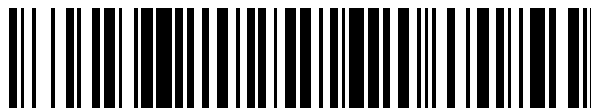


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 262**

21 Número de solicitud: 201531731

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.06.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070844

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (80.0%)

Avda. Medina Azahara, 5

14004 Córdoba ES y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (20.0%)

72 Inventor/es:

CASTAÑO FUENTES, Justo P.;

LUQUE HUERTAS, Raúl M.;

GAHETE ORTIZ, Manuel D.;

HORMAECHEA AGULLA, Daniel;

REQUENA TAPIA, María José;

GÓMEZ GÓMEZ, Enrique;

CARRASCO VALIENTE, Julia;

IBÁÑEZ COSTA, Alejandro;

MORENO, María Del Mar y

VALERO ROSA, José

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Ghrelin-O-acil transferasa (GOAT) y sus usos**

57 Resumen:

Ghrelin-O-acil transferasa (GOAT) y sus usos.

La presente invención se refiere al uso de los niveles obtenidos ex vivo a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto de la cantidad o concentración de la enzima ghrelin-O-acil transferasa (GOAT) o del ARNm que codifica para esta proteína, como una herramienta eficaz para la obtención de datos útiles en el diagnóstico clínico del cáncer de próstata.

ES 2 620 262 A1

Ghrelin-O-acil transferasa (GOAT) y sus usos**CAMPO DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuentra dentro de la biología molecular y la medicina, y se refiere a una
5 enzima denominada ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) y sus usos. En concreto, se refiere al uso
de esta enzima para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o detección de pacientes con
cáncer de próstata.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La ghrelina es una hormona sintetizada fundamentalmente por el estómago [1], aunque también se
expresa en un amplio rango de tejidos donde actúa como un factor paracrino o autocrino [2-5]. La
ghrelina es el principal ligando endógeno del receptor de secretagogos de la hormona del
crecimiento (GHS-R) de tipo 1a (GHS-R1a). Actualmente se sabe que el sistema ghrelina/GHS-R1a
15 ejerce acciones en múltiples tejidos, muchos de ellos relacionados con la regulación de las
funciones metabólicas [6-8]. Para que la ghrelina se una al receptor GHS-R1a y, por lo tanto, ejerza
sus acciones, es necesario que sea previamente acilada (a través de una n-octanoacilación) en su
residuo de serina 3 (Ser3). La enzima responsable de esta modificación post-transduccional es la
enzima ghrelin-O-acil-transferasa o GOAT [9, 10]. Esta enzima pertenece a la superfamilia de O-
20 acil-transferasas ancladas a membrana (MBOATs) [11] y, por ello, se denomina también MBOAT4
[12].

El gen de la GOAT humana (MBOAT4) se localiza en el cromosoma 12 y su secuencia presenta un
alto grado de conservación entre los vertebrados [13]. La GOAT es una proteína integral de
membrana que octanoila el residuo Ser3 de la ghrelina en el retículo endoplasmático tras la
eliminación del péptido señal [14]. La enzima GOAT se expresa, a nivel de ARNm, en un amplio
25 número de tejidos como el estómago, el páncreas, el músculo esquelético, el corazón, el intestino o
los huesos [15]; un patrón de expresión que parcialmente solapa con el exhibido por la ghrelina
[15]. De hecho, se ha observado la presencia de GOAT (a nivel de ARNm y de proteína) en células
individuales productoras de ghrelina [16]. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los
niveles de expresión de la GOAT no correlacionan perfectamente con los niveles de expresión de la
30 ghrelina, sino que son más parecidos a los mostrados por una variante de splicing del gen de la
ghrelina, denominada In1-ghrelina [17], sugiriendo la posible existencia de dianas adicionales para
la GOAT.

Es importante señalar que el sistema compuesto por la ghrelina, su variante de splicing In1-ghrelina, los receptores asociados (GHS-R1a y un receptor truncado denominado GHS-R1b) y la enzima GOAT podrían ejercer un papel regulador relevante en varios tipos de patologías tumorales. De hecho, todos los componentes de este sistema regulador se han encontrado expresados en tumores gástricos [18-20] y/o intestinales [21] y/o carcinoides pancreáticos [20, 22], así como en cáncer de mama [23] y de próstata [24], aunque sus niveles de expresión dependen del método de detección utilizado [18-21].

Sin embargo, los autores de la presente invención son los primeros en sugerir y en aportar datos experimentales que apoyen la determinación de uno de los componentes específicos del sistema, en particular de la enzima GOAT, como una herramienta útil clínicamente en el diagnóstico clínico del cáncer de próstata.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención se enfrentan al problema de proporcionar herramientas diagnósticas del cáncer de próstata. En particular, se enfrentan al problema de proporcionar una herramienta diagnóstica que sirva como una alternativa clínicamente eficaz a la utilización del antígeno prostático específico (PSA).

Al afrontar este problema, los autores han hallado que el uso de los niveles obtenidos *ex vivo* o *in vitro* a partir de una muestra biológica humana aislada de la cantidad o concentración de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) o del ARN_m que codifica para dicha proteína, constituye una herramienta eficaz como biomarcador o indicador para la obtención de datos útiles en el diagnóstico clínico del cáncer de próstata. En particular, los autores de la presente invención han observado como los niveles plasmáticos de GOAT pueden discernir entre pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos) con una alta especificidad y sensibilidad, 66% y 81%, respectivamente; niveles que avalan su condición como herramienta diagnóstica útil en clínica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURAS

Figura 1. Niveles de expresión de la GOAT en muestras de biopsias de pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos). Se representa el número de copias ajustado por un factor de normalización de n=37 casos tumorales y n=10 controles. Curva ROC que muestra que los niveles de expresión de la GOAT en muestras de biopsias pueden discernir entre pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos).

Figura 2. Niveles de GOAT en muestras de plasma de pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos). Se representa la concentración de GOAT (ng/mL) de n=85 casos tumorales y n=29 controles. Curva ROC que muestra que los niveles plasmáticos de GOAT pueden discernir entre pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos) con una alta especificidad y sensibilidad.

Figura 3. Correlaciones de los niveles plasmáticos de GOAT con los niveles de otros marcadores tumorales como PSA total (TPSA), PSA libre (FPSA), ca153 y cifra_211 en pacientes con cáncer de próstata.

Figura 4. Correlación de los niveles plasmáticos de GOAT con los niveles plasmáticos de hemoglobina glicosilada en pacientes con cáncer de próstata.

Figura 5. Correlaciones de los niveles plasmáticos de GOAT con los niveles de glucosa y el índice HOMA-IR en pacientes con cáncer de próstata que presentan síndrome metabólico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los resultados mostrados en la presente invención demuestran que los niveles de expresión de la GOAT, medidos por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), están significativamente aumentados en muestras procedentes de biopsias (muestras aisladas de tejido prostático) de pacientes con cáncer de próstata en comparación con muestras procedentes de biopsias de pacientes sanos (en los que la biopsia resultó negativa para la presencia de cáncer de próstata) (Figura 1, panel izquierdo). Es más, tal y como se muestra en la curva ROC mostrada en la figura 1 (panel derecho), los niveles de expresión de GOAT en dichas muestras biopsiadas pueden discernir de forma significativa entre pacientes con cáncer de próstata de individuos sanos con una alta sensibilidad y especificidad.

Por otro lado, los resultados aquí mostrados también indican que aunque los niveles de la proteína GOAT en orina no parecen ser suficientemente elevados como para ser útiles para el diagnóstico del cáncer de próstata, la medición de niveles de la proteína GOAT en plasma permite discernir entre pacientes con cáncer de próstata y controles (individuos sanos) con una alta especificidad y sensibilidad (Figura 2, panel izquierdo). Es más, los datos mostrados avalan que la medición de este marcador en muestras de sangre, en particular en plasma, resulta en un herramienta diagnóstica especialmente eficaz en clínica. Así, tal y como se muestra en la curva ROC de la figura 2 (panel derecho) un valor de GOAT en plasma de 1.212 ng/mL muestra una sensibilidad del 81% y una especificidad del 67% para discernir entre pacientes con y sin cáncer de próstata.

Además, los niveles plasmáticos de GOAT detectados en pacientes con cáncer de próstata correlacionaron positivamente con los niveles de PSA total (TPSA) y negativamente con los de PSA libre (FPSA) (Figura 3). De la misma forma, los niveles plasmáticos de GOAT detectados en pacientes con cáncer de próstata también correlacionaron positivamente con otros dos marcadores tumorales como son ca1 5.3 y cyfra_211 (Figura 3).

Por último, llama la atención que los niveles plasmáticos de GOAT detectados en pacientes con cáncer de próstata correlacionan con varios marcadores relacionados con la homeostasis de la glucosa, la diabetes y el síndrome metabólico. En concreto, los niveles de GOAT se correlacionaron positivamente con los niveles de hemoglobina glicosilada en pacientes con cáncer de próstata (Figura 4). Además, se correlacionaron con los niveles de glucosa y con el índice HOMA-IR en pacientes con cáncer de próstata que presentan síndrome metabólico (Figura 5).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de los niveles obtenidos *in vitro* (fuera del cuerpo humano u animal) a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto, preferiblemente de un humano, de los productos de expresión del gen que codifica la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) como biomarcador o indicador para la obtención de datos útiles en el diagnóstico o detección del cáncer de próstata.

Una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, se refiere al uso *in vitro* de los niveles (expresados en términos de cantidad o concentración) obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto, preferiblemente de un humano, de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) o del ARN_m que codifica para dicha enzima, como biomarcador o indicador para la obtención de datos útiles en el diagnóstico o detección del cáncer de próstata.

En otra realización preferida de la invención, los niveles de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) se determinan a partir de una muestra aislada de sangre, suero, de una muestra aislada de tejido prostático o de plasma y la determinación de los niveles del ARN_m se determina a partir de una muestra aislada de tejido prostático.

El término “productos de expresión del gen...”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a los productos de transcripción y/o de traducción (ARN y/o proteína) de dicho gen, o a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o traducción.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. La muestra biológica puede ser un tejido, por ejemplo, una biopsia o un aspirado por aguja fina, o puede ser una muestra de fluido, como sangre, plasma o suero. Preferiblemente, las muestras

biológicas aisladas se seleccionan de la lista que consiste en sangre, plasma, suero o una biopsia o muestra de tejido prostático.

El término “cáncer” o “canceroso” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier tumor maligno, en concreto a un tumor maligno de próstata.

- 5 La determinación de los niveles de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de los productos de expresión, basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de expresión, y que está correlacionada con el número de moléculas de dichos productos de expresión. Dicha señal – a la
- 10 que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).
- 15 El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión obtenidos mediante medida directa.
- 20 Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento. Así pues, la “determinación del nivel de expresión” de los genes puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido en el estado de la técnica.
- 25 En una realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, donde el análisis del nivel de ARNm de GOAT se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retro-transcripción en combinación con la
- 30 reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a

membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

- 5 El ARNm puede ser analizado, por ejemplo, pero sin limitarse, en muestras de tejido fresco, tejido congelado, tejido fijado o tejido fijado y embebido en parafina. El uso de muestras de tejido fijado y embebido en parafina presenta importantes ventajas con respecto a las muestras de tejido fresco o congelado: son estables a temperatura ambiente, fáciles de almacenar y existe un amplio archivo de muestras clínicas disponibles junto con su información clínica y el seguimiento de la enfermedad. Por tanto, en una realización preferida el analizado se extrae de muestras de tejido fijado y embebido en parafina.

- Sin embargo, el ARN obtenido de muestras de tejido fijadas y embebidas en parafina suele encontrarse muy degradado. Mientras que los estudios mediante microarrays son muy sensibles a la degradación del ARN, el uso de la RT-PCR, y en particular, de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) ha demostrado ser una técnica que ofrece mejores resultados ante la degradación del ARN. Además, el análisis de expresión mediante microarrays es una técnica compleja que requiere de equipos sofisticados que no están disponibles en muchos laboratorios. Por tanto, en otra realización preferida, la detección del ARNm de los genes se realiza mediante la técnica de RT-PCR; y en una realización, más preferida, la detección se realiza mediante la técnica de qRT-PCR.

- 20 En otra realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de proteína derivado de su transcripción y traducción, donde el análisis del nivel de los productos peptídicos de la GOAT se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o microarrays de proteína.

- Un segundo aspecto de la invención, se refiere un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto, preferiblemente humano, que comprende:

a. detectar y cuantificar *in vitro* en una muestra biológica aislada de dicho sujeto, la cantidad o concentración de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) o del ARN_m que codifica para dicha proteínas.

5 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en sangre, plasma, suero o una biopsia o muestra de tejido prostático.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el método además comprende:

b. comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un nivel de referencia o con los niveles obtenidos en una muestra control obtenida de un sujeto humano sano.

10 Un tercer aspecto de la invención, se refiere a un método de diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata que comprende los pasos (a) – (b) del segundo aspecto de la invención, y que además comprende:

c. asignar los sujetos que presentan unos niveles incrementados con respecto a un nivel de referencia, al grupo de individuos que padecen cáncer de próstata.

15 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “diagnóstico”, se refiere a la capacidad de discriminar entre individuos que padecen o no cáncer de próstata. También se refiere, pero sin limitarnos, a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes y de individuos sanos. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

30 La detección de la GOAT (tanto del ARNm como la propia proteína) en una muestra biológica aislada de un sujeto en una proporción superior a la cantidad de referencia es indicativa de que dicho individuo padece cáncer de próstata. En particular, niveles incrementados en al menos 1.5

veces, preferiblemente en 2 veces, los niveles obtenidos en una muestra control obtenida de un sujeto humano sano es indicativa de que dicho individuo padece cáncer de próstata.

Así, un tercer aspecto alternativo de la invención, se refiere a un método de diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata que comprende los pasos (a) – (b) del segundo aspecto de la invención, y que además comprende:

- c. asignar los sujetos que presentan unos niveles incrementados en al menos 1.5 veces, preferiblemente en 2 veces, los niveles obtenidos en una muestra control obtenida de un sujeto humano sano, al grupo de individuos que padecen cáncer de próstata.

El término “sujeto” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad y condición física.

Otro aspecto de la invención, cuarto aspecto, se refiere a un kit que comprende los medios adecuados para llevar a cabo los métodos de la invención. En una realización preferida, dicho kit comprende los medios para detectar los productos de expresión (en particular RNA_m y proteína) derivados del gen que genera la GOAT.

Una realización particular de este aspecto de la invención se refiere a un kit o dispositivo adecuado para llevar a cabo una reacción PCR, preferiblemente RT-PCR, qRT-PCR o qPCR, que comprende cebadores que consisten esencialmente en las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2. Dicho kit puede además comprender todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo dichas reacciones PCR. Así, el kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, enzimas, enzimas polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit puede contener además otras moléculas, genes, proteínas o sondas de interés, que sirvan como controles positivos y negativos. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el cuarto aspecto de la invención. Preferiblemente, el kit comprende adicionalmente a los cebadores indicados al menos uno o cualquier combinación de los siguiente reactivos: DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, marcadores, estabilizadores, DNAsas y la enzima transcriptasa reversa (RT).

Un quinto aspecto de la invención, se refiere al uso *in vitro* de un kit o dispositivo que comprende cebadores específicos para la determinación de los niveles de expresión de GOAT mediante PCR, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano a partir de una muestra biológica aislada de dicho sujeto. Preferiblemente, dicho kit se define según el cuarto aspecto de la invención. Preferiblemente, dicha muestra biológica se

selecciona de la lista que consiste en sangre, plasma, suero y muestras aisladas de tejido prostático.

Un sexto aspecto de la invención, se refiere al uso *in vitro* de un kit o dispositivo que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a la proteína GOAT, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano a partir de una muestra biológica aislada de dicho sujeto. Preferiblemente, dicha muestra biológica es una biopsia de tejido prostático. Preferiblemente el uso del sexto aspecto de la invención se lleva a cabo mediante un inmunoensayo, preferiblemente mediante un ELISA, más preferiblemente mediante el uso *in vitro* de un ELISA comercial (Human Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) ELISA Kit; MBS2019923, MyBioSource, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En otra realización preferida, el inmunoensayo es un inmunoblot o Western blot. Para llevar a cabo un inmunoblot o Western blot, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a los productos peptídicos de GOAT, In1-ghrelina y/o el receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b).

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce a los productos peptídicos de la GOAT, la In1-ghrelina y/o el receptor truncado de ghrelina (GHS-R1b).

Entre las técnicas inmunohistoquímicas que pueden emplearse para obtener los perfiles de expresión se encuentra el microarray tisular. El microarray tisular (TMA) es considerado hoy en día una potente herramienta para el análisis masivo del perfil molecular del cáncer de múltiples muestras de tejido simultáneamente, proporcionando la posibilidad de estudiar nuevos marcadores, o los ya existentes de manera masiva. A su vez, el TMA preserva las muestras originales de tejido que con los métodos tradicionales disminuyen en cuantía y se deterioran por el uso frecuente.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con cualquiera de los productos peptídicos de GOAT. Ejemplos de fragmentos de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂

que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de los productos peptídicos de la GOAT y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un "anticuerpo o polipéptido recombinante" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1. Mariales y métodos.

1.1. Pacientes y muestras.

Las muestras de biopsias prostáticas [tanto tumorales (n=37) como normales (n=10)] fueron obtenidas en el Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba), tras la apropiada evaluación de un experto patólogo y bajo la aprobación de los Comités de Ética de la Universidad de Córdoba y del Hospital Reina Sofía (Córdoba). Se trata de una cohorte de pacientes con sospecha de cáncer de próstata que fueron biopsiados entre 2012 y 2014 para confirmar dicha sospecha. Al momento de la biopsia también se recogieron muestras de sangre y de orina de dichos pacientes. Antes de entrar en el estudio, cada paciente firmó un consentimiento informado.

30 1.2. Aislamiento de ARN y transcripción reversa (RT).

Los ácidos nucleicos de los tejidos biopsiados se aislaron mediante el uso de un kit comercial (AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Qiagen; Barcelona, Spain) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trataron con DNasa. La cantidad de ARN total recuperado se determinó mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA). La transcripción reversa se llevó a cabo con 1 µg de ARN total, usando el kit cDNA First-Strand Synthesis (Fermentas, Hanover, MD, USA).

1.3. Determinación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La determinación de los niveles de expresión de GOAT se realizó mediante qPCR usando cebadores específicos para este transcrito (Sn: TTGCTCTTTTCCCTGCTCTC y As: ACTGCCACGTTTAGGCATTCT). La selección de los cebadores, así como verificación de su especificidad, y la confirmación de su eficiencia se ha realizado de manera similar a lo descrito previamente para otros genes [17, 25]. El volumen final de la reacción de PCR fue de 20 µl incluyendo 100ng de muestra y 10 µl de IQ™ SYBR Green Supermix (Biorad). El programa de la PCR consistió en 40 ciclos a 95° C durante 20s, 60° C durante 20s, y 55° C durante 30s. Además, en cada placa se corrió un control sin ADN para monitorizar posibles contaminaciones exógenas. En todos los casos, la amplificación se llevó a cabo con el sistema de qPCR Mx3000 (Agilent, Madrid). Para confirmar que se amplificó una sola banda del tamaño esperado, los productos se corrieron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Esta banda fue purificada y secuenciada posteriormente para confirmar que correspondía con la secuencia esperada.

1.4. Determinación de los niveles de la proteína GOAT.

La concentración plasmática o en orina de GOAT se determinó mediante el uso de un ELISA comercial (Human Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) ELISA Kit; MBS2019923, MyBioSource, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La información relativa a la especificidad, la detectabilidad y la reproducibilidad del ensayo están disponible en la página web de la compañía.

Ejemplo 2. RESULTADOS

2.1. Expresión del ARNm de GOAT en muestras de biopsias de próstata.

Los niveles de expresión de la GOAT, medidos por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), están significativamente aumentados en muestras procedentes de biopsias de pacientes con cáncer de próstata en comparación con muestras procedentes de biopsias de pacientes sanos (en los que la biopsia resultó negativa para la presencia de cáncer de próstata) (Figura 1, panel izquierdo). De hecho, los niveles de expresión de la GOAT en las biopsias pueden significativamente discernir

entre pacientes con cáncer de próstata e individuos sanos con una alta sensibilidad y especificidad (Curva ROC; Figura 1, panel derecho).

2.2. Niveles de GOAT en biofluidos de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.

Además, se determinaron los niveles de la proteína GOAT en biofluidos (plasma y orina) de dichos
5 pacientes. Estos análisis revelaron que la GOAT no se encuentra en orina a niveles detectables;
mientras que se encuentra a niveles considerables (detectables) en muestras de plasma. En
concreto, la enzima GOAT también se encuentra en mayores niveles en plasma de pacientes con
cáncer de próstata comparada con plasma de pacientes control sanos (Figura 2, panel izquierdo).
De igual manera, los niveles plasmáticos de GOAT pueden discernir entre pacientes con cáncer de
10 próstata e individuos sanos con una alta sensibilidad y especificidad (Curva ROC; Figura 2, panel
derecho). Así, un valor de GOAT en suero de 1.212 ng/mL muestra una sensibilidad del 81% y una
especificidad del 66% para discernir entre pacientes con y sin cáncer de próstata.

Además, los niveles plasmáticos de GOAT detectados en pacientes con cáncer de próstata
correlacionaron positivamente con los niveles de PSA total (TPSA) y negativamente con los de PSA
15 libre (FPSA) (Figura 3). De la misma forma, los niveles plasmáticos de GOAT detectados en
pacientes con cáncer de próstata también correlacionaron positivamente con otros dos marcadores
tumoraes, como son ca153 y cifra_211 (Figura 3).

Por último, llama la intención que los niveles plasmáticos de GOAT detectados en pacientes con
cáncer de próstata correlacionan con varios marcadores relacionados con la desregulación de la
20 homeostasis de la glucosa, la diabetes y el síndrome metabólico. En concreto, los niveles de GOAT
se correlacionaron positivamente con los niveles de hemoglobina glicosilada en pacientes con
cáncer de próstata (Figura 4). Además, se correlacionaron con los niveles de glucosa y con el
índice HOMA-IR en pacientes con cáncer de próstata que presentan síndrome metabólico (Figura
5).

25

BIBLIOGRAFIA

1. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
- 5 2. Lago, F., et al., *Ghrelin, the same peptide for different functions: player or bystander?* Vitam Horm, 2005. **71**: p. 405-32.
3. Leite-Moreira, A.F., A. Rocha-Sousa, and T. Henriques-Coelho, *Cardiac, skeletal, and smooth muscle regulation by ghrelin*. Vitam Horm, 2008. **77**: p. 207-38.
4. Leite-Moreira, A.F. and J.B. Soares, *Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin*. Drug Discov Today, 2007. **12**(7-8): p. 276-88.
- 10 5. Leontiou, C.A., G. Franchi, and M. Korbonits, *Ghrelin in neuroendocrine organs and tumours*. Pituitary, 2007. **10**(3): p. 213-25.
6. Horvath, T.L., et al., *Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective*. Endocrinology, 2001. **142**(10): p. 4163-9.
- 15 7. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
8. van der Lely, A.J., et al., *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. Endocr Rev, 2004. **25**(3): p. 426-57.
9. Gutierrez, J.A., et al., *Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6320-5.
- 20 10. Yang, J., et al., *Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone*. Cell, 2008. **132**(3): p. 387-96.
11. Chang, S.C. and A.I. Magee, *Acyltransferases for secreted signalling proteins (Review)*. Mol Membr Biol, 2009. **26**(1): p. 104-13.
- 25 12. Lim, C.T., B. Kola, and M. Korbonits, *The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism*. Rev Endocr Metab Disord, 2011. **12**(3): p. 173-86.
13. Muller, T.D., et al., *Genetic variation of the ghrelin activator gene ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is associated with anorexia nervosa*. J Psychiatr Res, 2011. **45**(5): p. 706-11.
14. Taylor, M.S., et al., *Architectural Organization of the Metabolic Regulatory Enzyme Ghrelin-O-Acyltransferase*. J Biol Chem, 2013.
- 30 15. Lim, C.T., et al., *The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues*. Endocr J, 2011. **58**(8): p. 707-10.
16. Sakata, I., et al., *Co-Localization of Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) and Ghrelin in Gastric Mucosal Cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1):E134-41.

17. Gahete, M.D., et al., *A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological relevance.* PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23302.
18. Papotti, M., et al., *Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 5052-9.
19. Rindi, G., et al., *Ghrelin expression in gut endocrine growths.* Histochem Cell Biol, 2002. **117**(6): p. 521-5.
20. Volante, M., et al., *Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1300-8.
21. Inhoff, T., et al., *Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.* Peptides, 2008. **29**(12): p. 2159-68.
22. Ekeblad, S., et al., *Co-expression of ghrelin and its receptor in pancreatic endocrine tumours.* Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(1): p. 115-22.
23. Chopin, L.K., et al., *The ghrelin axis--does it have an appetite for cancer progression?* Endocr Rev, 2012. **33**(6): p. 849-91.
24. Seim, I., et al., *Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is expressed in prostate cancer tissues and cell lines and expression is differentially regulated in vitro by ghrelin.* Reprod Biol Endocrinol, 2013. **11**: p. 70.
25. Ibanez-Costa, A., et al., *In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 8714.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de los niveles, expresados en términos de concentración o cantidad, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto, de los productos de expresión del gen que codifica para la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT), para la obtención de datos útiles en el diagnóstico o detección del cáncer de próstata.
2. Uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichos niveles de los productos de expresión se seleccionan de la lista que consiste en la cantidad o concentración de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) o del ARN_m que codifica para dicha enzima.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en sangre, plasma, suero o una biopsia o muestra de tejido prostático.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los niveles de los productos de expresión del gen se refieren a la cantidad o concentración de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) obtenidos a partir de una muestra aislada de sangre, suero, de una muestra aislada de tejido prostático o plasma y/o donde los niveles de los productos de expresión del gen se refieren a la cantidad o concentración del ARN_m obtenidos a partir de una muestra aislada de tejido prostático.
5. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano, que comprende:
 - a. detectar y cuantificar *in vitro* los niveles, expresados en términos de concentración o cantidad, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de dicho sujeto, de los productos de expresión del gen que codifica para la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT).
6. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano, donde dichos niveles de los productos de expresión se seleccionan de la lista que consiste en la cantidad o concentración de la enzima ghrelina-O-acil transferasa (GOAT) o del ARN_m que codifica para dicha enzima.
7. El método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, donde la muestra biológica aislada se selecciona de la lista que consiste en sangre, plasma, suero o una biopsia o muestra de tejido prostático.
8. Método de obtención de datos útiles según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que además comprende:

b. comparar los niveles obtenidos en el paso (a) con un nivel de referencia o con los niveles obtenidos en una muestra control obtenida de un sujeto humano sano.

9. Método de diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata que comprende los pasos (a) – (b) según la reivindicación 8, y que además comprende:

5 c. asignar los sujetos que presentan unos niveles incrementados con respecto a un nivel de referencia, al grupo de individuos que padecen cáncer de próstata.

10. Método de diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata que comprende los pasos (a) – (b) según la reivindicación 8, y que además comprende:

10 c. asignar los sujetos que presentan unos niveles incrementados en al menos 2 veces los niveles obtenidos en una muestra control obtenida de un sujeto humano sano, al grupo de individuos que padecen cáncer de próstata.

11. Kit o dispositivo adecuado para llevar a cabo una reacción PCR, preferiblemente RT-PCR, qRT-PCR o qPCR, que comprende cebadores que consisten esencialmente en las secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

15 12. El kit o dispositivo según la reivindicación 11, que además comprende al menos uno o cualquier combinación de los siguiente reactivos: DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, marcadores, estabilizadores, DNAsas y la enzima transcriptasa reversa (RT).

20 13. Uso *in vitro* de un kit o dispositivo que comprende cebadores específicos para la determinación de los niveles de expresión de GOAT mediante PCR, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano a partir de una muestra biológica aislada de dicho sujeto.

14. Uso según la reivindicación 13, donde el kit se define según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12.

25 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde dicha muestra biológica se selecciona de la lista que consiste en sangre, plasma, suero y muestras aisladas de tejido prostático.

30 16. Uso *in vitro* de un kit o dispositivo que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a la proteína GOAT, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o detección del cáncer de próstata en un sujeto humano a partir de una muestra biológica aislada de dicho sujeto.

17. Uso según la reivindicación 16, donde dicha muestra biológica es una biopsia de tejido prostático.

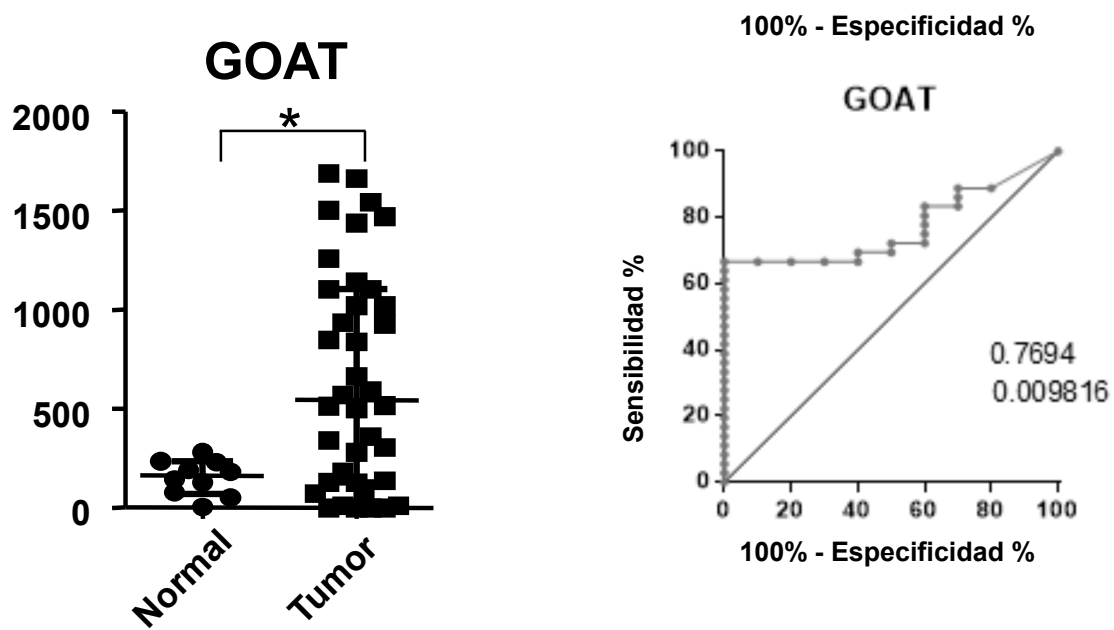


Fig. 1

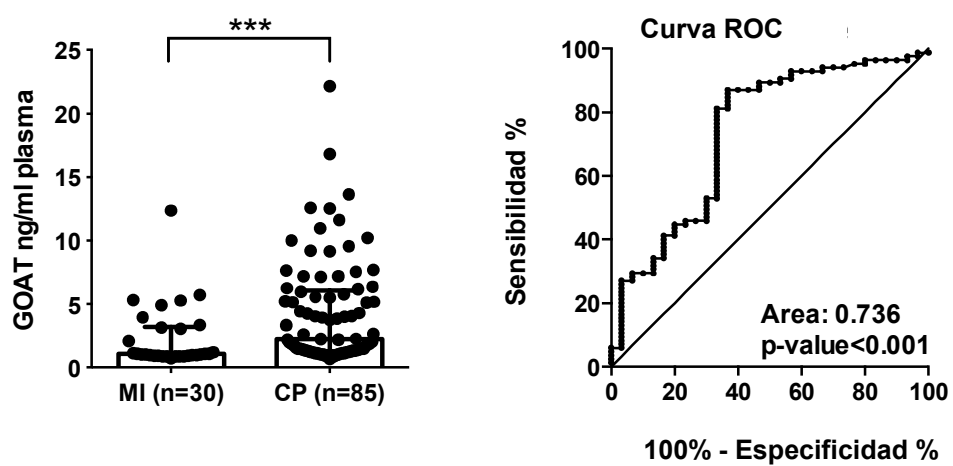


Fig. 2

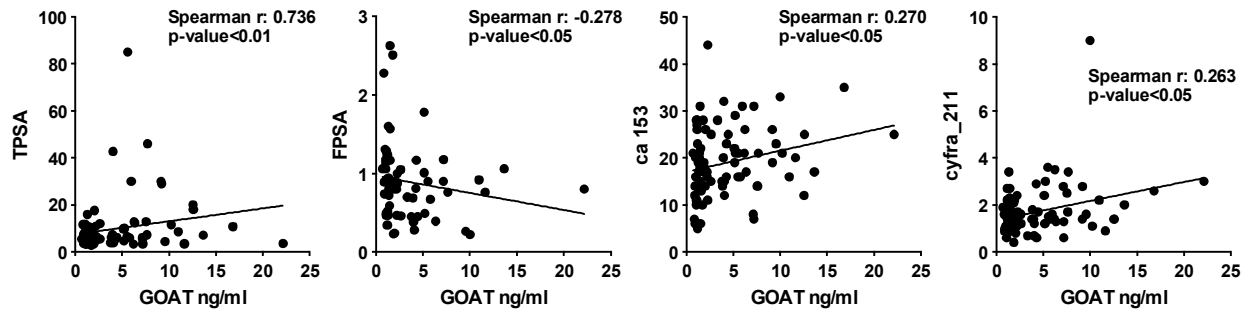


Fig. 3.

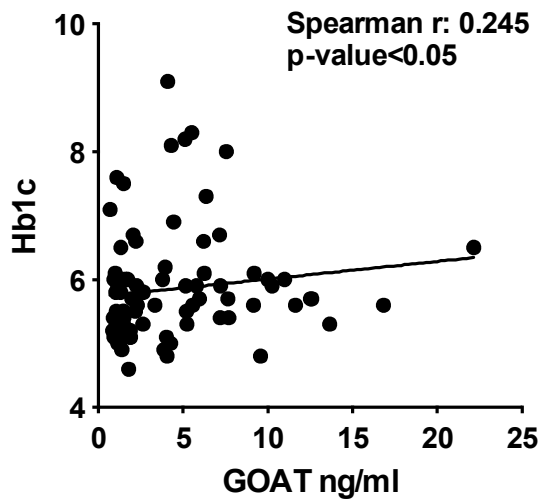


Fig. 4.

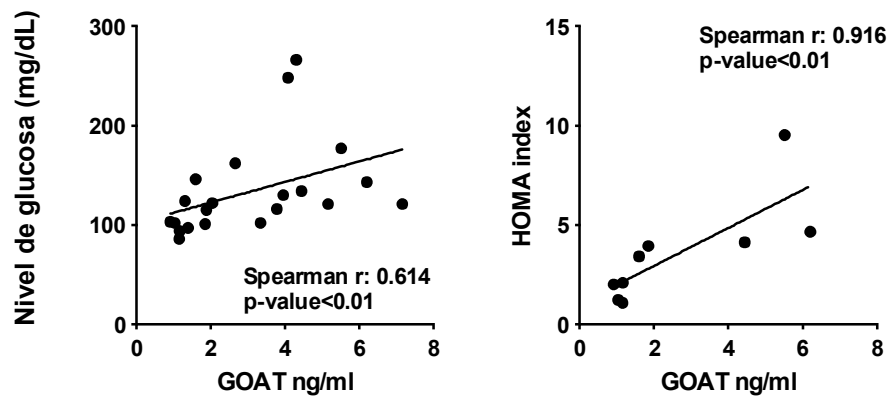


Fig. 5.

Listado de secuencia.

<110> UNIVERSIDAD DE CORDOBA
 <120> Ghrelina-O-aci1 transferasa (GOAT) y sus usos
 <130> 901049
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Cebador específico.

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <400> 1
 ttgctctttt tccctgctct c 21

 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Cebador específico

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <400> 2
 actgccacgt ttaggcattc t 21