

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 727**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2013 PCT/CA2013/050913**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14082178**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2013 E 13857774 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2925881**

54 Título: **Sobreexpresión de N-miristoiltransferasa 2 en sangre periférica y células mononucleares de la sangre periférica como marcador del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

28.11.2012 US 201261730694 P

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

19.03.2018

73 Titular/es:

**SHRIVASTAV, ANURAAG (100.0%)
515 Portage Ave
Winnipeg, Manitoba R3B 2E9, CA**

72 Inventor/es:

SHRIVASTAV, ANURAAG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 727 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

Sobreexpresión de N-miristoiltransferasa 2 en sangre periférica y células mononucleares de la sangre periférica como marcador del cáncer colorrectal

Información de la solicitud anterior

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. 61/730.694, presentada el 28 de noviembre de 2012.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es la principal causa de muerte en Canadá. El cáncer colorrectal (CCR), el segundo más mortal, tiene un 90% de supervivencia si se trata en un estadio temprano (CancerCare Manitoba, 2007; Population screening for colorectal cancer, 2006). Sin embargo, cada año mueren más de 600.000 personas en todo el mundo debido a CCR (Canadian Cancer Society, 2010). El CCR surge a partir de pólipos adenomatosos premalignos, que pueden tardar varios años en convertirse en cáncer. La genética también puede desempeñar un papel, ya que el 30% de los casos de CCR son hereditarios (CancerCare Manitoba, 2007; Population screening for colorectal cancer, 2006). Sin embargo, no todos los pólipos se convierten en CCR y la gran mayoría de los casos de CCR no son hereditarios.
- 15 Estas estadísticas destacan la necesidad urgente de métodos de detección fiables para una detección temprana del CCR.

Estrategias actuales para la detección del CCR

- 20 La detección es el medio para identificar individuos que tienen riesgo de padecer una enfermedad antes del desarrollo de los síntomas. Las pruebas de detección más comunes para el CCR incluyen pruebas de sangre oculta en heces (FOBT), sigmoidoscopia y colonoscopia (Screening, 2001) (Winawer, et al., 2003). La tasa de cumplimiento de estas pruebas para la detección es limitada debido a la baja sensibilidad o a la naturaleza invasiva (Moayyedi, 2007; Nicholson, et al., 2005). Por ejemplo, aunque FOBT es rentable y relativamente segura, las tasas de falsos positivos son altas y factores tales como la medicación o la dieta pueden sesgar los resultados. Para la detección con FOBT, los pacientes deben recoger una muestra de heces en casa y llevarla a un laboratorio para su análisis. La naturaleza desagradable de la recogida de muestras fecales ha conducido a una baja aceptación por parte del paciente. En Manitoba, la detección del cáncer de colon ha fracasado en gran medida, ya que el 85% de los pacientes seleccionados optaron por no someterse al proceso. La sigmoidoscopia y la colonoscopia son ambas costosas e invasivas, y los resultados y los riesgos del procedimiento dependen de la experiencia del endoscopista asistente (Baxter y Rabeneck, 2009; Singh et al., 2010; Singh et al., 2009).

- 30 El biomarcador antígeno carcinoembrionario (CEA), ampliamente disponible tiene una sensibilidad y especificidad limitadas (Duffy, et al., 2003; Ouyang, et al., 2005). Sin embargo, es probable que los análisis de sangre se acepten más fácilmente que las pruebas con heces o endoscópicas. Los análisis de sangre rentables pueden identificar pacientes con alto riesgo de CCR y mejorar el cumplimiento por parte del paciente de procedimientos de diagnóstico más intensivos e invasivos.

N-miristoilación

- 40 La N-miristoilación es la unión covalente de una cadena de ácido graso saturado de 14 carbonos con el residuo de glicina N-terminal de una proteína, que está catalizada por la enzima N-miristoiltransferasa (NMT). Se ha observado una miristoilación de proteínas entre diversos taxones, incluidos mamíferos, plantas, virus y hongos (Farazai, et al., 2001). En eucariotas inferiores, un solo gen codifica la NMT. Los eucariotas superiores, tales como los seres humanos, tienen dos genes (Giang y Cravatt, 1998).

- 45 La N-miristoilación es una modificación proteínica cotraduccional irreversible (Towler, et al., 1987). Algunos informes recientes han sugerido excepciones a esta regla con pruebas de una miristoilación posterior a la traducción. Por ejemplo, la proteína proapoptótica BID es escindida por la Caspasa 8 antes de la apoptosis para mostrar un motivo de miristoilación. Otra proteína que se miristoiliza de modo postraduccional es la proteína cinasa activada por P21, que está involucrada en el mantenimiento del citoesqueleto (Zha, et al., 2000; Vilar, et al., 2006). Las proteínas implicadas en las cascadas de señales, la transformación celular y la oncogénesis están miristoilizadas frecuentemente. Estas incluyen la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de AMPc (Carr, et al., 1982), la subunidad β de Calcineurina (Aitken, et al., 1982), la subunidad α de varias proteínas G (Schultz, et al., 1987), las formas transformantes celulares de pp^{60-src} (Schultz, et al., 1985), varias tirosina cinasas y proteínas importantes para el ensamblaje, la maduración y la infectividad de partículas víricas maduras, como el precursor Pr65gag del virus de la leucemia murina (Rein, et al., 1986) y el precursor del polipéptido VPO del virus de la polio (Marc, et al., 1989).

- 55 Con respecto a las infecciones víricas, se ha encontrado que el ARNm de NMT1 y NMT2 así como la actividad de NMT1 y NMT2 disminuyen con el curso de una infección con VIH-1 en la línea de linfocitos T humanos CEM. Además, se han encontrado inhibidores de NMT que muestran un efecto citotóxico sobre células CEM infectadas con VIH-1 (Takamune et al., 2002).

Sobreexpresión de NMT en CCR

La NMT eucariota es un miembro de la superfamilia de proteínas N-acetiltransferasas relacionadas con GCN5 (GNAT) (Resh, 1999) (Boutin, 1997) (Farazai, et al., 2001). La N-acetiltransferasa usa la acetil coenzima A (CoA) para transferir un grupo acetilo desde el donante a la amina primaria del aceptor. Dos genes codifican NMT en los eucariotas superiores, tales como animales bovinos, seres humanos y plantas. El segundo ADNc de NMT2 genéticamente distinto (NMT-2) se ha clonado a partir de una genoteca de hígado humano. Los homólogos respectivos de ratón para las dos NMTs humanas también se han clonado (Giang DK y col., 1998, J Biol Chem.; 273:6595-8). La proteína NMT2 es un producto de un gen diferente (gen *NMT2*) a *NMT1*.

Se ha notificado una actividad elevada de NMT en el tejido tumoral del colon, en comparación con tejido adyacente al tumor y tejido de pacientes de control (Magnuson, et al., 1995). Estudios recientes también han mostrado que la expresión de NMT1 en tumores de colon es mayor durante los estadios tempranos del cáncer de colon y también es alta en los pólipos (Selvakumar, et al., 2006). Sin embargo, en estudios previos, las mediciones de la actividad y la expresión de NMT en los tejidos tumorales mediante IHC (inmunohistoquímica), probablemente representaban la expresión de NMT total en lugar de solo la de NMT1 (King y Sharma, 1991).

Sobreexpresión de NMT

La sobreexpresión de NMT en los tumores de colon no se conoce bien. Sin embargo, es coherente con el aumento de la demanda de miristoilación de las oncoproteínas como respuesta a una división celular rápida durante la tumorigénesis. Se puede establecer un vínculo entre el cáncer colorrectal (CCR) y el sistema inmune a través de sus respectivas demandas de NMT. Se ha encontrado que la actividad de NMT y la expresión de NMT1 son esenciales para el desarrollo adecuado de la estirpe monocítica y, por lo tanto, pueden estar implicadas en la diferenciación de otros leucocitos (Shrivastav, et al., 2008). Shrivastav et al. (2007) han establecido una inmunotinción de NMT1 fuertemente positiva en sangre periférica de CCR de pacientes con CCR (n = 18). La inmunotinción se realizó usando un anticuerpo policlonal que se había generado contra la proteína NMT1 de longitud completa. Dado que NMT1 comparte aproximadamente el 77% de homología de secuencia de aminoácidos con NMT2, este anticuerpo policlonal de NMT1 podría haber reconocido ambas proteínas NMT1 y NMT2 en las muestras de sangre periférica o también debido a la activación de la respuesta inmune que conduce a una expresión incrementada de NMT1 debido a una infección y/o al cáncer.

Compendio de la invención

Previamente, se había notificado que la proteína NMT1 se sobreexpresa en las PBMCs de pacientes con cáncer colorrectal debido a una inmunotinción positiva usando un anticuerpo policlonal producido contra la proteína NMT1 de longitud completa.

El estudio actual de los inventores sobre el patrón de expresión de las isoformas NMT1 y NMT2 (productos de dos genes diferentes) en las PBMCs de pacientes con CCR, empleando anticuerpos específicos de NMT1 o NMT2, ha mostrado que la proteína NMT2 y no la proteína NMT1 se sobreexpresa en las PBMC de los pacientes con CCR. La proteína NMT2 es el producto de un gen distinto a NMT1. Después de un aislamiento adicional de linfocitos T procedentes de PBMCs, los inventores establecieron claramente que NMT2, no NMT1, se sobreexpresa en los linfocitos T de pacientes con CCR. Los inventores usaron anticuerpos policlonales reconocidos y validados de Sigma (Canadá), que son específicos de NMT1 o NMT2. El reconocimiento único de los anticuerpos policlonales de NMT1 y NMT2 permitió a los inventores delimitar que NMT2 se sobreexpresa en los linfocitos T de pacientes con CCR. Debido a una falta de anticuerpo específico de la isoforma NMT en un estudio previo, los inventores de hecho estaban midiendo la expresión de NMT total (NMT1 y NMT2) mediante inmunohistoquímica, en lugar de solo NMT1.

Además, en un estudio reciente, los inventores también observaron un aumento de la expresión de NMT1 cuando los linfocitos T CD4+ latentes se activaban mediante una ligación de los linfocitos T usando el anticuerpo anti-CD3/CD46. Esto añade más complejidad a la medición de NMT1 en pacientes con CCR, ya que sus linfocitos T CD4+ se activan gracias a la respuesta inmune debido a varias razones, incluida una infección o el cáncer. (Figura 9).

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un candidato para una detección adicional del cáncer colorrectal (CCR) que comprende: medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente que tiene riesgo de desarrollar CCR, que es sospechoso de tener CCR o que tiene CCR, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral indican que el paciente es un candidato para una detección adicional del CCR.

El método para una detección adicional de CCR se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en: sigmoidoscopia y colonoscopia.

Los niveles de NMT2 se pueden medir usando un cebador o una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico única para NMT2 o empleando un anticuerpo específico de NMT2.

El paciente puede ser un ser humano

El paciente puede tener un historial familiar de cáncer colorrectal o ser mayor de 55 años.

La muestra se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en: sangre completa, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos T y/o sus subpoblaciones que incluyen células CD8+. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de células CD4, es decir, una muestra que incluye células CD4 o que está enriquecida para células CD4, es decir, que tiene una proporción mayor de lo normal de células CD4.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente que comprende: medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente usando un reactivo para la medición que es específico de NMT2 en comparación con NMT1, y determinar si los niveles de NMT2 son superiores a un nivel umbral.

10 Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1: Perfil de expresión de NMT1 y NMT2 en linfocitos T CD4+ procedentes del control (n = 4) y pacientes con CCR (n = 4). NMT1 y NMT2 parecen ser más elevadas en los pacientes con CCR. La expresión de NMT1 tiene un solapamiento elevado entre los pacientes y no es significativa. Mientras que la expresión de NMT2 muestra cierto solapamiento. Es probable que esto se deba al valor más bajo del paciente ID023 con una puntuación H de 30 y al valor más alto de la puntuación H de 40 del grupo de control (CS2).

FIGURA 2: Perfil de expresión de NMT1 y NMT2 en linfocitos T CD8+ de control y pacientes con CCR. NMT1 y NMT2 parecen ser más elevadas en pacientes con CCR, pero existe una cantidad considerable de solapamiento. Se encontró que la prueba T que compara NMT1 en linfocitos T CD8+ no era significativa. Se encontró que la sobreexpresión de NMT2 era significativa mediante la prueba T.

FIGURA 3: Imagen de IHC representativa de linfocitos T CD4+ con tinción de NMT1 usando el cromógeno DAB (tinción marrón) con 40X. a) procede del grupo 1 (paciente CS1) y b) procede del grupo 2 (ID018). Los linfocitos T CD4+ de los pacientes de control (flecha) prácticamente no muestran una tinción de NMT1. Los pacientes con CCR muestran niveles más bajos de NMT1 y en pocas células (flecha).

FIGURA 4: Imagen de IHC representativa de linfocitos T CD4+ con tinción de NMT2 usando el cromógeno DAB (tinción marrón) con 40X. a) procede del grupo 1 (paciente CS1) y b) procede del grupo 2 (ID018). Los linfocitos T CD4+ procedentes del grupo de control prácticamente no muestran ninguna tinción. Los linfocitos T CD4+ procedentes de los pacientes con CCR muestran una tinción positiva fuerte de NMT2 (flecha). También se puede observar que NMT2 está localizada en el citoplasma de los linfocitos T. Sin embargo, no todas las células parecen mostrar una sobreexpresión (flecha en negrita).

FIGURA 5: Imagen de IHC representativa de linfocitos T CD8+ con tinción de NMT1 usando el cromógeno DAB (tinción marrón) con 40X. a) procede del grupo de control (CS1) y b) procede de un paciente con CCR (ID018). Las células procedentes de los pacientes de control prácticamente no muestran ninguna tinción (flecha). Los puntos rojos esféricos son perlas magnéticas utilizadas en el aislamiento de los linfocitos T. La mayoría de las células procedentes de pacientes con CCR se teñían de forma moderada positiva para NMT1 (flecha).

FIGURA 6: Imagen de IHC representativa de linfocitos T CD8+ con tinción de NMT2 usando el cromógeno DAB (tinción marrón) con 40X. a) procede del grupo de control (CS1) y b) procede de un paciente con CCR (ID017). Las células procedentes de los pacientes de control prácticamente no muestran ninguna tinción (flecha). La mayoría de las células procedentes de pacientes con CCR se teñían de forma fuertemente positiva para NMT2 (flecha).

FIGURA 7: Expresión de NMT2 en frotis de sangre periférica: se realizaron frotis de sangre sobre portaobjetos de vidrio y se realizó un análisis inmunohistoquímico como se describe en la sección de materiales y métodos. A) expresión de NMT2 en las células de sangre periférica. Los linfocitos procedentes de un sujeto sano (indicados por una flecha) muestran una tinción de débil a negativa para NMT2, mientras que B) la expresión de NMT2 es alta según se determina por la intensidad de la tinción con un anticuerpo anti-NMT2 en las células de sangre periférica (linfocito indicado por una flecha) procedentes de un paciente con cáncer colorrectal.

FIGURA 8: Expresión de NMT2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC): las PBMCs se separaron de la sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad usando ficoll-hypaque. Se prepararon portaobjetos de PBMCs para Cytospin y se realizó un análisis inmunohistoquímico como se describe en la sección de materiales y métodos. A) La expresión de NMT2 en las PBMCs periféricas de un sujeto sano muestra una tinción de débil a negativa para NMT2, mientras que B) la expresión de NMT2 es alta según se determina por la fuerte intensidad de la tinción con un anticuerpo anti-NMT2 en las PBMCs procedentes de un paciente con cáncer colorrectal.

FIGURA 9. Perfil de la expresión del gen de la N-miristoiltransferasa-2 (NMT2) en pacientes con CCR y sujetos sanos. La expresión del gen de NMT2 en las células mononucleares de sangre periférica se determinó en pacientes con CCR (A12 y A13) y sujetos sanos (C1 y C2) mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), utilizando cebadores validados Prime para PCR de BioRad. Estos cebadores eran específicos de NMT2. La expresión del gen de NMT2 en pacientes con CCR es el doble que en comparación con

sujetos sanos.

Breve descripción de las tablas

TABLA 1: Análisis de los resultados de la prueba T de dos colas a partir de la comparación de los niveles de expresión de NMT1 y NMT2 en grupos de pacientes y de control.

5 TABLA 2: Perfil de la expresión de NMT1 de pacientes en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

TABLA 3: Perfil de la expresión de NMT2 de pacientes en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.

TABLA 4: Antecedentes médicos de los participantes.

Descripción de las realizaciones preferidas

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se puede usar cualquier método y material, similar o equivalente a los descritos en este documento, en la puesta en práctica o las pruebas de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación. Todas las publicaciones mencionadas a continuación se incorporan en este documento como referencia.

15 Informes anteriores revelaron que la sobreexpresión de NMT1 es más notable en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En los sujetos de control, la expresión de NMT1 en las PBMCs y las células polimorfonucleares PMN variaba desde negativa a positiva de forma débil y escasa, con no más del 20%, si acaso, de las células con tinción positiva. Por el contrario, los pacientes con CCR mostraron una fuerte tinción de NMT1 en las PBMCs y PMNs. Sin embargo, en otro informe, se sugería que la expresión de NMT1 depende del estado de
20 activación de los neutrófilos (Shrivastav et al., 2010 Vet Res. 2010; 41:9). Además, los inventores habían informado anteriormente que NMT1 es la principal enzima durante la embriogénesis y que dos isoformas no son redundantes en su función (Yang et al., 2005, J Biol Chem. 2005; 280:18990-5). Es posible que NMT1 esté implicada en el funcionamiento normal de las células sanguíneas, sin embargo, la sobreexpresión de NMT2 es la característica de los procesos oncogénicos colorrectales. Es bastante posible que los linfocitos T que sobreexpresan NMT2 puedan
25 representar un hospedador de especificidades antigénicas, y aquellas contra CCR. Por lo tanto, la sobreexpresión de NMT2 debida exclusivamente a una expansión clonal dirigida por CCR es uno de los supuestos preferidos. Si la sobreexpresión de NMT2 también se puede deber a una sobreexpresión constitutiva (es decir, anterior al inicio de la enfermedad) en individuos que tienen un alto riesgo de desarrollar CCR, es otra posibilidad.

30 En consecuencia, la base biológica para la sobreexpresión de NMT2 en las PBMCs de pacientes con CCR se tiene que caracterizar mejor para utilizar NMT2 como marcador para una detección temprana del CCR.

Tal y como se analiza a continuación, en este documento se describe la identificación de la isozima de NMT, es decir, NMT2, sobreexpresada en PBMCs de pacientes con CCR y los tipos de células que sobreexpresan NMT2 en las PBMCs de pacientes con CCR.

35 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un candidato para una detección adicional del cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente con riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, sospechoso de tener cáncer colorrectal o que tiene cáncer colorrectal, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral, indican que el paciente es un candidato para una detección adicional de CCR.

40 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente que comprende:

medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente mediante el uso de un reactivo de medición que se dirige a regiones únicas o específicas de NMT2, en comparación con NMT1, y

determinar si los niveles de NMT2 son superiores a un nivel umbral.

45 Tal y como se analiza en este documento, el reactivo de medición puede ser un cebador, una sonda o un anticuerpo específico de NMT2.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar si un paciente es un candidato para una detección adicional del cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

50 medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente que tiene riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral indican que el paciente es un candidato para una detección o un diagnóstico adicional de CCR.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar un candidato para una detección adicional del cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

5 proporcionar una muestra de un paciente que tiene riesgo de desarrollar cáncer colorrectal y medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en dicha muestra, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral indican que el paciente es un candidato para una detección adicional del CCR.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar si un paciente es un candidato para una detección adicional del cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

10 proporcionar una muestra de un paciente que tiene riesgo de desarrollar cáncer colorrectal; y medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en dicha muestra, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral indican que el paciente es un candidato para una detección adicional del CCR.

Preferiblemente, en algunas realizaciones, solo se miden los niveles de NMT2. En algunas otras realizaciones, los niveles de NMT2 se miden de forma aislada o en ausencia de niveles de NMT1.

15 Como apreciará un experto en la materia, una detección adicional del cáncer colorrectal comprende cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero de ningún modo limitado a, sigmoidoscopia y colonoscopia.

20 Como apreciará un experto en la técnica, los niveles de NMT2 se pueden medir usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica que distinga entre la expresión de NMT2 y la expresión de NMT1. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, las secuencias tanto de NMT1 como de NMT2 son conocidas y, por consiguiente, se pueden detectar los niveles de NMT2, por ejemplo, mediante métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, mediante sondas o mediante anticuerpos.

25 Por ejemplo, se puede emplear un cebador o una sonda específica de NMT2 para detectar transcritos de NMT2, por ejemplo, mediante hibridación y/o amplificación. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o una preparación de anticuerpos policlonales producidos contra una o varias regiones específicas de la secuencia de aminoácidos de NMT2, para detectar los niveles de NMT2. Específicamente, un cebador o una sonda o un anticuerpo "específico" de NMT2, es uno que no reacciona de forma cruzada o no detecta de otra forma NMT1. Los reactivos de este tipo son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones de la invención, la expresión de NMT2 se mide con la condición de que no se midan simultáneamente los niveles de NMT1.

30 Como apreciará un experto en la técnica, los ejemplos anteriores no son de ninguna manera exhaustivos y otros métodos adecuados para medir los niveles de NMT2, por ejemplo, la medición de los niveles de transcripción de NMT2 o los niveles de expresión de NMT2, resultarán evidentes para un experto en la técnica.

Preferiblemente, el paciente o el individuo es un ser humano.

35 Preferiblemente, el paciente o el individuo es un individuo que se considera que tiene riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, que es sospechoso de tener cáncer colorrectal o que tiene cáncer colorrectal. Tales factores de riesgo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el paciente o el individuo pueden tener antecedentes familiares de cáncer colorrectal o puede tener más de 55 años o puede tener un historial de desarrollo de pólipos.

40 La muestra puede ser cualquier muestra adecuada a partir de la cual se pueda medir la actividad de NMT2. Como apreciará un experto en la técnica, el nivel "umbral" al que se ha hecho referencia anteriormente dependerá, por supuesto, del método de medición de NMT2 y también dependerá de la muestra utilizada en esta medición. Un umbral de este tipo se puede determinar mediante la comparación con un control negativo conocido y/o un control positivo conocido. Ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero de ningún modo se limitan a, sangre completa, monocitos de sangre periférica, linfocitos T y/o células CD8+.

Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de células CD4, es decir, una muestra que incluye células CD4 o que está enriquecida para células CD4, es decir, que tiene una proporción mayor que la normal de células CD4.

45 Estudios previos han revelado que NMT1 estaba sobreexpresada en la sangre periférica de pacientes con CCR. Un estudio anterior (Shrivastav et al. 2007) reducía la sobreexpresión exclusiva de NMT en pacientes con CCR a la de PBMCs. Dado que más del 60% de las PBMCs son linfocitos T, el inventor llegó a la conclusión de que la sobreexpresión de NMT2 exclusiva del CCR proviene de una subpoblación de linfocitos T. Las dos subpoblaciones más grandes de linfocitos T, los linfocitos T CD4+ (linfocitos T cooperadores) y los linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos) se analizaron en busca de una expresión de las dos isoformas de NMT, NMT1 y NMT2. Se usaron muestras de sangre procedentes de sujetos de control (n = 4) y pacientes con CCR (n = 4) para el análisis comparativo. También se estudiaron 3 pacientes que no padecían CCR pero que mostraron niveles elevados de NMT, pero se analizaron por separado.

Anteriormente se había informado de que NMT1 está sobreexpresada en PBMCs de pacientes con CCR (Shrivastav, et al., 2007). Sin embargo, el anticuerpo policlonal utilizado para el estudio de IHC se generó contra NMT1 de longitud completa. Las isoformas de NMT, NMT1 y NMT2 comparten una homología de secuencia de aminoácidos del 77%. Por lo tanto, existe una ambigüedad acerca de qué isoforma se está sobreexpresando en la sangre periférica de pacientes con CCR. Por lo tanto, se exploró la expresión de las isoformas de NMT en una subpoblación de linfocitos T y se observó que tanto NMT1 como NMT2 muestran una expresión alterada en subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y de linfocitos T CD8+ en pacientes con CCR (Tabla 2 y 3).

La expresión de NMT1 en comparación con la de NMT2 es mucho menor en pacientes con CCR (Figuras 1 y 2). Debido a la variación de la expresión de NMT1, no se pudo establecer si estaba sobreexpresada. Sin embargo, se encontró que la expresión de la isoforma NMT2 era significativamente más alta en los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+ de pacientes con CCR (Tabla 2).

La expresión de NMT2 en linfocitos T CD4+ de pacientes con CCR también era alta, pero existía un amplio intervalo de expresión (Tabla 2). La variación procede principalmente del paciente ID024 cuya expresión de NMT2 en los linfocitos T CD4+ es inusualmente baja (puntuación H - 30). ID024 tiene CCR en estadio 4 sin pólipos. Podría existir una conexión entre la presencia de pólipos y la expresión de NMT2 en los linfocitos T CD4+. ID008 no tiene cáncer, pero tiene pólipos y un fuerte historial familiar, y posteriormente los linfocitos T CD4+ muestran una puntuación H de NMT2 elevada de 180 (Tabla 3). Sin embargo, otros pacientes con CCR no parecen tener pólipos, pero continúan sobreexpresando NMT2.

Las proteínas miristoiladas están involucradas en una serie de funciones, desde la división celular hasta la apoptosis, pero la mayoría no se conoce bien. Shrivastav et al. (2007) encontraron que NMT se localiza en el núcleo de las células de la médula ósea (BMC) de pacientes con CCR y de ratas con tumores de colon. En los grupos de control, la NMT era citoplásmica. Estudiando las funciones de las isoformas de NMT en el CCR, Ducker et al. (2005) examinaron los efectos del silenciamiento de NMT1 y NMT2 usando ARNsi en células de CCR. El silenciamiento de NMT2 inducía 2,5 veces más muerte celular en las células tumorales que en comparación con el silenciamiento de NMT1 (2005), lo que implica que NMT2 es una diana terapéutica mejor. También se ha observado que el cáncer provoca que las células madre hematopoyéticas sufran eventos apoptóticos (Deckers, et al., 1973).

Una posible causa de la sobreexpresión de NMT2 se puede deber al proceso de diferenciación de los linfocitos T a través del timo. Durante la diferenciación de los linfocitos T, hay una etapa positiva doble (linfocitos T doblemente positivos CD4+/CD8+) en donde las células se someten a ensayo en busca de autoincompatibilidad. Durante este tiempo, la expresión de CD4 o CD8 cesa en las células. Las células que no superan la prueba de autoincompatibilidad, alrededor del 96-98% de los linfocitos T positivos dobles, experimentan apoptosis (Orkin y Zon, 2008). Los linfocitos T CD8+, también denominados linfocitos T citotóxicos, actúan en la supresión tumoral al inducir la apoptosis en las células cancerosas. Si NMT2 suprime la apoptosis, entonces su sobreexpresión podría ser una indicación de que los linfocitos T CD8+ defectuosos pueden sobrevivir a los intentos de apoptosis inducidos por el timo. Este tipo de razonamiento también puede incorporar el papel putativo de la localización nuclear de NMT en las células de la médula ósea que conduce a una sobreexpresión de NMT2 en los linfocitos T de forma directa o indirecta. Esta hipótesis sugiere por qué muchos linfocitos T CD8+ no muestran una sobreexpresión de NMT2 y, posiblemente, las células que no sobreexpresan NMT2 no son defectuosas.

Sobreexpresión de NMT2 debida a una expansión clonal como respuesta al CCR.

Los linfocitos T no expuestos son inducidos mediante CCR para sobreexpresar NMT2 a medida que maduran. Algunos de estos linfocitos T maduros se diferencian en linfocitos T de memoria que conservan altos niveles de expresión de NMT2. La expansión clonal a partir de estos linfocitos T de memoria conduce a la producción de células maduras que continúan sobreexpresando NMT2. Esta hipótesis sugiere que la sobreexpresión de NMT2 nunca disminuirá en los pacientes, incluso si han sido tratados debido a CCR.

Una explicación más simple de la sobreexpresión de NMT2 puede implicar la respuesta inmune mediada por células frente a CCR. En la respuesta anticancerígena mediada por células, los linfocitos T maduran como respuesta a los antígenos del tumor. Estos linfocitos T maduros experimentan una expansión clonal (se multiplican) para suprimir el tumor. Algunos clones procedentes de esta expansión clonal se convierten en linfocitos T de memoria que permanecen inactivos hasta que hay un nuevo encuentro con el antígeno. Después de la nueva exposición, estos linfocitos T de memoria pueden organizar una respuesta más rápida. Los linfocitos T de memoria pueden ser CD4+ o CD8+. En consecuencia, los linfocitos T que se encontraron con uno o varios antígenos del CCR experimentaron una transformación que dio como resultado la sobreexpresión de NMT2 y se expandieron clonalmente a su debido tiempo. Los linfocitos T de memoria formados en esta respuesta conservaron la sobreexpresión de NMT2. Por lo tanto, la sobreexpresión de NMT2 persiste después de la resección del CCR (Tabla 4). De acuerdo con esta teoría, la sobreexpresión de NMT2 no tiene relación con la capacidad de un linfocito T para responder al CCR.

Se encontró que NMT2 en los linfocitos T CD8+ se sobreexpresaba de manera única en pacientes con CCR. La expresión de NMT2 en los linfocitos T CD4+ era comparable a la de los linfocitos T CD8+, pero mostraba un amplio rango de expresión y no se pudo establecer como estadísticamente significativa, pero sigue siendo de interés. La expresión de NMT1 era mucho más baja que la de NMT2 en ambos subtipos de linfocitos T. La expresión de NMT1

era muy variable en los pacientes con CCR y no se pudo establecer su sobreexpresión como estadísticamente significativa, la expresión variada podría deberse a la activación de los linfocitos T debido a una infección y/o al cáncer. NMT2 en los linfocitos T CD8+ es claramente una herramienta de detección para el CCR.

5 La Figura 7 demuestra la expresión de NMT2 en frotis de sangre periférica. Se realizaron frotis de sangre en portaobjetos de vidrio y se realizó un análisis inmunohistoquímico. En el panel (A) se muestra la expresión de NMT2 en las células de sangre periférica. Los linfocitos del sujeto sano (indicados por una flecha) muestran una tinción de débil a negativa para NMT2 mientras que, como se muestra en el panel (B), la expresión de NMT2 es alta según se determina por la intensidad de la tinción con anticuerpo anti-NMT2 en las células de sangre periférica (linfocito indicado por una flecha) del paciente con cáncer colorrectal.

10 La Figura 8 muestra la expresión de NMT2 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs): las PBMCs se separaron de la sangre completa mediante centrifugación en gradiente de densidad usando ficoll-hypaque. Se prepararon portaobjetos de PBMCs para Cytospin y se realizó un análisis inmunohistoquímico tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. El panel (A) muestra la expresión de NMT2 en las PBMCs periféricas procedentes de un sujeto sano que muestra una tinción de débil a negativa para NMT2, mientras que la expresión de NMT2, mostrada en el panel (B), es alta según se determina por la fuerte intensidad de la tinción mediante un anticuerpo anti-NMT2 en las PBMCs de un paciente con cáncer colorrectal.

15 La Figura 9 muestra el perfil de expresión del gen de NMT2 en pacientes con CCR y sujetos sanos. La expresión del gen de NMT2 en las células mononucleares de sangre periférica se determinó en pacientes con CCR (A12 y A13) y en sujetos sanos (C1 y C2) mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando cebadores Prime para PCR validados de BioRad. Estos cebadores eran específicos de NMT2. Como se puede observar, la expresión del gen de NMT2 en los pacientes con CCR es dos veces mayor que en los sujetos sanos.

Distribución de isoforma de NMT

25 En los sujetos de control, NMT2 parece que se expresa más que NMT1 en los linfocitos T CD4+ (Figura 1). NMT1 es virtualmente indetectable en los linfocitos T CD4+ de los sujetos de control. La expresión de la isoforma de NMT en los linfocitos T CD8+ era comparable en los sujetos de control (Figura 2). Las isoformas de NMT, cuando se expresaban a niveles detectables, se localizaban en el citoplasma (Figuras 3 y 4).

Pacientes del grupo 3: expresión alta de NMT y sin CCR

30 Se encontró que tres sujetos reclutados inicialmente como controles, sobreexpresaban NMT (Tabla 4). ID002 había tenido un diagnóstico previo de CCR y el tumor se había resecado. ID008 tiene un fuerte historial familiar de CCR. ID013 se encontró que tenía un divertículo, pero se desconocía su historial familiar. Debido a su posición incierta como controles o pacientes, o a la falta de historiales, sus resultados no se usaron en los cálculos.

Expresión de la isoforma de NMT en pacientes con CCR

35 En los pacientes con CCR, la expresión de NMT2 es aproximadamente 3 veces mayor que la de NMT1 en ambos subtipos de linfocitos T. Como promedio, la expresión de NMT1 era casi el doble que la de los grupos de control (Figura 1). Sin embargo, la expresión de NMT1 en pacientes con CCR varía mucho y estadísticamente no se puede demostrar aunque sea una sobreexpresión (Tabla 1).

40 NMT2 se sobreexpresa en ambos subtipos de linfocitos T. En comparación con el grupo de control, la expresión de NMT2 es aproximadamente 5 veces mayor que la de los controles (Figuras 1 y 2). La sobreexpresión de NMT2 en linfocitos T CD8+ es estadísticamente significativa (Tabla 1). Sin embargo, la NMT2 procedente de los linfocitos T CD4+ muestra un amplio rango de expresión tanto en el grupo de control como en el de CCR (Figura 1). La puntuación H más alta procedente del grupo de control, es la del paciente CS2 (puntuación H = 40), y la expresión más baja en el grupo de CCR es la de ID024 (puntuación H = 30).

Muestras de pacientes

45 Las muestras de pacientes se obtuvieron a partir del Health Sciences Center, Winnipeg, Manitoba después de la aprobación de los requisitos éticos de la Universidad de Winnipeg, la Universidad de Manitoba, el Health Sciences Center y el consentimiento del paciente. En total se examinaron 4 controles y 4 pacientes con CCR, y 3 pacientes con una expresión inusual de NMT2. Todos los pacientes se habían sometido a una colonoscopia. Los pacientes a los que se les había diagnosticado CCR, se colocaron en el Grupo 1. Los sujetos de control sin evidencia de CCR, pólipos o antecedentes familiares, se colocaron en el Grupo 2. Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), divertículos o antecedentes familiares de CCR que no mostraban síntomas de CCR, se colocaron en el grupo 3. Los anticuerpos policlonales anti-NMT1 humanos y anti-NMT2 humanos se obtuvieron de Sigma Canadá. Estos anticuerpos eran series reconocidas, validadas para IHC. Son específicos de NMT1 o NMT2.

Separación de PBMCs

Las PBMCs se aislaron a partir de muestras de pacientes con CCR o sujetos de control. Las muestras de sangre se transfirieron cuidadosamente a un tubo para centrifuga de 50 ml y se diluyeron con medio RPMI 1640 en una proporción de 1:1. RPMI 1640 que se había complementado con 1% de piruvato de sodio, 1% de L-glutamina se usó para la dilución de las muestras de sangre. Se usaron tubos de centrifuga de 15 ml que se llenaron con 4 ml de Ficoll. Se vertió la sangre lentamente sobre el Ficoll para no alterar la superficie del Ficoll. Estos se centrifugaron a 800 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) flotan en la parte superior de la columna de Ficoll, mientras que los glóbulos rojos se depositan en la parte de abajo. El plasma sanguíneo se deposita sobre la capa de PBMCs. El plasma se retiró usando una pipeta. La capa de PBMCs se recogió pipeteando suavemente en un tubo de centrifuga de 15 ml y el resto se descartó. Las PBMCs aisladas se lavaron dos veces mezclando las células en RPMI 1640 y centrifugando a 320 g durante 10 minutos. Las células se sedimentaron a continuación y se resuspendieron en 3 ml de RPMI para el recuento. Se utilizó el método de exclusión con azul tripán para contar las células viables. Basándose en el recuento de las células, las muestras se diluyeron en consecuencia para permitir el aislamiento de los linfocitos T y la fijación con Cytospin.

Aislamiento de los linfocitos T CD8+ y CD4+

El aislamiento de los linfocitos T se realizó a través de una selección negativa, mediante el uso de perlas magnéticas (Dynabeads de Invitrogen). Las perlas están recubiertas con anticuerpos anti-ratón. Estos anticuerpos están presentes sobre las PBMCs además de la subpoblación de linfocitos T de interés. Las PBMCs se separaron en dos partes alícuotas en relación 1:2 para la separación de los linfocitos T. El 70% de las PBMCs son linfocitos T, y hay dos veces más linfocitos T CD4+ que linfocitos T CD8+. La separación 1:2 permite recuperar cantidades iguales de ambos tipos de células. Estas partes alícuotas se incubaron sobre hielo durante 30 minutos con anticuerpos contra las células que se tenían que eliminar. A continuación, las células se lavaron dos veces para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células se diluyeron hasta una concentración de al menos 10^7 células/ml para la incubación con perlas magnéticas. Cada célula debe estar unida a 4 perlas para obtener una separación óptima y se usaron las cantidades apropiadas. Las células se incubaron con las perlas magnéticas durante 30 min sobre hielo. Después de la incubación con las perlas, las células se diluyeron hasta un volumen de 5 ml. Para separar las células de interés, la parte alícuota de PBMCs-perlas se expuso a un imán durante 2 minutos. Las perlas magnéticas unidas a células no deseadas se coagulan alrededor de los imanes y los linfocitos T se vierten con el material sobrenadante. Se hizo un recuento de los linfocitos T aislados, se diluyeron y se prepararon para la fijación usando el procedimiento mencionado para el aislamiento de PBMCs. Alternativamente, los linfocitos T CD8+ se seleccionaron positivamente usando anticuerpo de CD8 y las células CD4+ se seleccionaron positivamente mediante anticuerpo de CD4+ conjugado con perlas magnéticas. Después de la detección positiva de los linfocitos T CD4+ o los linfocitos T CD8+, se retiraron las perlas magnéticas mediante un reactivo de desprendimiento de perlas.

Cytospin

Cytospin permite que las células se fijen sobre portaobjetos mediante centrifugación. Las muestras que contenían al menos 100.000 células vivas suspendidas en 200 μ l de RPMI 1640, se montaron sobre portaobjetos usando un aparato Cytospin (cámara de Cytospin y acoplador). Cuando se somete a un ciclo de centrifugación, el fluido en suspensión se dispersa en el papel de filtro sobre la base del embudo y la fuerza centrífuga fija las células sobre los portaobjetos.

Análisis IHC utilizando el método "Enhanced Polymer One Step" (EPOS)

El anticuerpo primario (anti-humano de conejo) se une al antígeno de interés. Múltiples anticuerpos secundarios (anti-conejo de cabra) se unen a una estructura principal de polímero de dextrano y se localizan alrededor del anticuerpo primario. Múltiples enzimas de peroxidasa de rábano picante también se acoplan a la estructura principal de dextrano. Cuando se introduce el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB), se oxida en las proximidades de la proteína diana para producir una tinción marrón oscura (Dako, 2011).

Análisis IHC

Se usaron técnicas convencionales de IHC para localizar los antígenos de interés, es decir NMT1 y NMT2, usando anticuerpos policlonales específicos de NMT1 o NMT2. El análisis IHC se realizó sobre frotis de sangre completa, PBMC, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, usando el sistema Ventanna automático en el CancerCare Manitoba, Winnipeg. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio son: NMT1 y NMT2 (policlonal de conejo anti-humano, dilución 1:50). Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP que reaccionaban con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) para producir una tinción marrón. La intensidad de la tinción con DAB es una medida de la cantidad de proteína presente.

Cuantificación de los resultados de IHC

Los portaobjetos se cuantificaron en función de su puntuación de IHC. Una puntuación de IHC (puntuación H) es el producto de la intensidad de la tinción (sobre una escala de 0 a 3, siendo 3 la más alta) y el porcentaje de células que se tiñen. Por ejemplo, en una muestra en la que el 90% de las células se tiñen de forma positiva y la intensidad de la tinción es 3, la puntuación H es $3 \times 90 = 270$. Las puntuaciones H oscilan de 0 a 300. El análisis estadístico se

5 realizó usando una prueba T de dos colas. Una prueba T se usa para establecer si dos conjuntos de datos que se comparan forman parte de un conjunto de datos original más grande. Si dos conjuntos de datos pertenecen a los mismos datos distribuidos normalmente, entonces las diferencias observadas podrían deberse a la casualidad. En este documento se usa una prueba T para evaluar si una diferencia entre las puntuaciones H entre los grupos de control y de CCR, es una coincidencia.

El alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado por las realizaciones preferidas, establecidas en los ejemplos, sino que se debe tomar la interpretación más amplia consistente con la descripción como un todo.

Referencias

- 10 Aitken, A., Cohen, P. & Santikarn, S., 1982. Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS Letter*, p. 314-8.
- Anon., 2006. Population screening for colorectal cancer. *Drug Ther Bull*, Volume 44, p. 65-68.
- Baxter, N. & Rabeneck, L., 2009. Is the effectiveness of colonoscopy "good enough" for population based screening?. *J Natl Cancer Inst*, p. 70-1.
- Boutin, J., 1997. Myristoylation. *Cell Signal*, p. 15-35.
- 15 Canadian Cancer Society, 2010. Canadian Cancer Society's Steering Committee. Toronto, Cancer Statistics.
- CancerCare Manitoba, 2007. Cancer in Manitoba: 2004 Annual Statistics Report, Winnipeg: s.n.
- Carr, S. et al., 1982. n-Tetradecnoyl is the NH₂-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *USA*, s.n., p. 6128-31.
- 20 Deckers, P., Davis, R., Parker, G. & Mannick, J., 1973. The effect of tumour size on concomitant tumour immunity. *Cancer Res*, p. 33-9.
- Duffy, M., Dalen, A. & Haglund, C., 2003. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Marker guidelines. *Eur J Cancer*, p. 718-27.
- Farazai, T., Waksman, G. & Gordon, J., 2001. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem*, p. 39501-4.
- 25 Furuishi, K. et al., 1997. Blockage of N-myristoylation of HIV-1 gag induces the production of impotent progeny virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, p. 504- 511.
- Giang, D. & Cravatt, B., 1998. A second mammalian N-myristoyltransferase. *J Biol Chem*, p. 6595-8.
- Irving, K., 2010. Tumour immunology: Tumours support the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, p. 617.
- King, M. & Sharma, R., 1991. NMT assay using phosphocellulose paper binding. *Anal Biochem*, p. 149-53.
- 30 Kumar, A. & Singh, S., 1995. Effect of cisplatin administration on the proliferation and differentiation of bone marrow cells of tumour-bearing mice. *Immunol Cell Biol*, p. 220-5.
- Magnuson, B., Raju, R., Moyana, T. & Sharma, R., 1995. Increased N-myristoyltransferase activity observed in rat and human colonic tumours. *J Natl Cancer*, p. 1630-5.
- 35 Marc, D. et al., 1989. Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence. *Embo K*, p. 2661-8.
- Martin, D., Beauchamp, E. & Berthiaume, L., 2011. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, p. 18-31.
- Maurer-Stroh, S. & Eisenhaber, F., 2004. Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends Microbiol*, p. 178-185.
- Moayyedi, P., 2007. Colorectal cancer screening lacks evidence of benefit. *Cleve Clin J Med*, p. 549-550.
- 40 Nicholson, F., Barro, J. & Atkin, W., 2005. Population screening for colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, p. 1069-77.
- Orkin, S. & Zon, L., 2008. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*, p. 631-644.
- Ouyang, D., Chen, J., Getzenberg, R. & Schoen, R., 2005. Noninvasive testing for colorectal cancer: a review. *Am J Gastroenterology*, p. 1393-403.

- Rajala, R. et al., 2000. Increased expression of NMT in gallbladder carcinomas. *Cancer*, p. 1992-9.
- Rein, A. et al., 1986. Myristoylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by moloney murine leukemia virus. *USA, s.n.*, p. 7246-50.
- 5 Resh, M., 1999. Fatty acylation of proteins - new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, Volume 1451, p. 1-16.
- Resh, M., 2004. A myristoyl switch regulates the membrane binding of HIV-1 Gag., s.l., *Proc Natl Acad Sci*, p. 417-8.
- Schultz, A. et al., 1987. Hydroxylamine-stable covalent linkage of myristic acid in GO alpha, a guanine nucleotide-binding protein of bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun*, p. 1234-9.
- 10 Schultz, A. et al., 1985. Amino terminal myristoylation of the protein p60src, a retroviral transforming protein. *Science*, p. 427-9.
- Screening, C. C., 2001. Recommendation statement from the Canadian Task force on Preventive Health Care. *CMAJ*, Issue 165, p. 206-208.
- Seaton, K. & Smith, C., 2008. N-Myristoyltransferase isozymes exhibit differential specificity for human immunodeficiency virus type 1 Gag and Nef. *J. Gen. Virol.*, p. 288-296.
- 15 Selvakumar, P., Smith-Windsor, E., Bonham, K. & Sharma, R., 2006. N-myristoyltransferase 2 expression in human colon cancer: cross-talk between the caplain and caspase system. *FEBS Letter*, p. 2021-6.
- Shrivastav, A., Varma, S. & Lawman, Z., 2008. Requirement of NMT1 in the development of monocytic lineages. *J Immunol*, p. 1019-28.
- 20 Shrivastav, A. et al., 2007. N-myristoyltransferase: a potential novel diagnostic marker for colon cancer. *J Transl Med*, p. 58.
- Shrivastav A, Suri SS, Mohr R, Janardhan KS, Sharma RK, Singh B. Expression and activity of N-myristoyltransferase in lung inflammation of cattle and its role in neutrophil apoptosis. *Vet Res*. 2010; 41:9.
- Singh, H. et al., 2010. The reduction in colorectal cancer mortality after colonoscopy varies by site of cancer. *Gastroenterology*.
- 25 Singh, H. et al., 2009. Predictors of colorectal cancer after negative colonoscopy: a population-based study. *Am J Gastroenterology*, p. 663-73.
- Towler, D., Adams, S. & Eubanks, S., 1987. Purification and myristoylation of yeast myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase. *USA, s.n.*, p. 2708-12.
- 30 Vilar, G. et al., 2006. Posttranslational myristoylation of caspase-activated p21- activated protein kinase 2 potentiates late apoptotic events. *USA, s.n.*, p. 6542-7.
- Winawer, S. et al., 2003. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, Volume 124, p. 544-560.
- Yang, S. et al., 2005. N-myristoyltransferase 1 is essential in early mouse development. *J Biol Chem*, p. 18990-5.
- 35 Zha, J. et al., 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*, p. 1761-5.

ES 2 659 727 T3

Tabla 1: Comparación de los grupos de expresión de NMT1 y NMT2 en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en pacientes y controles. Se encuentra que NMT2 se sobreexpresa en los linfocitos T CD8+ mediante una prueba T de dos colas ($P\alpha = 0,05$)

NMT frente a linfocitos T	Valor de P ($P\alpha = 0,05$)	Diferencia significativa
NMT1		
CD4	0,091	No
CD8	0,243	No
NMT2		
CD4	0,082	No
CD8*	0,026	Sí
* NMT2 se encuentra que se sobreexpresa en los linfocitos T CD8+ procedentes de pacientes con CCR		

Tabla 2: Perfil de la expresión de NMT1 de pacientes en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ (n = 11)

ID del paciente	CD4			CD8		
	Intensidad	Penetrancia	Puntuación H	Intensidad	Penetrancia	Puntuación H
Grupo 1 (Controles)						
CS1	01	05	05	01	05	40
CS2	01	05	05	01	05	05
ID012	01	05	05	01	05	05
ID017	01	05	05	01	20	20
Grupo 2 (Pacientes con CCR)						
ID015	01	20	20	01	30	30
ID018	01	20	20	01	90	90
ID023	01	05	05	01	10	10
ID024	01	05	05	01	05	05
Grupo 3 (Sin CCR con NMT alta)						
ID002	02	40	80	02	30	60
ID008	01	30	30	01	30	30
ID013	01	70	70	01	70	70

Tabla 3: Perfil de la expresión de NMT2 de pacientes en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ (n = 11)

ID del paciente	CD4			CD8		
	Intensidad	Penetrancia	Puntuación H	Intensidad	Penetrancia	Puntuación H
Grupo 1 (Controles)						
CS1	01	05	05	01	05	40
CS2	01	40	40	01	40	40
ID012	01	05	05	01	05	05
ID017	01	05	05	01	20	20
Grupo 2 (Pacientes con CCR)						
ID015	02	30	60	03	40	120
ID018	03	90	120	03	90	180
ID023	01	30	30	03	50	150
ID024	03	30	90	03	20	60
Grupo 3 (Sin CCR con NMT alta)						
ID002	01	20	20	03	90	120
ID008	02	90	180	02	80	160
ID013	02	90	180	03	90	180

Tabla 4: Antecedentes médicos de los participantes (n = 11)

ID del paciente	Historial médico
<u>Grupo 1 (Controles)</u>	
CS1	No hay casos conocidos de cáncer
CS2	Cáncer de mama
ID012	Cáncer de mama
ID017	N/A
<u>Grupo 2 (Pacientes con CCR)</u>	
ID015	Cáncer sigmoideo en estadio 4. No hay pólipos.
ID018	CCR en estadio 3c. Tiene pólipos
ID023	CCR en estadio 4. Antecedentes familiares.
ID024	Adenocarcinoma rectal. Inicial.
<u>Grupo 3 (Sin CCR con NMT alta)</u>	
ID002	Madre con cáncer de mama. CCR resecado en 2010.
ID008	No hay cáncer. Antecedentes familiares de CCR. Tiene pólipos.
ID013	No hay cáncer. Tiene diverticulitis en el colon sigmoideo

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un candidato para una detección adicional de cáncer colorrectal (CCR) que comprende:
 - 5 medir los niveles de N-miristoiltransferasa 2 (NMT2) en una muestra de un paciente que tiene riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, que es sospechoso de tener cáncer colorrectal o que tiene cáncer colorrectal, en donde niveles de NMT2 superiores a un nivel umbral indica que el paciente es un candidato para una detección adicional de CCR, en donde la muestra se selecciona a partir del grupo que consiste en: sangre completa, células monocíticas de la sangre periférica, linfocitos T y/o células CD8+.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que la detección adicional del cáncer colorrectal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sigmoidoscopia y colonoscopia.
3. El método según la reivindicación 1, en el que los niveles de NMT2 se miden usando un cebador que comprende una secuencia de ácido nucleico exclusiva para NMT2.
4. El método según la reivindicación 1, en el que los niveles de NMT2 se miden usando una sonda que comprende una secuencia de ácido nucleico exclusiva para NMT2.
- 15 5. El método según la reivindicación 1, en el que los niveles de NMT2 se miden usando un anticuerpo específico de NMT2.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el paciente es un ser humano.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el individuo tiene antecedentes familiares de cáncer colorrectal o es mayor de 55.
- 20

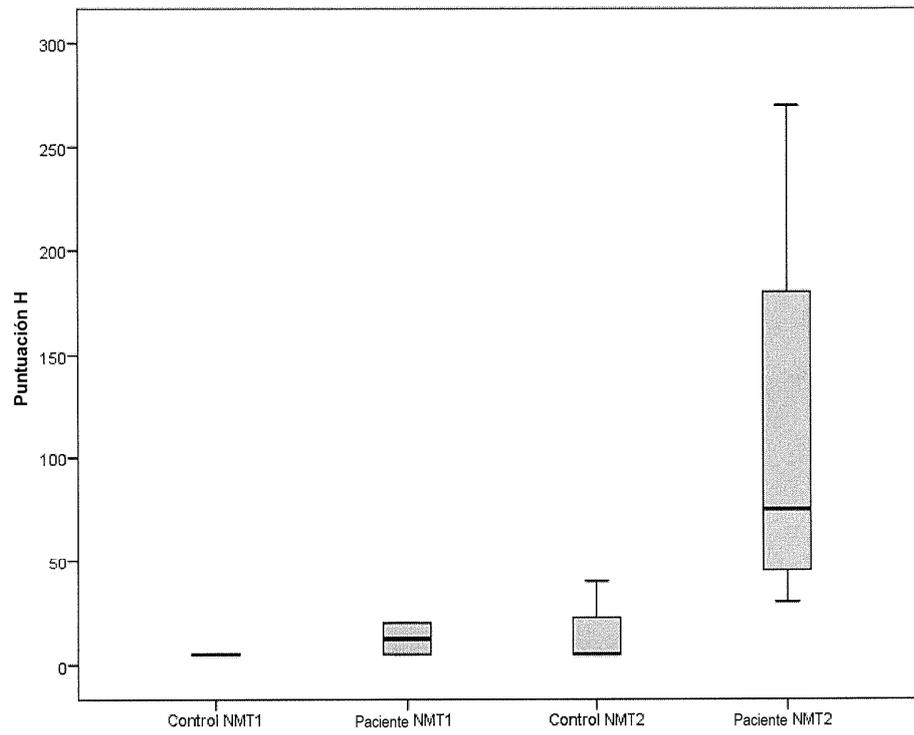


Figura 1

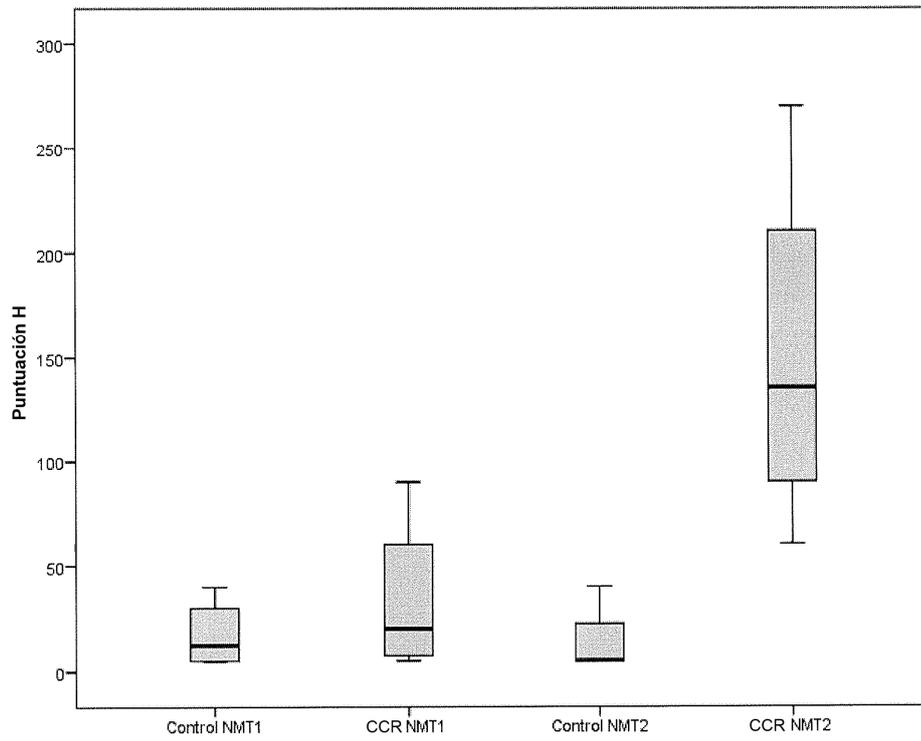


Figura 2

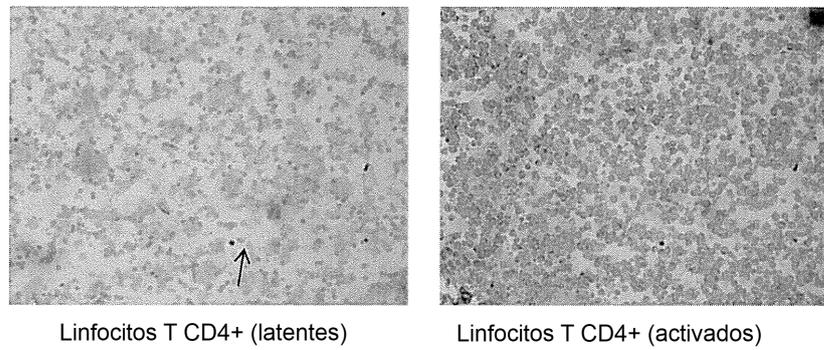


Figura 3

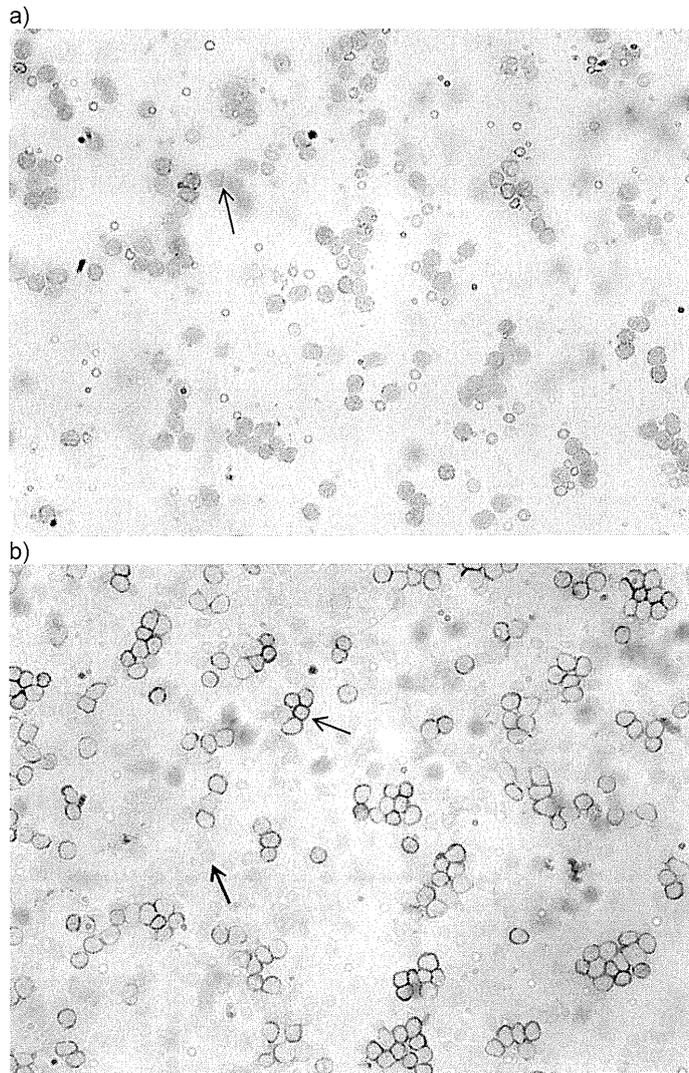


Figura 4

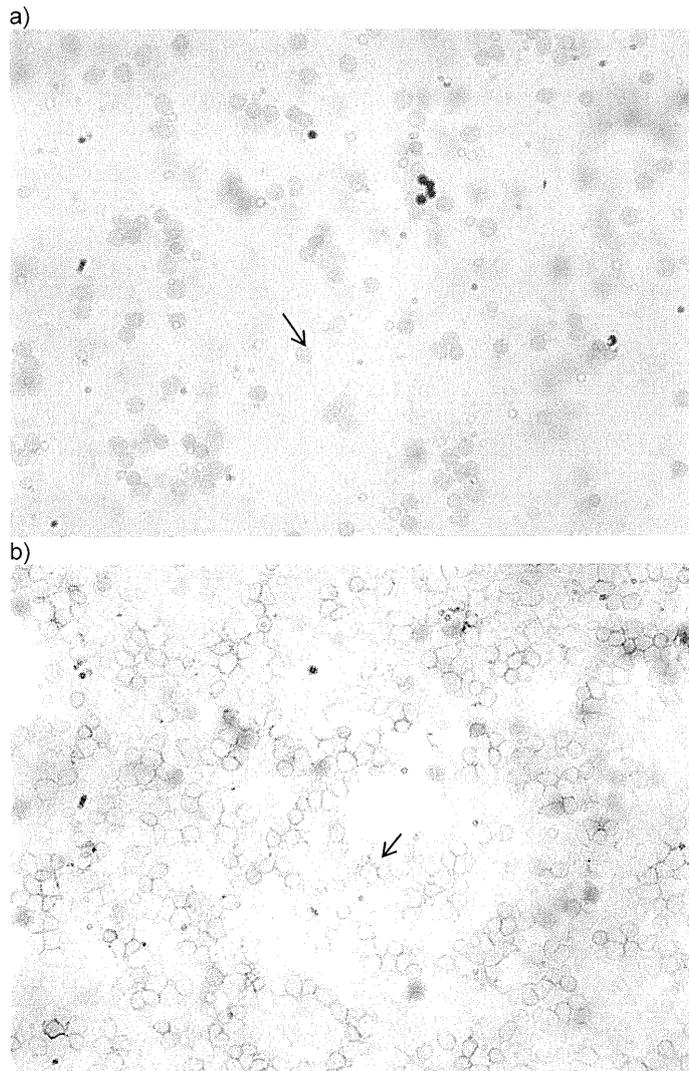


Figura 5

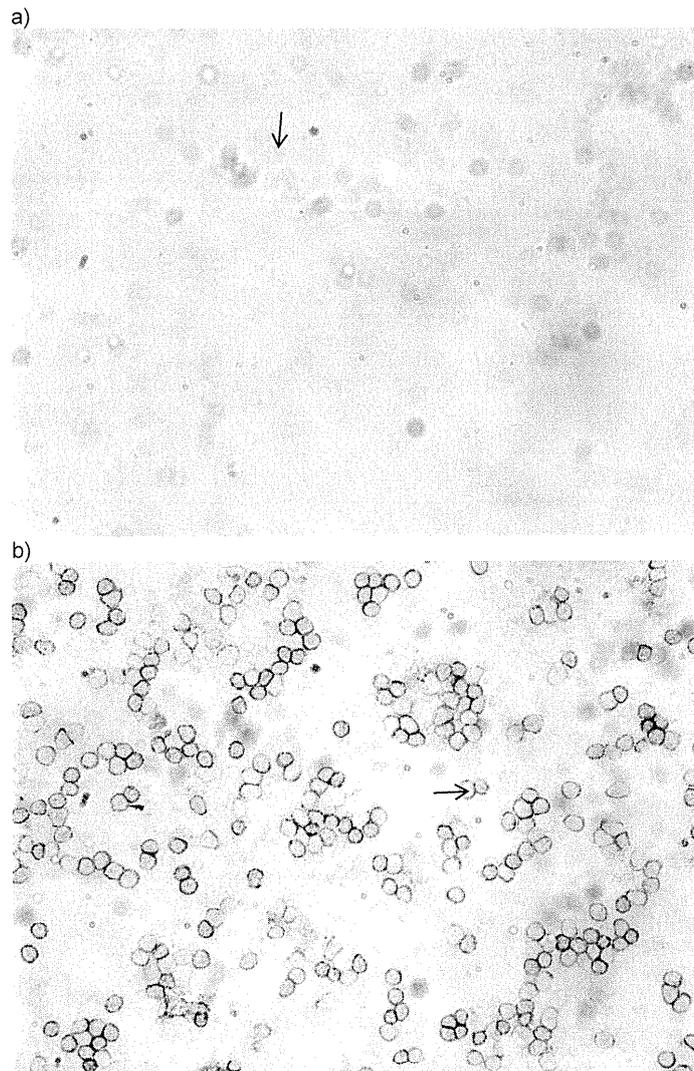
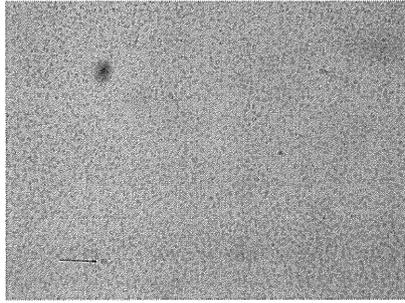
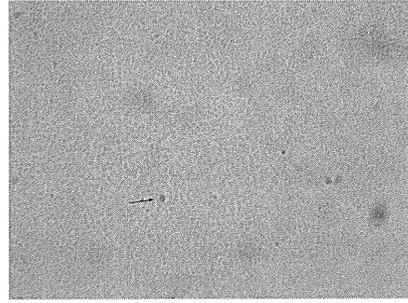


Figura 6

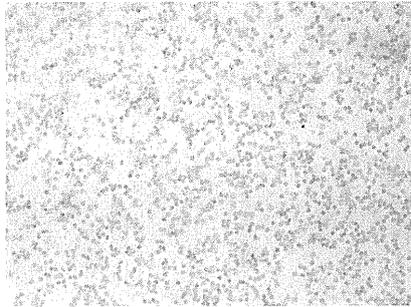


A

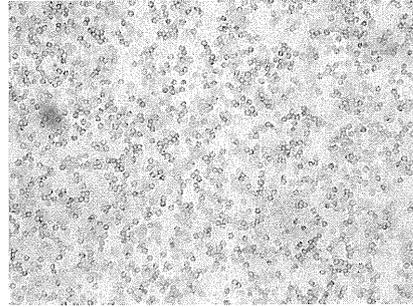


B

Figura 7



A



B

Figura 8

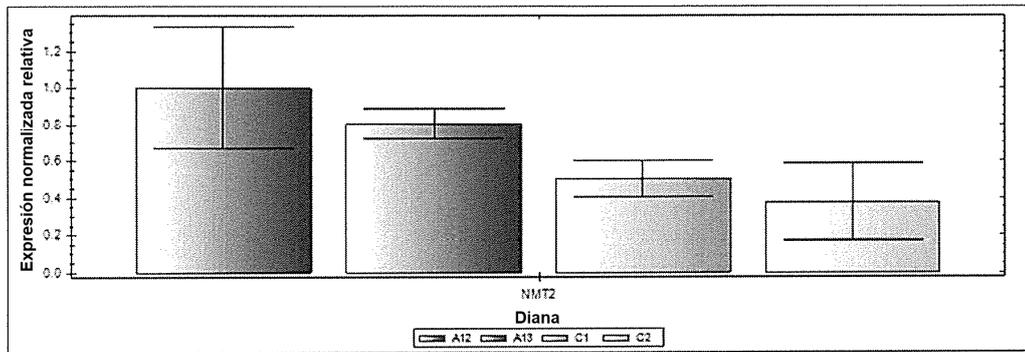


Figura 9