

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 056**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2015 PCT/CA2015/050432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15172249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2015 E 15793284 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3143406**

54 Título: **La sobreexpresión de la metionina aminopeptidasa en la sangre periférica y las células mononucleares de la sangre periférica son un marcador para la detección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

13.05.2014 US 201461992554 P

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

15.04.2019

73 Titular/es:

**VASTCON (100.0%)
23 Edington Cove
Winnipeg, Manitoba R3Y 0A2, CA**

72 Inventor/es:

**SHRIVASTAV, SHAILLY y
SHRIVASTAV, ANURAAG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 056 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

La sobreexpresión de la metionina aminopeptidasa en la sangre periférica y las células mononucleares de la sangre periférica son un marcador para la detección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer colorrectal

Información de la solicitud previa

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU., presentada el 29 de abril de 2009, número 61/173.842, titulada "La sobreexpresión de metionina aminopeptidasa en la sangre periférica y células mononucleares de la sangre periférica es un marcador para la detección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer colorrectal".

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de muerte por cáncer en Canadá [1]. El CCR surge lentamente de pólipos adenomatosos pre-malignos. Dado que el cáncer se desarrolla lentamente, hay un período silente sustancial durante el cual se puede detectar este o su lesión precursora (pólipos adenomatosos). Esto permite el tratamiento en las fases pre-malignas y malignas tempranas. Más del 90% de los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal localizado sobreviven más de cinco años. Sin embargo, la mayoría de los casos de CCR todavía se diagnostican en una fase avanzada [2, 3]. Aun cuando el CCR es el tercer cáncer de más fatalidad, hay un 90% de probabilidades de supervivencia si se trata en una fase temprana. A pesar de esto, más de 600.000 personas en todo el mundo mueren cada año de CCR [4]. Estos datos indican que hay una urgente necesidad insatisfecha de un procedimiento de detección confiable para la detección temprana del CCR que pueda implementarse fácilmente como un procedimiento de cribado del CCR basado en la población.

- 20 Estrategias de cribado disponibles

- La detección por cribado es la identificación de las personas que están en riesgo de desarrollar CCR antes del desarrollo de los síntomas reales. Las pruebas de cribado más comunes para el CCR incluyen la prueba de sangre oculta en la materia fecal (FOBT), la inmuno prueba fecal (FIT), la sigmoidoscopia y la colonoscopia [5-7]. La tasa de cumplimiento u observancia de estas pruebas para el cribado está limitada debido a la baja sensibilidad o a la naturaleza invasiva de la prueba [8, 9]. Por ejemplo, aunque la FOBT es rentable y relativamente segura, la tasa de falsos positivos es elevada porque hay factores, como los medicamentos y la dieta, que pueden alterar los resultados. Para el cribado FOBT, los pacientes deben recoger una muestra de heces en casa y llevarla a un laboratorio para su análisis. El motivo de la baja observancia es la naturaleza desagradable de la recolección de muestras fecales. Por ejemplo, durante la primera ronda de cribado CRC en Manitoba, Canadá, la tasa de captación fue tan solo el 15% de la población diana entre los 50 y 75 años de edad, y en Ontario, Canadá, la captación fue del 29,3%, mientras que el 45,6% de la población objetivo se retrasó para la detección [10]. La sigmoidoscopia y la colonoscopia son costosas e invasivas, y los resultados y riesgos del procedimiento dependen de la experiencia del endoscopista [11].

- Un biomarcador ampliamente disponible, antígeno carcinoembrionario (Carcinoembryonic Antigen; CEA) tiene sensibilidad y especificidad limitadas [12, 13]. Es probable que una prueba de sangre sea más fácilmente aceptable que las pruebas de heces o endoscópicas en un procedimiento de cribado basado en la población. Los análisis de sangre rentables pueden identificar a los pacientes con alto riesgo de CCR y mejorar la observancia del paciente para procedimientos de diagnóstico más intensivos e invasivos.

Proteólisis y metionina aminopeptidasa (MetAP)

- 40 La proteólisis es una importante modificación proteica esencial para el normal funcionamiento de las células, y las alteraciones en la proteólisis han sido implicadas en varios cánceres. Los eventos de procesamiento más comunes de los polipéptidos naciales son modificaciones amino-terminales que se presentan en casi todas las proteínas. Las aminopeptidasas pertenecen a la familia de las metaloproteinasas y su función es eliminar los aminoácidos de los términos N de los péptidos o proteínas no bloqueados.

- La síntesis de proteínas comienza por un codón de inicio, que es metionina en eucariotas y formilmetionina en procariontas. Las metionina-aminopeptidasas (MetAP) catalizan la eliminación de la metionina del término N de proteínas recién sintetizadas [7]. La eliminación de metionina es esencial para otras modificaciones N-terminales como la acetilación y la miristoilación [14, 15]. En las personas, la MetAP existe en dos isoformas, MetAP1 y MetAP2, codificadas por los genes *MetAP1* y *MetAP2*, respectivamente. Ambas isoformas difieren entre sí estructuralmente en la especificidad del sustrato y el control de la expresión, y por tanto no son redundantes en su función. La MetAP1 se expresa de forma constitutiva, mientras que MetAP2 se asocia con la proliferación celular. La MetAP1 tiene un papel potencial en la división celular, ya que la inhibición de MetAP1 da como resultado la inducción de apoptosis en HeLa así como en líneas celulares HT-1080. Se ha identificado un nuevo subtipo de MetAP1, concretamente MetAP1D. Se ha demostrado que MetAP1D está sobreexpresada en pacientes con CCR y su inhibición produce una disminución del crecimiento celular [16, 17]. La MetAP2, aparte de poseer actividad catalítica de aminopeptidasa, tiene una función adicional como se demostró anteriormente por Gupta, et. al [18]. Concretamente, regula la traducción protegiendo la subunidad α del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF2 α) de la fosforilación [19]. La fosforilación de eIF2 α tiene como resultado una reducción de la iniciación de la traducción. La expresión de MetAP2 se correlaciona con el crecimiento

celular y las células que no se dividen no muestran los niveles de inmunodetección de esta proteína. Se ha demostrado que la MetAP2 está involucrada en el crecimiento de diferentes tipos de tumores [20]. La MetAP2 escinde la metionina del c-Src nascente, exponiendo así su residuo de glicina N-terminal para la miristoilación.

Se ha demostrado que la MetAP2 desempeña un papel crucial en la angiogénesis. La angiogénesis es de particular importancia ya que es necesaria para la progresión de tumores sólidos y cánceres. Varios laboratorios han demostrado que la inhibición de MetAP da como resultado la regresión del crecimiento tumoral y la angiogénesis [21, 22]. La MetAP2 ha sido identificada como diana molecular de agentes angiostáticos como la fumagalina y la ovalicina, que pueden unirse a MetAP2 e inhibir su actividad de aminopeptidasa [21, 23]. La MetAP2 está implicada como poseedora de un papel en el cáncer (Wang et al., 2008). Informes anteriores han demostrado la sobreexpresión de MetAP2 en el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata y hepatocarcinoma [24, 25]. Se dispone de cierta información sobre el papel de la MetAP2 en el cáncer según lo informado por Tucker et al., quienes han propuesto que la expresión ectópica de MetAP2 provoca la transformación celular y promueve la proliferación celular, ya que los inhibidores de MetAP2 podrían reducir la transformación celular [26]. Sin embargo, no se conoce la expresión de MetAP2 en células de respuesta inmunitaria de un huésped portador de tumores. Recientemente, los autores de la presente invención han descubierto que la isoforma NMT2 está sobreexpresada en las PBMCs de los pacientes de CCR. Como MetAP2, es un evento previo de miristoilación, por lo que el interés de los autores de la presente invención era estudiar el estado de MetAP2 en la sangre de pacientes de CCR. No hay informes sobre la intervención de MetAP2 en la sangre periférica, PBMC y células T de pacientes de CCR. Aquí se reporta por primera vez la presencia de MetAP2 en sangre periférica, PBMCs y células T. Este estudio indica que la MetAP2 se sobreexpresa en la sangre periférica y en las PBMCs de los pacientes de CCR en comparación con los controles sanos.

MetAP2 y CCR

Estudios previos han investigado la expresión de MetAP2 en tumores de pacientes de CCR utilizando la técnica IHC. También se ha publicado que la MetAP2 muestra tinción moderada en pólipos. Se cree que esta tinción revela que la MetAP2 está regulada al alza como parte de los eventos moleculares que tienen lugar durante la formación maligna de tejidos colónicos [15]. Tucker et al. usaron también la técnica IHC para estudiar la expresión de MetAP2 en adenocarcinomas de muestras de CCR [26]. Estas muestras mostraron una tinción entre moderada y fuerte para MetAP2. Un estudio publicado por Kanno et al. informó de una expresión más alta de MetAP2 en las células del centro germinal B y sus contrapartidas neoplásicas [27]. El centro germinal es el sitio donde los linfocitos B proliferan y experimentan una diferenciación terminal a través de la estimulación antigénica.

Compendio de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de cribado del cáncer colorrectal (CCR) como se especifica en la reivindicación 1.

El valor umbral puede corresponder a los niveles de MetAP2 para un individuo sano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Promedio de puntuación de IHC de ocho cánceres y siete sujetos de control teñidos para MetAP2. El promedio de puntuación IHC para las muestras de CCR fue $205 \pm 57,56$ y el promedio de puntuación de IHC para las muestras de control fue $8,57 \pm 3,78$. Las barras del gráfico presentan las desviaciones estándar de los datos.

Figura 2: Análisis inmunohistoquímico (IHC) de sangre periférica para el paciente de CCR ID0023. Las células PB se incubaron con anticuerpo anti-MetAP2 (tinción marrón positiva). Las flechas negras apuntan a los linfocitos teñidos positivamente, las flechas grises apuntan a los neutrófilos teñidos positivamente. (20X).

Figura 3: Análisis inmunohistoquímico de sangre periférica para el paciente de CCR ID0023. Las células PB se incubaron con anticuerpo anti-MetAP2. Las flechas negras apuntan a los linfocitos teñidos positivamente, las flechas grises apuntan a los neutrófilos teñidos positivamente. (40X).

Figura 4: Análisis inmunohistoquímico de sangre periférica para el sujeto sano de control ID0006. Las células PB se incubaron con anticuerpo anti-MetAP2. La flecha negra apunta a un linfocito teñido negativamente. (40X).

Figura 5: Análisis inmunohistoquímico de sangre periférica para el paciente de control ID0006. Las células PB se incubaron con anticuerpo anti-MetAP2. Este es un campo de visión diferente del sujeto de control ID0006 que se muestra en la figura 4. Las flechas grises apuntan a neutrófilos teñidos débilmente positivos. (40X).

Figura 6. Perfil de expresión del gen de metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2) en pacientes con CCR y sujetos sanos. La expresión del gen de MetAP2 en las células mononucleares de sangre periférica se determinó en pacientes de CCR (A17 y A19) y en sujetos sanos (C27 y C14) mediante la reacción en cadena

de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) utilizando cebadores PCR Prime validados de BioRad. Estos cebadores eran específicos para MetAP2. La expresión del gen de MetAP2 en pacientes de CCR es aproximadamente el doble en comparación con los sujetos sanos.

Descripción de las realizaciones preferidas

5 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

10 Los estudios anteriores de los autores de la presente invención indicaron que la NMT está sobreexpresada y es hiperactiva en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes de CCR. NMT existe como NMT1 y NMT2. Recientemente, los autores han demostrado que es la isoforma NMT2 la que se sobreexpresa en las PBMCs de los pacientes de CCR en comparación con los sujetos de control sanos. El interés de los autores era observar si esta sobreexpresión alterada de NMT2 en PBMCs de pacientes de CCR se asocia también con alteraciones en la expresión de MetAP2, ya que es un objetivo previo de NMT2. El objetivo de los inventores fue estudiar la expresión de MetAP2 en sangre periférica y PBMC de pacientes de CCR, y si puede servir como marcador para la detección, el diagnóstico o el pronóstico de CCR.

20 Para estudiar el nivel de MetAP2 en PBMC de pacientes de CCR, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-MetAP2 validado (disponible de Santa Cruz Biotechnology, Inc, EE. UU.) para determinar el perfil de expresión de MetAP2. Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (IHC) para determinar la expresión de MetAP2 en los frotis de sangre periférica de los pacientes de CCR. El análisis IHC no solo proporciona información sobre la expresión de MetAP2 sino también sobre la localización de MetAP2 en varias células en el frotis de sangre. Se asignó la puntuación IHC o la puntuación H al nivel de expresión de MetAP2 en los frotis de sangre periférica de pacientes de CCR y se compararon con frotis de sangre de sujetos de control sanos. La puntuación de IHC se calculó como el producto de la intensidad (en una escala de 0 a 3) por el porcentaje de células positivas (0-100%), dando por tanto un mínimo de IHC = 0 y un máximo de IHC = 300. El presente estudio revela la sobreexpresión de MetAP2 en tejido no tumoral, tal como sangre periférica, PBMC, neutrófilos y linfocitos de pacientes de CCR en comparación con sujetos sanos. Por consiguiente, puede servir como biomarcador para el cribado, el diagnóstico y el pronóstico del CCR, como se discute en el presente texto.

30 Se han realizado estudios anteriores utilizando la técnica IHC para evaluar la expresión de MetAP2 en tejidos de tumores de CCR. La MetAP2 muestra una tinción moderada en los pólipos de pacientes de CCR, lo que indica el hecho de que la MetAP2 está regulada al alza como parte de los eventos moleculares que tienen lugar durante la formación maligna de tejidos colónicos [15]. Tucker et al. [26] usaron también la técnica IHC para determinar la expresión de MetAP2 en adenocarcinomas de muestras de tumores colorrectales y su estudio mostró una tinción entre moderada y fuerte para MetAP2.

35 El presente estudio es la primera investigación que muestra la sobreexpresión de MetAP2 en la sangre periférica, neutrófilos, PBMC y linfocitos de pacientes de CCR.

También se investigó el tipo de células dentro de las células de la sangre periférica que mostraron un patrón de tinción intensa. Los resultados indican que MetAP2 mostró una tinción positiva en linfocitos y neutrófilos de sangre periférica de pacientes de CCR. En este estudio se cuantifica la expresión de MetAP2 proporcionando puntuaciones IHC, como se discute en el presente texto.

40 Como apreciará un experto en la técnica, es sorprendente la sobreexpresión de MetAP2 en sangre periférica y PBMC de pacientes de CCR. La sobreexpresión de MetAP2 en tejido no tumoral, como sangre periférica o células de respuesta inmunitaria, como PBMC, neutrófilos y linfocitos, establece su papel potencial en el inicio y la progresión del CCR. Aunque no se desea la vinculación con ninguna teoría o hipótesis en particular, se observa que, dado el hecho de que las PBMC consisten generalmente en ~70% de células T, es posible que la sobreexpresión de MetAP2 en una elevada proporción de PBMC de los pacientes de CCR implique la sobreexpresión de esta enzima en un gran número de células T de especificidades antigénicas potencialmente diversas en vez de solo en aquellas específicas para el CCR. La sobreexpresión de MetAP2 exclusivamente en células T específicas de CCR expandidas clonalmente y dirigidas por CCR puede no ser un escenario favorable, aunque en la actualidad no se puede descartar esta posibilidad.

50 De acuerdo con la invención, se proporciona un método de cribado del cáncer colorrectal (CCR) como se especifica en la reivindicación 1.

Por ejemplo, el individuo puede someterse a una prueba de detección de CCR adicional o puede tener pruebas adicionales para confirmar que el individuo tiene CCR.

55 De acuerdo con lo que se especifica en la reivindicación 1 de la presente invención, se proporciona un método de cribado del cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

detectar niveles de metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2) en una muestra no tumoral de un individuo en

riesgo de desarrollar CCR o en riesgo de tener CCR; y

determinar si los niveles de MetAP2 están por encima de un valor umbral,

en donde los niveles de MetAP2 por encima del valor umbral indican que el individuo tiene CCR.

5 En algunas realizaciones, el valor umbral corresponde a los niveles de MetAP2 para un individuo sano. Como apreciará un experto en la técnica, este nivel de control no necesita ser determinado o repetido cada vez.

Un individuo en riesgo de desarrollar cáncer colorrectal puede ser cualquier individuo mayor de 50 años de edad y/o puede ser un individuo que tiene un historial familiar de cáncer colorrectal o que se considera que tiene una alta probabilidad de desarrollar la enfermedad.

10 Como apreciará un experto en la técnica, este método puede usarse para detectar individuos que tienen niveles de MetAP2 por encima de un nivel umbral y que en consecuencia deben examinarse con otros procedimientos rigurosos en relación con el cáncer colorrectal. Sin embargo, el método puede también utilizarse para diagnosticar o identificar individuos con cáncer colorrectal basándose en los niveles de MetAP2 en su muestra de sangre periférica o células mononucleares de sangre periférica.

15 Del mismo modo, el método puede usarse para el pronóstico del cáncer colorrectal por cuanto esos niveles de MetAP2 particularmente altos pueden indicar un estadiaje del cáncer particularmente agresivo.

20 Como apreciará un experto en la técnica, la capacidad de cribar muestras de sangre periférica en busca de cáncer colorrectal representa una mejora significativa con respecto a la técnica anterior que, como se ha explicado anteriormente, tiene un bajo nivel de cumplimiento. Específicamente, la capacidad de analizar muestras de sangre periférica significa que las personas podrían someterse a una prueba de detección de cáncer colorrectal durante un análisis de sangre de rutina o anual para el colesterol, la diabetes y otras enfermedades.

25 La identificación de biomarcadores en la sangre para el cribado en individuos con o en riesgo de desarrollar CCR es atractiva, ya que no solo aumentaría el cumplimiento, sino que también reduciría el posible deterioro del estilo de vida después del diagnóstico. Como se discutió anteriormente, la MetAP2 se ha estudiado y se ha identificado en tejidos de tumores sólidos; sin embargo, no hay informes previos sobre la presencia de MetAP2 en la sangre humana. Un informe sobre el papel esencial de MetAP2 en la hematopoyesis se ha demostrado en el modelo de pez cebra [28]; sin embargo, no hay estudios previos que informen sobre MetAP2 en células sanguíneas humanas o en cualquiera de los precursores de células sanguíneas o sus linajes. Este es el primer informe que demuestra la presencia de MetAP2 en sangre periférica, PBMCs, neutrófilos y linfocitos humanos (específicamente linfocitos T).

30 La MetAP2 también ha demostrado ser requerida para la iniciación y proliferación de células madre hematopoyéticas [28]. Los autores demostraron que la actividad de MetAP2 podría reducir significativamente la hematopoyesis definitiva y la angiogénesis alterada en el desarrollo del pez cebra usando el tratamiento con fumagilina y la desactivación del gen morfolino. El estudio encontró también que estos tratamientos reducían los niveles de MetAP2 en la actividad de las células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) en las células CD34⁺ enriquecidas, lo que sugiere un papel esencial de MetAP2 en la hematopoyesis. A partir de estas observaciones, se puede concluir que la MetAP2 puede desempeñar un papel autónomo de la célula en el mantenimiento de la actividad de las HSPC. La sobreexpresión de MetAP2 en las células sanguíneas puede indicar que la actividad/expresión de MetAP2 en las células hematopoyéticas se altera en CCR y es reflectiva en sangre periférica y/o PBMC. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la alteración en la actividad/expresión de MetAP2 en las HSPCs sea responsable del desarrollo y/o la progresión de CCR.

40 Estudios anteriores han investigado la relación entre NMT y MetAP2 en líneas de células de cáncer de colon humano. Selvakumar et al [24] observaron un elevado nivel de NMT y MetAP en Colo320, Colo201 y Colo205. La expresión y la actividad de la enzima variaron con la densidad celular (confluencia de células o número de células en la placa de cultivo). Para NMT y MetAP, se observó una mayor actividad y expresión enzimática a baja densidad celular (10%), mientras que el nivel de expresión de Src se redujo en gran medida en células a baja densidad. Los resultados se interpretaron como una indicación de que la regulación al alza de NMT y MetAP como parte de las fases iniciales de los eventos moleculares que tienen lugar durante la sobreproducción de oncoproteínas.

45 No hay informes sobre la expresión de MetAP2 en la sangre. El estudio de los autores de la presente invención muestra que la expresión de MetAP2 en sangre puede servir como un nuevo marcador molecular potencial para el cribado de CCR en forma de análisis de sangre. La prueba de sangre para la detección de CCR también aumentaría las tasas de cumplimiento en comparación con las pruebas no específicas existentes.

50 Las PBMC de muestras de sangre periférica de ocho pacientes de cáncer y siete individuos sanos se tiñeron para MetAP2. Los resultados se tabulan en la Tabla 1 y en la Tabla 2, respectivamente. Los diferentes tipos de células dentro de las PBMCs, tales como los linfocitos y los monocitos, no se puntuaron de forma diferencial, estas puntuaciones solo representan un promedio de todas las PBMC así como de los neutrófilos.

55 Se realizó una prueba t de muestra independiente en las puntuaciones IHC de la sangre de muestras de pacientes de

CCR y pacientes testigo. Se observó una diferencia significativa en las puntuaciones IHC para el paciente de CCR (media = 205, desviación estándar = 57,56983) y controles sanos (media = 8,57, desviación estándar = 3,78); $t = 6,27 \times 10^{-7}$, $p < 0,001$. La puntuación IHC de MetAP2 en las muestras de sangre de pacientes de CCR mostró una expresión 24 veces mayor que la del control sano.

- 5 Aunque anteriormente se han descrito las realizaciones preferidas de la invención, se reconocerá y se entenderá que se pueden realizar varias modificaciones en ellas, y las reivindicaciones adjuntas pretenden cubrir todas estas modificaciones que puedan caer dentro del espíritu y el alcance de la invención.

Tabla 1: Sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal teñida para MetAP2. Los valores representan la puntuación para el porcentaje de células teñidas positivamente (0 - 100%), la intensidad de la tinción positiva (0 - 3) y la puntuación IHC (% de células positivas x intensidad).

| ID del paciente | Tipo de célula | Anticuerpo | Intensidad | Porcentaje | Puntuación IHC |
|-----------------|----------------|------------|------------|------------|----------------|
| ID0017 | PB | MetAP2 | 3 | 90 | 270 |
| ID0019 | PB | MetAP2 | 3 | 70 | 210 |
| ID0020 | PB | MetAP2 | 2 | 75 | 150 |
| ID0021 | PB | MetAP2 | 3 | 90 | 270 |
| ID0023 | PB | MetAP2 | 3 | 90 | 270 |
| ID0024 | PB | MetAP2 | 3 | 80 | 160 |
| CCR-BCB00266116 | PB | MetAP2 | 2 | 70 | 140 |
| ID0014 | PB | MetAP2 | 2 | 85 | 170 |

Tabla 2: Sangre periférica sana de control teñida para MetAP2. Los valores representan la puntuación para el porcentaje de células teñidas positivamente (0 - 100%), la intensidad de la tinción positiva (0 - 3) y la puntuación IHC (% de células positivas x intensidad).

| ID del paciente | Tipo de célula | Anticuerpo | Intensidad | Porcentaje | Puntuación IHC |
|-----------------|----------------|------------|------------|------------|----------------|
| ID0006 | PB | MetAP2 | 1 | 5 | 5 |
| ID0008 | PB | MetAP2 | 1 | 10 | 10 |
| ID0009 | PB | MetAP2 | 1 | 15 | 15 |
| ID0010 | PB | MetAP2 | 1 | 10 | 10 |
| ID0012 | PB | MetAP2 | 1 | 5 | 5 |
| UWAS1 | PB | MetAP2 | 1 | 10 | 10 |
| UWAS2 | PB | MetAP2 | 1 | 5 | 5 |

Referencias

1. **Canadian Cancer Society's Steering Committee on Statistics. Canadian Cancer Statistics 2012.** 2012.
2. Manitoba CC: **Cancer in Manitoba: Incidence and Mortality Annual Stastical Report 2004:**1-67.
3. Anonymous: **Population screening for colorectal cancer.** *Drug and Therapeutics Bulletin* 2006, **44**:65-68.
4. **Canadian Cancer Society's Steering Committee. 2010. Canadian Cancer Statistics 2010.** 2010:1-127.
5. **Colorectal cancer screening. Recommendation statement from the Canadian Task Force on Preventive Health Care.** *CMAJ* 2001, **165**(2):206-208.
6. **Colorectal cancer screening. Recommendation statement from the Canadian task force on preventive health care.** *Can Fam Physician* 2001, **47**:1811-1813, 1815.
7. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D *et al*: **Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence.** *Gastroenterology* 2003, **124**(2):544-560.
8. Moayyedi P: **Colorectal cancer screening lacks evidence of benefit.** *Cleve Clin J Med* 2007, **74**(8):545, 549-550, 552 passim.
9. Nicholson FB, Barro JL, Atkin W, Lilford R, Patnick J, Williams CB, Pignone M, Steele R, Kamm MA: **Review article: Population screening for colorectal cancer.** *Aliment Pharmacol Ther* 2005, **22**(11-12):1069-1077.
10. Rabeneck L, Tinmouth JM, Paszat LF, Baxter NN, Marrett LD, Ruco A, Lewis N, Gao J: **Ontario's ColonCancerCheck: Results from Canada's First Province-Wide Colorectal Cancer Screening Program.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014, **23**(3):508-515.
11. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L: **Association of colonoscopy and death from colorectal cancer.** *Ann Intern Med* 2009, **150**(1):1-8.
12. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O: **Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines.** *Eur J Cancer* 2003, **39**(6):718-727.
13. Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE: **Noninvasive testing for colorectal cancer: a review.** *Am J Gastroenterol* 2005, **100**(6):1393-1403.
14. Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Shrivastav A, Das SB, Dimmock JR, Sharma RK: **Potential role of N-myristoyltransferase in cancer.** *Prog Lipid Res* 2007, **46**(1):1-36.
15. Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Dimmock JR, Sharma RK: **Methionine aminopeptidase 2 and cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1765**(2):148-154.

16. Mauriz JL, Martin-Renedo J, Garcia-Palomo A, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J: **Methionine aminopeptidases as potential targets for treatment of gastrointestinal cancers and other tumours.** *Curr Drug Targets* 2010, **11**(11):1439-1457.
17. Leszczyniecka M, Bhatia U, Cueto M, Nirmala NR, Towbin H, Vattay A, Wang B, Zabludoff S, Phillips PE: **MAP1D, a novel methionine aminopeptidase family member is overexpressed in colon cancer.** *Oncogene* 2006, **25**(24):3471-3478.
18. Datta B, Chakrabarti D, Roy AL, Gupta NK: **Roles of a 67-kDa polypeptide in reversal of protein synthesis inhibition in heme-deficient reticulocyte lysate.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**(10):3324-3328.
19. Ray MK, Datta B, Chakraborty A, Chattopadhyay A, Meza-Keuthen S, Gupta NK: **The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(2):539-543.
20. Boxem M, Tsai CW, Zhang Y, Saito RM, Liu JO: **The C. elegans methionine aminopeptidase 2 analog map-2 is required for germ cell proliferation.** *FEBS Lett* 2004, **576**(1-2):245-250.
21. Griffith EC, Su Z, Turk BE, Chen S, Chang YH, Wu Z, Biemann K, Liu JO: **Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin.** *Chem Biol* 1997, **4**(6):461-471.
22. Chun E, Han CK, Yoon JH, Sim TB, Kim YK, Lee KY: **Novel inhibitors targeted to methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) strongly inhibit the growth of cancers in xenografted nude model.** *Int J Cancer* 2005, **114**(1):124-130.
23. Sin N, Meng L, Wang MQ, Wen JJ, Bornmann WG, Crews CM: **The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(12):6099-6103.
24. Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Lawman Z, Bonham K, Dimmock JR, Sharma RK: **Expression of methionine aminopeptidase 2, N-myristoyltransferase, and N-myristoyltransferase inhibitor protein 71 in HT29.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322**(3):1012-1017.
25. Sheen IS, Jeng KS, Jeng WJ, Jeng CJ, Wang YC, Gu SL, Tseng SY, Chu CM, Lin CH, Chang KM: **Fumagillin treatment of hepatocellular carcinoma in rats: an in vivo study of antiangiogenesis.** *World J Gastroenterol* 2005, **11**(6):771-777.
26. Tucker LA, Zhang Q, Sheppard GS, Lou P, Jiang F, McKeegan E, Lesniewski R, Davidsen SK, Bell RL, Wang J: **Ectopic expression of methionine aminopeptidase-2 causes cell transformation and stimulates proliferation.** *Oncogene* 2008, **27**(28):3967-3976.
27. Kanno T, Endo, H., Takeuchi, K., Morishita, Y., Fukayama, M., Mori, S.: **High expression of methionine aminopeptidase type 2 in germinal center B cells and their neoplastic counterparts.** *Laboratory Investigation* 2002, **82**:893-901.
28. Ma AC, Fung TK, Lin RH, Chung MI, Yang D, Ekker SC, Leung AY: **Methionine aminopeptidase 2 is required for HSC initiation and proliferation.** *Blood* 2011, **118**(20):5448-5457.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado para el cáncer colorrectal (CCR) que comprende:

5 detectar niveles de metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2) en una muestra no tumoral de un individuo en riesgo de desarrollar CCR, siendo elegida dicha muestra no tumoral entre el grupo consistente en sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), neutrófilos y linfocitos; y

 determinar si los niveles de MetAP2 están por encima de un valor umbral,

 en donde los niveles de MetAP2 por encima del valor umbral indican que el individuo es examinado para CCR.

10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el valor umbral corresponde a niveles de MetAP2 para un individuo sano.

3. El método según la reivindicación 1, donde los niveles de MetAP2 por encima del valor umbral indican que el individuo tiene CCR.

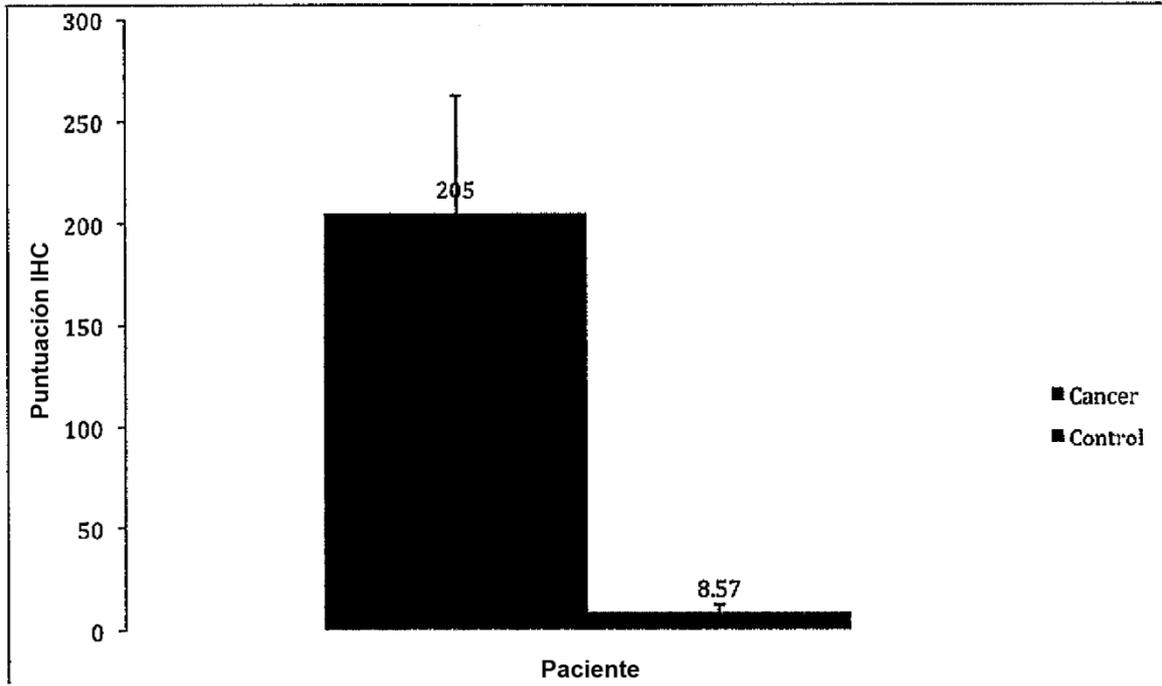


Figura 1

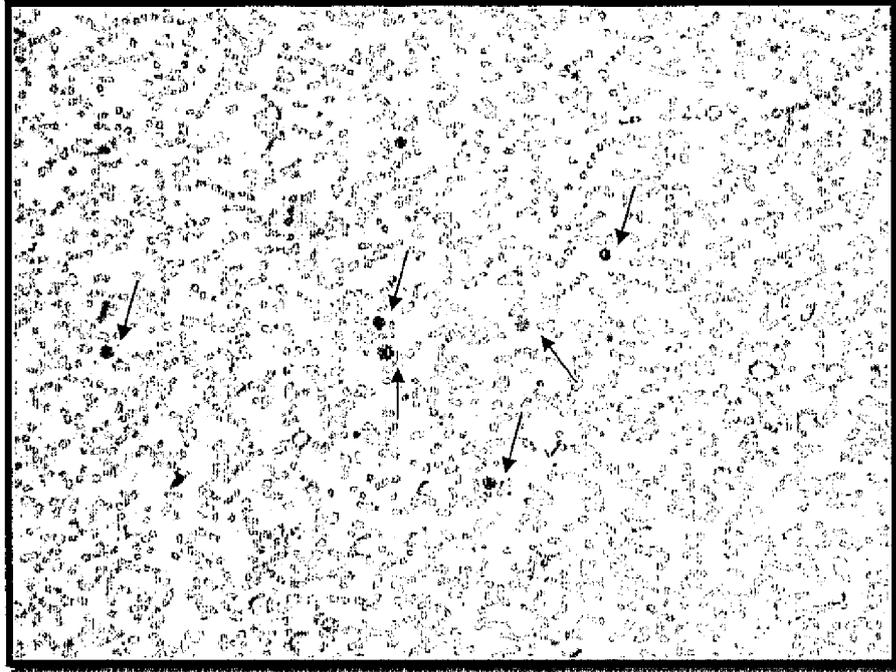


Figura 2

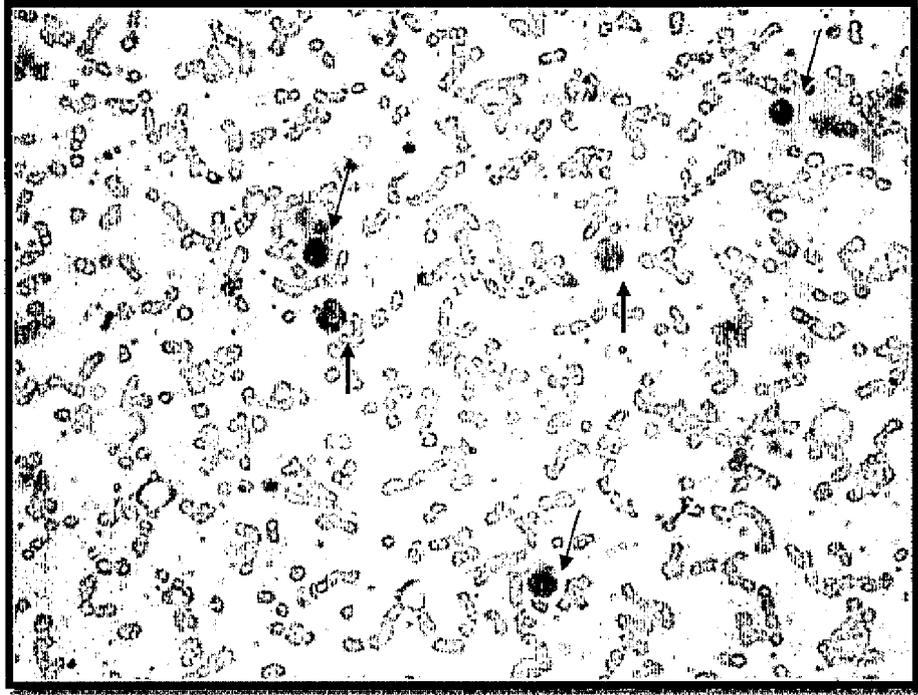


Figura 3:

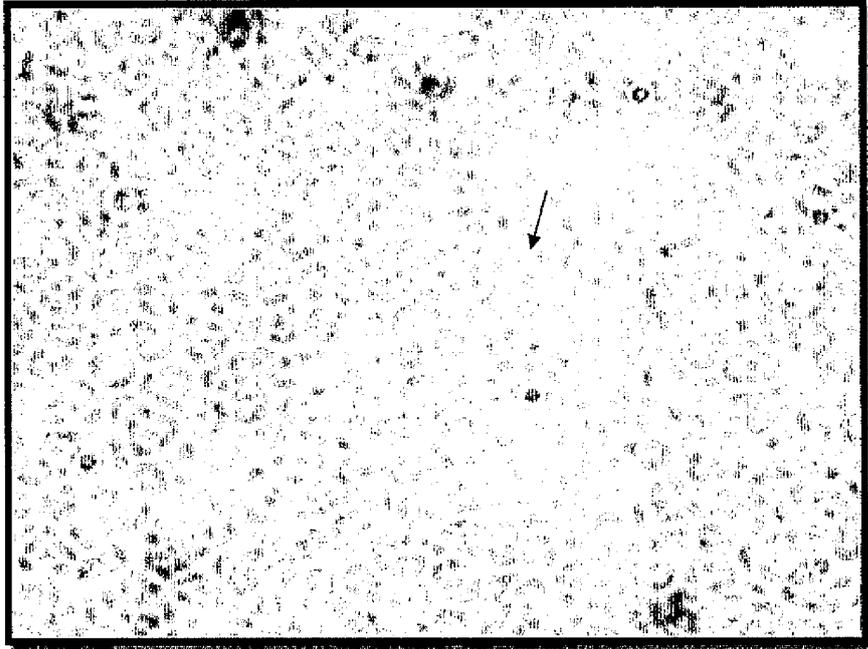


Figura 4:

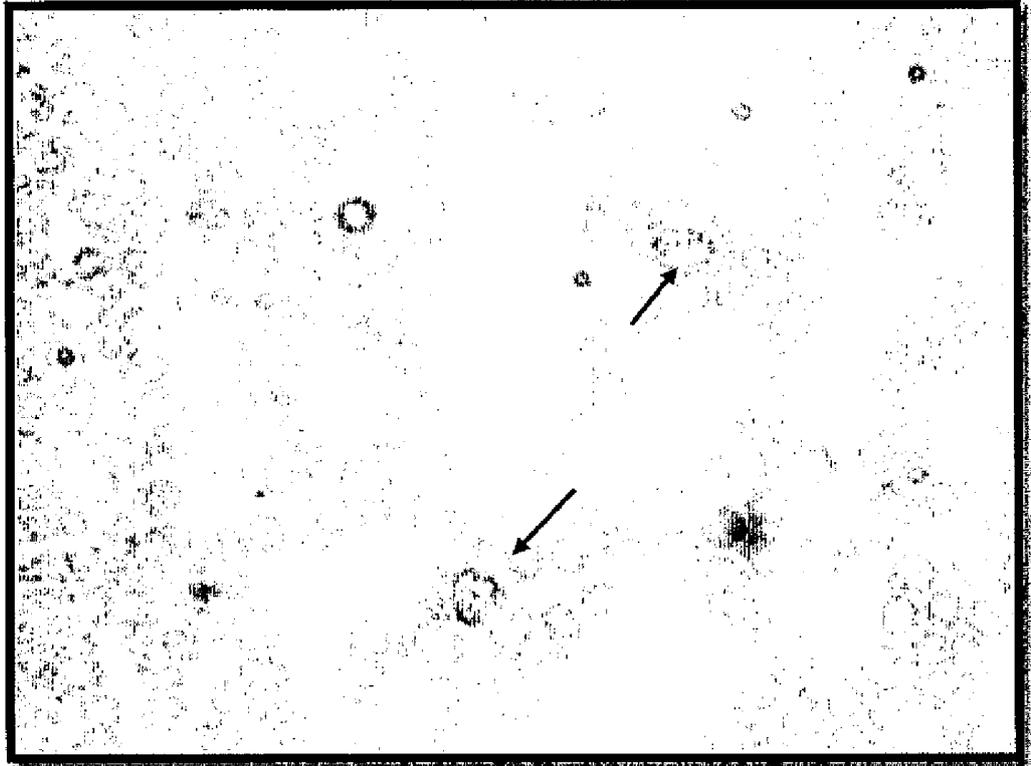


Figura 5:

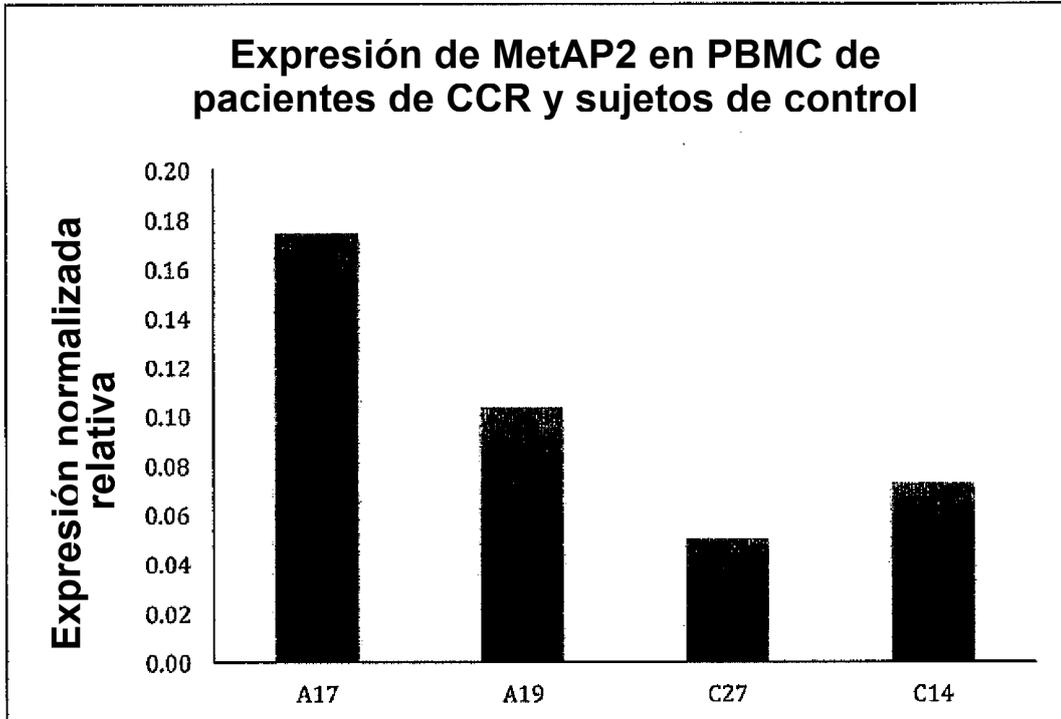


Figura 6: