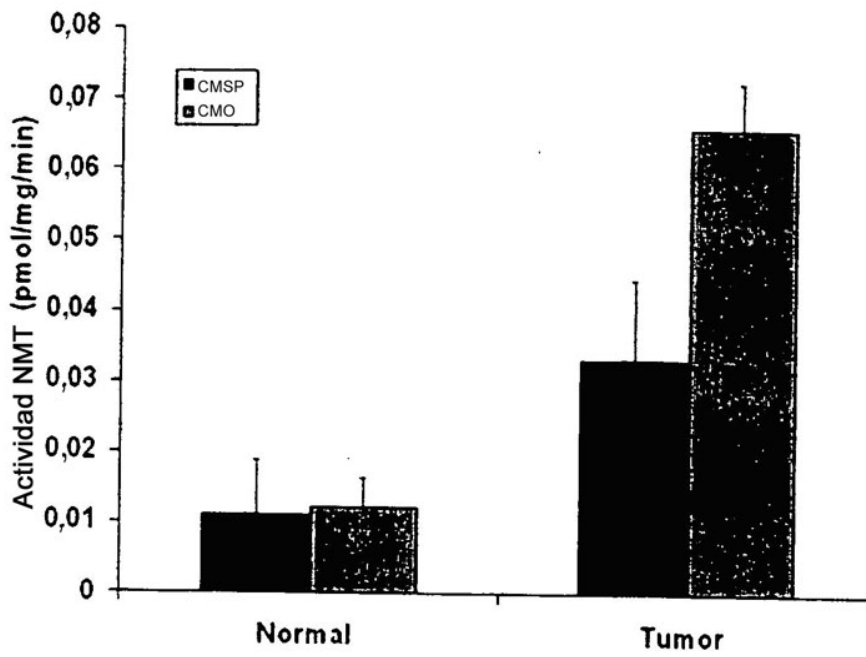


FIGURA 1

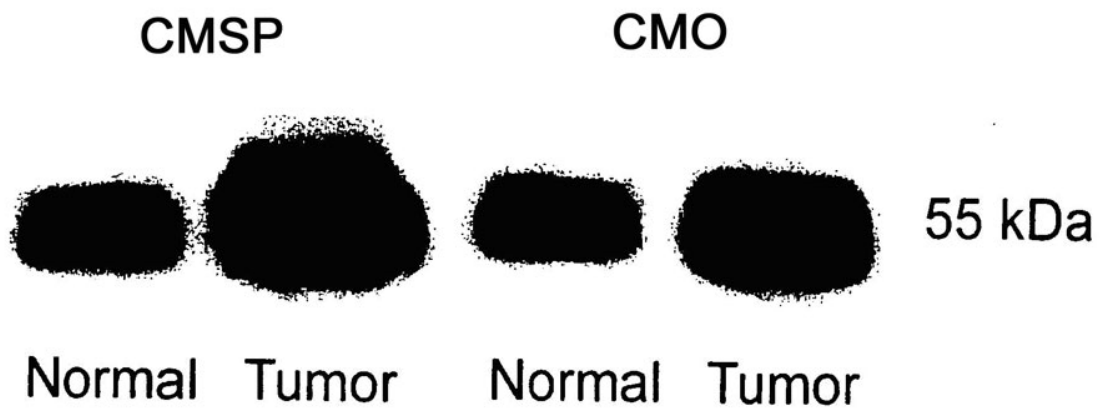


FIGURA 2

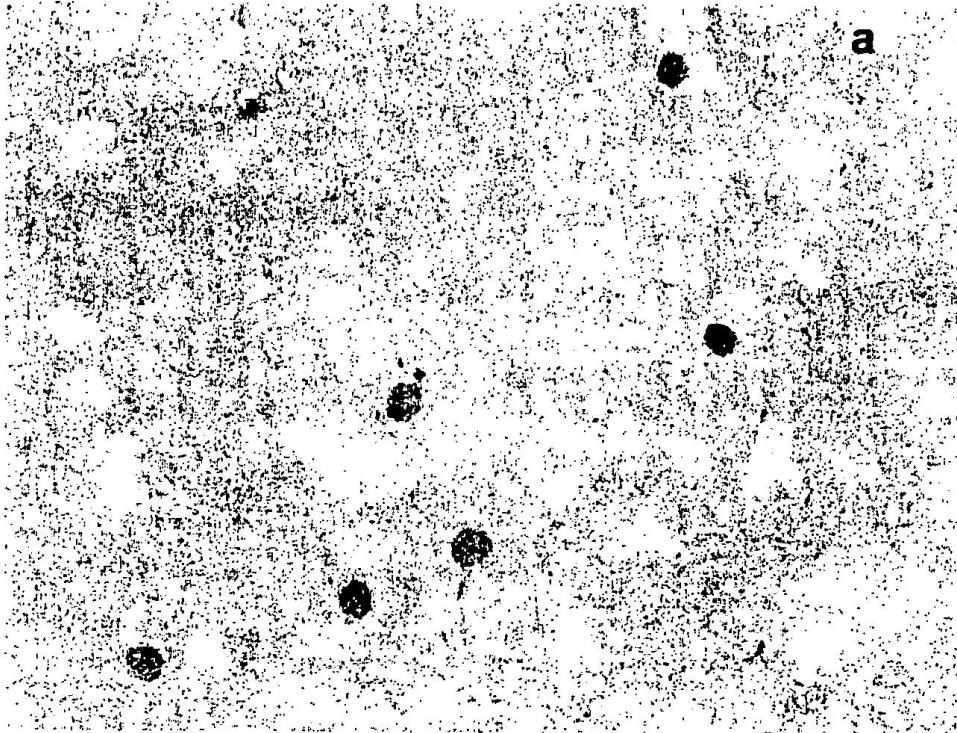


FIGURA 3

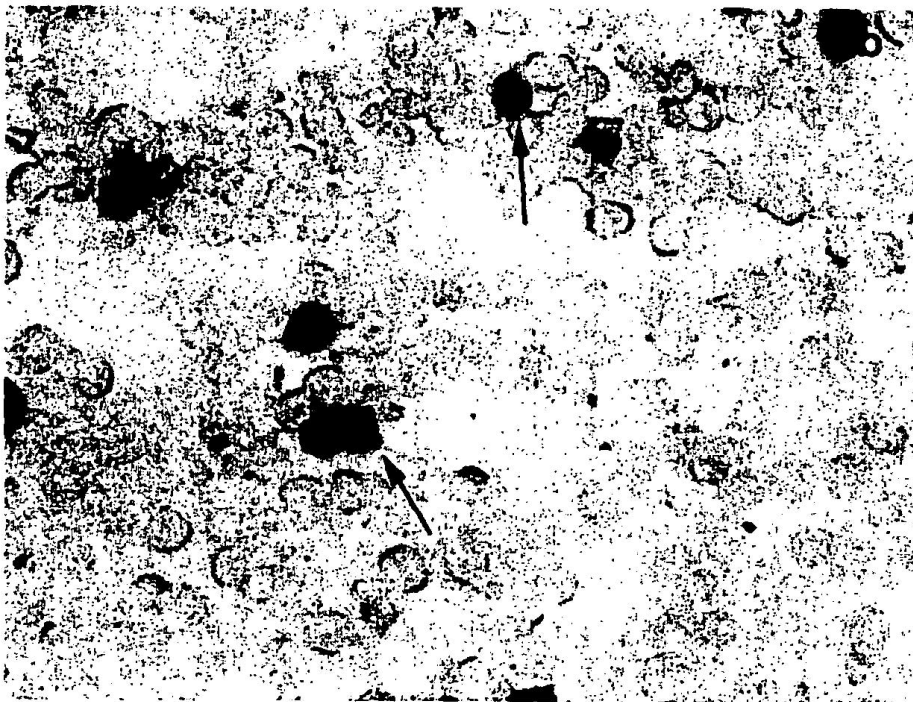


FIGURA 4

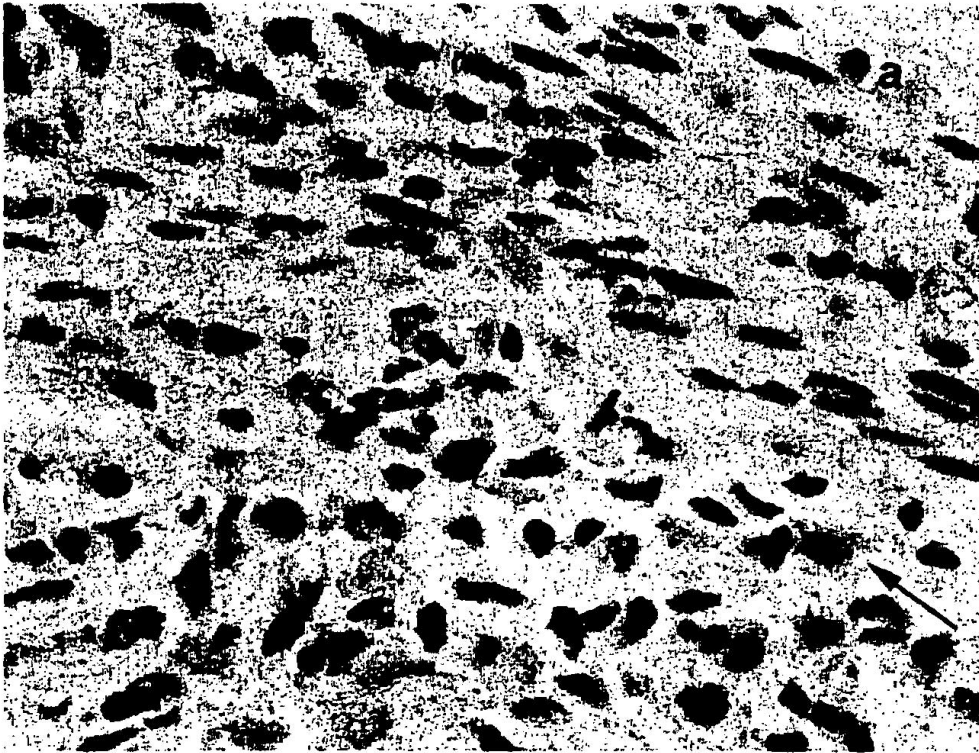


FIGURA 5



FIGURA 6

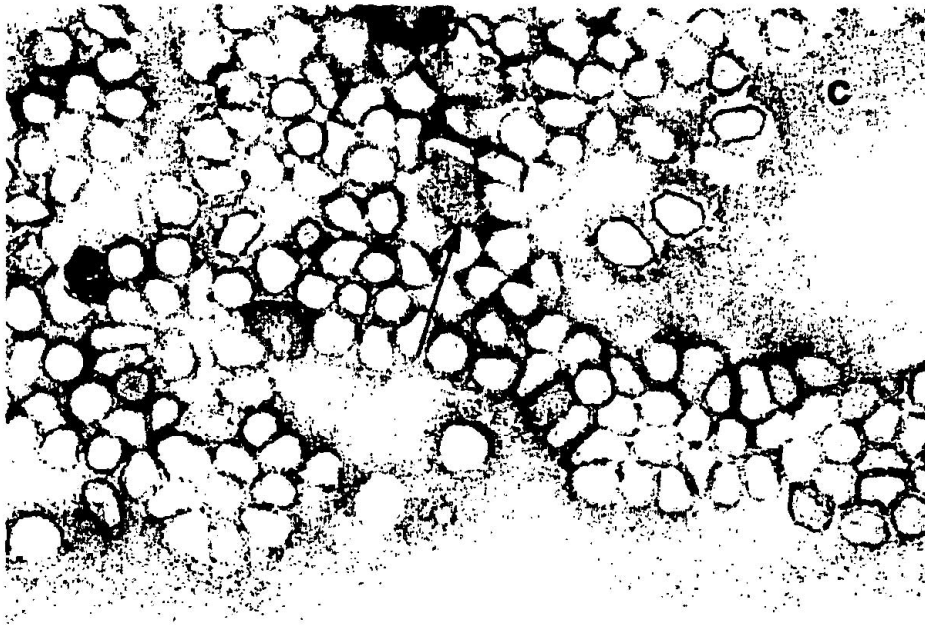


FIGURA 7



FIGURA 8

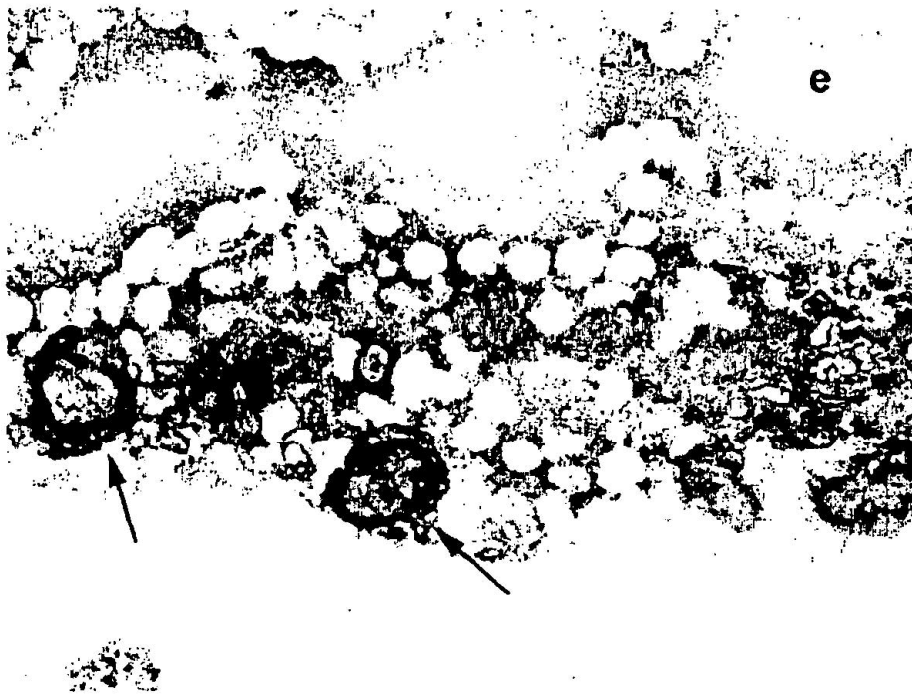


FIGURA 9

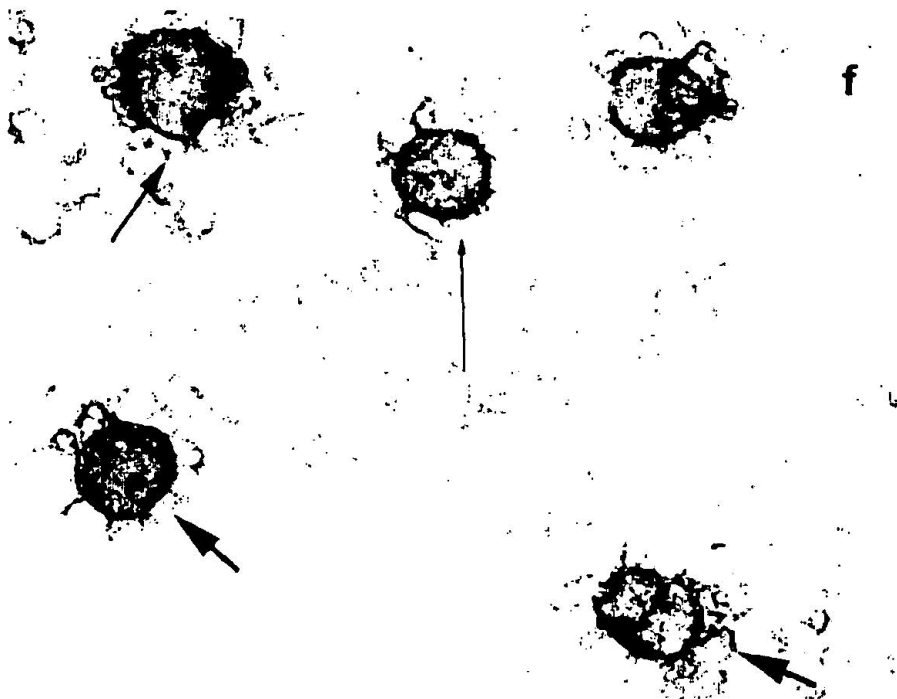


FIGURA 10

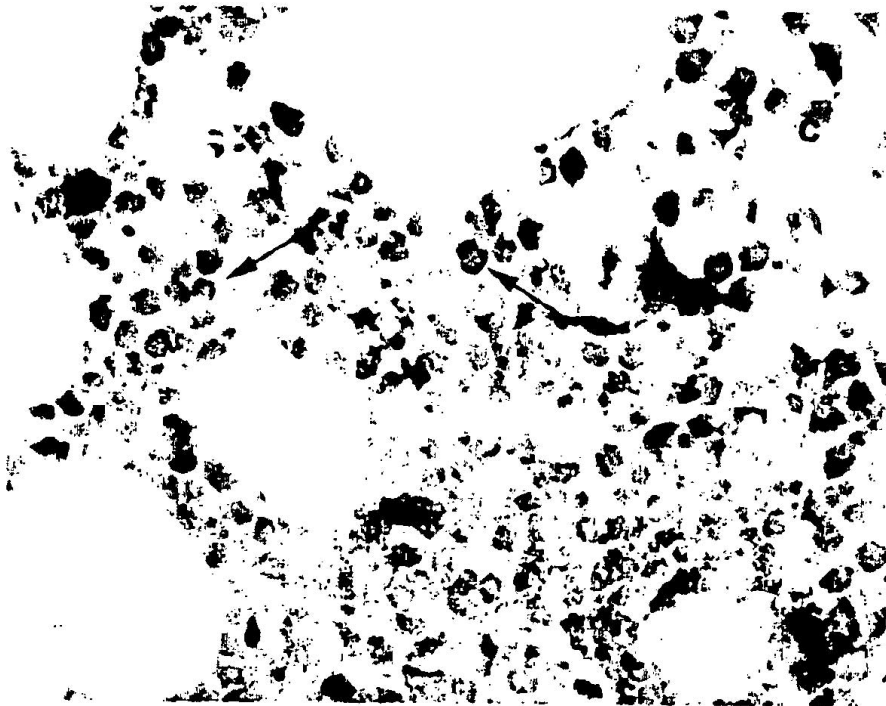


FIGURA 11



FIGURA 12