



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 496**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06723195 .1**
96 Fecha de presentación : **03.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1856537**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Procedimiento de comprobación y control del proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos/ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en el organismo de mamíferos.**

30 Prioridad: **07.03.2005 EP 05004930**
17.06.2005 EP 05013170

73 Titular/es: **Johannes Coy**
Krötengasse 10
64853 Otzberg, DE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.09.2011

72 Inventor/es: **Coy, Johannes**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.09.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 496 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

Procedimiento de comprobación y control del proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos/ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en el organismo de mamíferos.

5 Se divulga un procedimiento para la detección cualitativa y cuantitativa del proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos o ruta metabólica de fermentación aerobia de glucosa, respectivamente, en un individuo mamífero (paciente, organismo de mamíferos).

10 La divulgación se basa en el nuevo descubrimiento científico, de que (1) en el organismo de mamíferos - es decir en células de mamíferos- también existe una ruta del metabolismo, hasta ahora solo conocida en células procariotas (por ejemplo en *lactobacillus*), comprendiendo dicha ruta del metabolismo la degradación de glucosa en lactato con producción de energía, aunque exista y se encuentre biodisponible suficiente oxígeno (molecular) libre, es decir, existan condiciones aerobias y que (2) la enzima TKTL1 es la enzima indicadora de dicho nuevo metabolismo de fermentación de la glucosa.

15 En caso de falta de oxígeno, las células de mamíferos pueden degradar la glucosa en ácido láctico lo que conduce en última instancia a mialgias. Esta degradación anaerobia de la glucosa se realiza mediante la ruta de Embden-Meyerhof. En los años 1920 Otto Warburg descubrió que las células de mamíferos también podían degradar la glucosa en ácido láctico en presencia de suficientes cantidades de oxígeno disponibles, es decir, que las células de mamíferos podían fermentar la glucosa en ácido láctico incluso en presencia de suficientes cantidades de oxígeno libre biodisponible. Observó esta ruta de degradación anaerobia de glucosa en lactato en presencia de oxígeno en tejidos tumorales así como en determinados tejidos sanos como retina y testículos. Por razones históricas esta degradación de glucosa en lactato incluso en presencia de oxígeno se denomina glucólisis aerobia o efecto Warburg. Dado que el punto de inicio y fin (glucosa y lactato) es el mismo que el de la fermentación de glucosa en lactato en ausencia de oxígeno mediante la ruta de Embden-Meyerhof, la producción de lactato se ha interpretado como el resultado de la ruta de Embden-Meyerhof. Sin embargo, durante los experimentos que conducen a la presente invención resulta evidente que es la transcetolasa TKTL1 la que permite la degradación de la glucosa o la fermentación de la glucosa, respectivamente, en lactato incluso en presencia de oxígeno y que esta ruta de la glucosa es significativamente diferente a la de la ruta de Embden-Meyerhof.

20 El gen de transcetolasa TKTL1 se ha descubierto hace algunos años, concretamente en 1996 por Coy y col. (Genomics 32, 309-316). Debido a un codón de terminación en un exón de codificación previsto, se comentó el gen de transcetolasa TKTL1 como un pseudogen en las bases de datos de secuencias. A pesar de esto, en el año 2002 Coy demostró que el gen de TKTL1 codifica una transcetolasa enzimáticamente activa. La transcetolasa TKTL1 es filogenéticamente afín con las otras dos transcetolasas humanas conocidas TKT y TKTL2. Sin embargo, diferentes genes codifican las tres enzimas transcetolasas, de manera que para la TKT el gen se localiza en el cromosoma 3, para la TKTL2 el gen se localiza en el cromosoma 4 y para la TKTL1 el gen se localiza en la banda Xq28 del cromosoma X en seres humanos.

35 Una de las funciones más importantes de la enzima TKTL1 en células de mamífero es su función catalizadora durante la fermentación de glucosa en ácido láctico en presencia de oxígeno, es decir en condiciones aerobias. La TKTL1 es la enzima indicadora en la nueva ruta metabólica, denominada de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos descubierta recientemente en primer lugar o proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos, respectivamente. A continuación esta ruta recientemente descubierta recibe el nombre de ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa o de manera abreviada aGF-mam, respectivamente.

Los detalles de esta aGF-mam son los siguientes:

45 Un complejo de proteína que contiene TKTL1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) que permite una degradación no oxidativa de la glucosa. La transferencia de electrones no implica a las mitocondrias y permite la producción de ATP independiente de mitocondrias en células que expresan TKTL1. La aplicación de compuestos anti-TKTL1 o análogos inhibidores de tiamina o parabenzoquinonas (o derivados de benzoquinonas) puede aplicarse para la inhibición de dicha producción de ATP independiente de mitocondrias (en particular, por ejemplo, en tumores con un metabolismo de azúcar basado en TKTL1).

Usando la proteína TKTL1 humana el autor de la invención de la presente solicitud de patente confirmó la formación de gliceraldehído-3-fosfato en una reacción uni-sustrato usando X5P como única fuente de carbono.

50 El metabolismo de TKTL1 mediante X5P da como resultado la formación de acetil-CoA. La degradación anaerobia de la glucosa en condiciones aerobias conduce a lactato y a la acumulación de energía rica en el compuesto acetil-CoA. Después, el complejo piruvato deshidrogenasa, por ejemplo, se inhibe por acetil-CoA, y como consecuencia, el piruvato se reduce principalmente a lactato.

En las Figuras 13 y 14 se proporciona una descripción esquemática de la aGF-mam completa.

55 Los detalles en relación con la enzima indicadora TKTL1 de esta aGF-mam son los siguientes:

Durante los experimentos que conducen a la presente invención se identificaron diferentes isoformas de TKTL1 a nivel de proteína usando un nuevo anticuerpo monoclonal (Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim) que detecta específicamente la proteína TKTL1.

5 Las isoformas de la proteína TKTL1 son parte de un complejo multiproteína. Dentro de este complejo TKTL1 también se une a proteínas no relacionadas con transcetolasa como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), DNasaX (DNasa 1 - de tipo 1), Akt (= proteína quinasa B); histonas, histona deacetilasa, proteína precursora amiloidea y proteínas de unión a actina.

10 Las transcetolasas conocidas son homodímeros de dos proteínas de longitud completa que contienen todos los restos aminoacídicos de transcetolasa invariantes típicos. Las isoformas de la proteína TKTL1 codificadas por el gen de tipo transcetolasa constituyen homo/heterodímeros de TKTL1 y heterodímeros de TKT/TKTL1 o TKTL2/TKTL1. La expresión de isoformas de la proteína TKTL1 incluso una isoforma enzimáticamente no activa- ejerce influencia sobre la actividad enzimática de una proteína TKT o TKTL2 como parte de un heterodímero TKT/TKTL1 o TKTL2/TKTL1. Un cambio molecular y una conexión de protón sincronizan los sitios activos en homo- y heterodímeros de TKT/TKTL1, TKTL2/TKTL1 y TKTL1/TKTL1.

15 La demostración de que el gen de TKTL1 (mM_012253; Números de acceso: X91817; BC025382) codifica una proteína transcetolasa de longitud completa así como isoformas más pequeñas de la proteína tiene importantes implicaciones en la investigación fundamental y salud médica.

20 Además de sus funciones enzimáticas, las proteínas de TKTL1 muestran diversas funciones diferentes dependiendo de la localización de las proteínas en las células de mamíferos y de su estado de agregación. En células de mamíferos la proteína TKTL1 se localiza principalmente en el citoplasma, pero también aparece en el núcleo. Dentro del citoplasma la función principal de la TKTL1 es la catálisis de la reacción (trans)cetolasa. Otras funciones de las proteínas TKTL1 localizadas dentro del núcleo se asocian con el control del ciclo celular y la mitosis, con el control de la transcripción (del propio gen de TKTL1 y otros) y con la regulación de la apoptosis.

El documento EP 1 354 961 divulga el uso de TKTL1 como marcador para tumores.

25 Las proteínas TKTL1 (cuyas funciones dependen de su localización o del estado de agregación) se denominan proteínas "pluriempleadas", ya que ejecutan diferentes funciones dependiendo de la localización subcelular, del tipo de célula así como de su estado de agregación.

30 El objeto de la presente invención se basa en poner a disposición un procedimiento para una detección (y control) cualitativa y cuantitativa del grado (nivel) de uso y del flujo correcto del proceso (normal, natural) de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) en un individuo mamífero, es decir un procedimiento para controlar si este proceso de metabolismo/ruta se desarrolla realmente en las células investigadas del organismo mamífero apropiado, si se diera el caso en que grado y si se desarrolla "normal" o correcto, respectivamente o si se producen fallos o anomalías.

35 Este objeto se consigue con el uso de la enzima TKTL1 de acuerdo con la reivindicación 1. En otras palabras: el procedimiento para la detección cualitativa y cuantitativa del grado (nivel) de uso y el flujo correcto del proceso (normal, natural) de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos "aGF-mam" (o proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos) en un individuo (paciente) mamífero se caracteriza porque

- (a) la enzima TKTL1 se una como molécula indicadora y diana y
- (b) dicho método comprende las siguientes etapas:

- 40
- tomar (recoger, extraer) una muestra biológica de dicho individuo (paciente),
 - determinación de la actividad y/o concentración, y/o localización celular y/o estado de agregación y/o estado de dimerización de la proteína TKTL1 dentro de dicha muestra de dicho individuo (paciente) y dentro de una muestra de control,
 - comparar los datos determinados obtenidos de dicha muestra de dicho individuo (paciente) con los datos
- 45
- obtenidos de la muestra de control, y
 - tomar (i) un nivel potenciado o disminuido de actividad y/o concentración de la proteína TKTL1 en dicha muestra del individuo en comparación con la muestra de control como indicación de un grado (nivel) potenciado o disminuido, respectivamente, del uso de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos "aGF-mam",
- 50
- y (ii) una localización celular anómala y/o un estado de agregación anómalo y/o un estado de dimerización anómalo de la proteína TKTL1 en dicha muestra del individuo en comparación con la muestra de control como indicación de una ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos anómala (defectuosa, modificada, deficiente).

55 La detección (determinación) puede realizarse en solución o usando reactivos fijados a una fase sólida. La detección de uno o más marcadores moleculares, tales como polipéptidos o ácidos nucleicos, puede realizarse en una sola mezcla de reacción o en dos o en mezclas de reacción individuales. Como alternativa, las reacciones de detección

para diversas moléculas marcadoras pueden, por ejemplo, realizarse de manera simultánea en recipientes de reacción multipocillo. Los marcadores característicos para los productos del gen TKTL1 pueden detectarse usando reactivos que reconozcan específicamente estas moléculas. La reacción de detección para las moléculas marcadoras puede comprender una o más reacciones con agentes de detección que reconozcan las moléculas marcadoras iniciales o reconozcan las moléculas anteriores usadas para reconocer a otras moléculas.

La reacción de detección puede comprender adicionalmente una reacción indicadora que indique la presencia o ausencia y/o el nivel de los marcadores del gen TKTL1. La reacción indicadora puede ser, por ejemplo, una reacción que produzca un compuesto coloreado, una reacción bioluminiscente, una reacción fluorescente, generalmente una reacción que emita radiación, etc. En una realización preferida, agentes que producen diferentes señales indicadoras pueden reconocer moléculas marcadoras diferentes, de manera que puedan diferenciarse las señales que se refieren a moléculas marcadoras.

Los formatos aplicables para la reacción de detección, de acuerdo con la presente invención, pueden ser, técnicas de transferencia, tales como transferencia de Western, transferencia de Southern y transferencia de Northern. Los expertos habituales en la materia conocen las técnicas de transferencia y pueden realizarse, por ejemplo, como electrotransferencias, transferencias semisecas, transferencias al vacío o transferencias puntuales. Las reacciones de amplificación también pueden aplicarse para la detección, por ejemplo, de moléculas de ácido nucleico. Adicionalmente, para la detección de moléculas pueden aplicarse procedimientos inmunológicos, tales como, por ejemplo, ensayos de inmunoprecipitación o inmunológicos, tales como ELISA, RIA, ensayos de flujo lateral, procedimientos inmunocitoquímicos, etc..

Basándose en la información obtenida con este uso de la enzima de TKTL1 un médico facultativo puede extraer conclusiones con respecto al estado de salud del individuo apropiado (paciente) y, si fuera necesario, desarrollar programas para terapia.

Por lo tanto dicho uso de la enzima TKTL1 es adecuado y pretende controlar (detectar, supervisar y observar) el transcurso de enfermedades, asociadas con una aGF-mam aumentada o disminuida y/o anómala, es decir defectuosa/deficiente/modificada

La determinación de la actividad y/o concentración de TKTL1 puede comprender determinar el nivel de los productos génicos de TKTL1 o determinar la actividad enzimática de TKTL1 en una muestra.

El control puede comprender detectar el nivel de los productos génicos de TKTL1 o la actividad enzimática de TKTL1 en muestras tomadas en diferentes momentos y determinar los cambios en dicho nivel. De acuerdo con dichos cambios puede seguirse el transcurso de la enfermedad. El transcurso de la enfermedad puede usarse para seleccionar estrategias de terapia para el individuo particular.

Otro aspecto de la detección y control del transcurso de la enfermedad puede comprender la detección de enfermedad residual mínima. Esto puede comprender, por ejemplo, la detección de un nivel de los productos génicos de TKTL1 o de la actividad enzimática de TKTL1 en una o más muestras corporales después de la terapia inicial de un individuo una vez o a diversos momentos. De acuerdo con el nivel de productos génicos de TKTL1 detectado en las muestras puede seleccionarse una terapia adecuada para el individuo particular.

Basándose en el nivel determinado de productos génicos de TKTL1 o en la actividad enzimática determinada en las muestras, los individuos pueden subdividirse en subgrupos. Basándose en estos subgrupos pueden realizarse evaluaciones de pronóstico. De acuerdo con los subgrupos pueden adaptarse terapias para los individuos afectados por las diversas enfermedades. Por ejemplo la sobreexpresión del gen TKTL1 y una actividad potenciada del ciclo pentosa-fosfato sugiere un mecanismo mediante el cual la tiamina (vitamina B1) promueve la síntesis del ácido ribonucleico y un metabolismo de glucosa potenciado. Por lo tanto el consumo de tiamina tiene consecuencias directas en una enfermedad con una sobreexpresión del gen transcetolasa de tipo 1. Esto también proporciona información de fondo y ayuda a desarrollar directrices para tratamientos alternativos con inhibidores antitiamina transcetolasa en el entorno clínico. El análisis de ribosa de ARN indica que los carbonos de la glucosa contribuyen en más de un 90% a la síntesis de ribosa en células cultivadas de carcinoma de cuello de útero y pancreático y que la ribosa se sintetiza principalmente a través de la ruta de transcetolasa dependiente de tiamina (> 70%). Los compuestos antitiamina inhiben significativamente la síntesis de ácidos nucleicos. El tratamiento con tiamina o benzotiamina activa TKTL1 y por lo tanto el metabolismo del azúcar y reduce reacciones tóxicas o no deseadas (por ejemplo la formación de AGE, glioxal).

Dicho uso de la enzima TKTL1 es adicionalmente adecuado para realizar una formación de imágenes molecular *in vivo* o *in vitro* de manera que es posible identificar enfermedades asociadas con una aGF-mam aumentada o disminuida o anómala, es decir, defectuosa, en una etapa muy temprana, en el mejor de los casos antes de la aparición de los síntomas típicamente conocidos de esa enfermedad. En consecuencia el individuo o su médico podrán prescribir la enfermedad en un momento muy precoz aumentando por lo tanto significativamente los cambios de sanación.

La formación de imágenes molecular difiere de las técnicas convencionales porque esta identifica productos génicos específicos y procesos intracelulares como reacciones enzimáticas específicas. La especificidad del sustrato

modificado y el modo de reacción de la enzima TKTL1 puede usarse para la detección de células o tejidos con una actividad enzimática de TKTL1 potenciada o reducida. La especificidad del sustrato modificado y el modo de reacción de la enzima TKTL1 permite la diferenciación entre la actividad enzimática de tres enzimas (de tipo) transcetolasa permitiendo por lo tanto la medición de la actividad enzimática de TKTL1 *in vivo*. La actividad enzimática puede detectarse, por ejemplo, por formación de imágenes por tomografía de emisión de positrones, por quimioluminiscencia o por radiografía.

La muestra biológica del individuo puede obtenerse casi de cada muestra de tejido o de fluido procedente de dicho individuo. También son muestras adecuadas las células aisladas, las células sometidas a lisis, los residuos de células, los péptidos o los ácidos nucleicos de dichos individuos. Otras muestras adecuadas son, por ejemplo, preparaciones de biopsia, fluidos corporales, secreciones, un frotis, suero, orina, semen, heces, bilis, células que contienen un fluido.

La etapa de determinación del uso de la invención puede realizarse a nivel de la proteína, es decir, con la proteína TKTL1 como diana. Preferentemente la determinación se realiza usando una molécula que se una específicamente a la proteína TKTL1.

Preferentemente dicha molécula es un anticuerpo dirigido contra TKTL1 o un fragmento de dicho anticuerpo anti-TKTL1 o un peptidomimético que comprenda un epítipo de unión a antígeno o un mini-anticuerpo.

Las moléculas diana adecuadas son la propia proteína TKTL1 o un fragmento de la misma o una proteína de fusión que comprenda la proteína TKTL1.

La determinación a nivel de la proteína, es decir de los productos génicos de TKTL1, puede realizarse, por ejemplo, en una reacción que comprenda un anticuerpo específico para la detección de la proteína TKTL1. Los anticuerpos pueden usarse en muchas técnicas de detección diferentes, por ejemplo, en transferencias de Western, ELISA o inmunoprecipitación. Generalmente la detección basada en anticuerpos puede realizarse *in vitro* así como directamente *in situ* por ejemplo durante una reacción de tinción inmunohistoquímica. Para determinar la cantidad de polipéptidos en particular en muestras biológicas también puede usarse cualquier otro procedimiento.

Para la detección del producto génico de TKTL1, el reactivo puede incluir cualquier agente que pueda unirse a la molécula de proteína TKTL1. Dichos reactivos pueden incluir proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, glicoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos o lípidos.

Los productos génicos de TKTL1, como se usa en el contexto de la presente invención, pueden comprender polipéptidos y ácidos nucleicos codificados por el gen transcetolasa de tipo 1. Para realizar el procedimiento, los polipéptidos y polinucleótidos (véase TKTL1, TKR: NM_012253; números de acceso: X91817; BC025382) usados se aíslan. Esto significa que las moléculas se retiran de su entorno original. Las proteínas de origen natural se aíslan si se separan de alguno o de todos los materiales con los que coexisten en el entorno natural. Los polinucleótidos se aíslan, por ejemplo, si se clonan en vectores.

Además de las variantes de la proteína TKTL1 con niveles potenciados o reducidos de actividad enzimática, las proteínas de TKTL1 con localización o agregación y/o dimerización modificada dentro de la célula pueden detectarse en pacientes. Usando anticuerpos monoclonales que detecten específicamente la proteína TKTL1 (Linaris Biologische Produkte, Wertheim) la proteína TKTL1 dentro del núcleo puede detectarse en células aisladas procedentes de fluidos corporales. Usando inmunocitoquímica puede determinarse la localización de TKTL1 dentro del núcleo y del citoplasma de células de individuos sanos y de pacientes. En un subconjunto de pacientes con Alzheimer puede detectarse una localización potenciada de TKTL1 dentro del núcleo. En pacientes con Alzheimer también existe una agregación diferente de TKTL1. La detección de esta agregación es posible usando electroforesis 2D en geles (Fig. 15). Además, mediante ELISA, usando anticuerpos contra TKTL1 y GAPDH puede detectarse una agregación con otras proteínas, por ejemplo, GAPDH.

La etapa de determinación del uso de la invención también puede realizarse a nivel de ácidos nucleicos, es decir, con el ácido nucleico TKTL1 como diana. El término "ácido nucleico TKTL1", como se usa en el presente contexto, comprende el gen TKTL1, los ARNm de TKTL1 y los ácidos nucleicos que codifican TKTL1.

En una realización preferida la detección, anteriormente mencionada, del parámetro TKTL1 en cuestión en la muestra debería realizarse usando al menos una sonda de ácido nucleico que pueda hibridarse con un ácido nucleico TKTL1. Una molécula diana adecuada es el propio ácido nucleico TKTL1 así como un ácido nucleico quimérico que comprenda un ácido nucleico que codifique TKTL1 o sus fragmentos.

El procedimiento para la detección de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) puede realizarse, por ejemplo, mediante una reacción de unión de la molécula a detectar con sondas de ácido nucleico complementarias, proteínas con especificidad de unión para los ácidos nucleicos o cualquier otra entidad que reconozca específicamente y se una a dichos ácidos nucleicos. Este procedimiento puede realizarse *in vitro* así como directamente *in situ* por ejemplo durante una reacción de tinción de detección. Otro modo de detectar los productos génicos de TKTL1 en una muestra a nivel de ácidos nucleicos, realizado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, es una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que puede realizarse de una manera cuantitativa, tal como, por

ejemplo, una reacción en cadena de polimerasa. En una realización preferida, para cuantificar el nivel de ARN de TKTL1 en muestras, puede usarse PCR-en tiempo real (AR).

5 Para realizar un control positivo, la muestra de TKTL1 puede comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos o polipéptidos de TKTL1 o fragmentos de los mismos en forma aplicable, tal como una solución o sal, péptidos en forma aplicable, muestras de cortes de tejidos o células positivas.

10 En resumen: el tipo (manera) de actividad enzimática de TKTL1 (normal, reducida o potenciada) puede identificarse en individuos basándose en mutaciones del gen TKTL1, en actividades enzimáticas reducidas o potenciadas de la proteína TKTL1 aislada o en una formación de imágenes *in vivo* de la reacción enzimática de TKTL1. El diagnóstico puede realizarse determinando la actividad enzimática de la proteína TKTL1 aislada del paciente (por ejemplo suero, líquidos u otros fluidos corporales) o mediante formación de imágenes *in vivo* de la actividad enzimática de TKTL1.

15 Los kits para realizar el uso de la invención pueden contener sistemas de diagnóstico basados en bioluminiscencia para visualizar tejidos *in situ*. Adicionalmente, estos sistemas pueden incluir composiciones que contengan sustratos que se transformen por la actividad enzimática de TKTL1. En particular estos sistemas pueden incluir una composición que contenga una reacción generadora de bioluminiscencia. La administración de las composiciones da como resultado la producción de luz por tejidos diana lo que permite la detección y localización de células o tejidos, por ejemplo, para extirpación quirúrgica.

20 Para realizar el uso de la invención durante una formación de imágenes molecular, en particular una formación de imágenes radiográfica de tejidos, se propone el uso de un agente formador de imágenes radio-opaco que, en una realización, se acumula intracelularmente en tejidos en relación proporcional con su actividad funcional o fisiológica. El agente formador de imágenes es un sustrato o ligando de alta afinidad selectivo, permeable a la membrana celular, radio-opaco para TKTL1.

25 Los sustratos para TKTL1 marcados pueden usarse como agentes formadores de imágenes, por ejemplo como agentes formadores de imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET) o agentes formadores de imágenes por tomografía de resonancia magnética (MRT) para la detección y localización de células y tejidos no invasivos con una actividad enzimática de TKTL1 potenciada o reducida.

Un sustrato marcado muy adecuado para su uso como agente formador de imágenes para PET es la TKTL1 marcada con ^{18}F .

30 Durante los experimentos que conducen a la presente invención se observó adicionalmente que las mutaciones de TKTL1 (por ejemplo durante la evolución de mamíferos, se produjo una deleción de un exón que codifica 38 aminoácidos en TKTL1) no solamente dan como resultado la disminución de la especificidad hacia el sustrato sino, además, una menor afinidad por la tiamina. Por tanto, un nivel de tiamina reducido conduce a una deficiencia aumentada de algunas de las proteínas TKTL1 dando como resultado lesiones debidas a una actividad de TKTL1 disminuida. Estos cambios patológicos pueden impedirse o al menos corregirse mediante la activación de su ruta metabólica. La determinación de la afinidad de TKTL1 con respecto a tiamina o la cantidad de TKTL1 o la actividad de TKTL1 puede aprovecharse para identificar individuos que deben tratarse con tiamina o derivados de tiamina con una mejor biodisponibilidad (por ejemplo benfotiamina).

Dichos individuos pueden ser, por ejemplo, pacientes diabéticos con diabetes asociada a fenómenos como retinopatía, neuropatía (autonomía cardiovascular) o lesión de células endoteliales.

40 El tratamiento de trastornos asociados con la sobreexpresión del gen TKTL1 puede comprender cualquier procedimiento adecuado para la reducción de la actividad del polipéptido TKTL1 en un individuo o en células de un individuo.

45 Estos procedimientos pueden comprender una reducción de la actividad del polipéptido TKTL1 por medio de la reducción de la expresión del gen o por medio de la reducción de la actividad enzimática. Los ejemplos pueden comprender la administración de construcciones antisentido de ribozimas o inhibidores enzimáticos, la administración de antagonistas de cofactores de polipéptidos TKTL1, tales como, por ejemplo, compuestos antitiamina o la administración reducida de cofactores esenciales para la actividad enzimática (por ejemplo tiamina).

Una terapia preferida de trastornos asociados con la sobreexpresión del gen TKTL1 comprende la administración de compuestos antitiamina o la reducción de la captación de tiamina por individuos que muestran trastornos caracterizados por la sobreexpresión del gen TKTL1.

50 Como se sabe hasta ahora la nueva aGF-mam descubierta está presente regularmente (normalmente, de manera natural) en tejidos sanos como retina, células endoteliales, tejido nervioso y testículos.

55 Durante los experimentos que conducen a la presente invención resulta obvio que en diversos tejidos tumorales la aGF-mam se desarrolla con alta renovación. En estas células tumorales se detectó una sobreexpresión de la enzima TKTL1 y así mismo grandes cantidades de lactato que conducían a una degradación de la matriz. Estos hallazgos confirman los estudios de Warburg, quien detectó que los tejidos tumorales degradan la glucosa a lactato no

solamente en ausencia de oxígeno sino también en presencia de oxígeno, y que existe una correlación entre el grado de degradación de glucosa aerobia fermentativa (glucólisis aerobia), producción de lactato y tumores malignos. Mediante análisis basados en transcritos y proteínas de los tres miembros de la familia de TKT pudo demostrarse, que el gen TKTL1 es el gen/proteína transcetolasa que se sobreexpresa en tumores.

- 5 Desde hace muchos años las proteínas transcetolasas y las actividades enzimáticas de transcetolasa se habían asociado a enfermedades neurodegenerativas como el síndrome de Wernicke-Korsakoff, pacientes con enfermedad de Alzheimer, etc. Sin embargo, la pregunta, de cómo es esta relación parece que continúa abierta hasta la finalización de la presente invención.

- 10 Durante los experimentos que conducen a la presente invención se observó que, tanto pacientes con enfermedad de Alzheimer como pacientes con el síndrome de Wernicke-Korsakoff, tenían actividades enzimáticas TKTL1 reducidas y variantes de la proteína TKTL1 con diferentes puntos isoeléctricos o de menor tamaño. En pacientes con el síndrome de Wernicke-Korsakoff pudo demostrarse que sus células contenían isoformas de la proteína TKTL1 con una afinidad reducida por tiamina. Dado que la glicosilación (por ejemplo, la glucosa se une covalentemente a las proteínas – la reacción química se conoce como reacción básica de Schiff) es uno de los procesos implicados en la
- 15 amiloidogénesis y en la generación de placas proteicas que conduce a enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo: las fibrillas presentes en pacientes con enfermedad de Alzheimer comparten varias propiedades comunes con proteínas glicosiladas y la glicosilación causa la transición estructural desde la forma plegada, soluble a fibrillas beta) las actividades enzimáticas de TKTK1 reducidas dan como resultado una potenciación de la glicosilación y finalmente una amiloidogénesis potenciada y generación de placas proteicas.

- 20 La presente invención se explicará por medio de los siguientes ejemplos y figuras.

Breve descripción de los dibujos:

- Figura 1: (A) Cuantificación de transcritos de TKTL1 en muestras de adenocarcinoma gástrico y pulmonar y sus correspondientes tejidos normales. N – muestra normal; T – muestra tumoral; M - marcador, se muestran fragmentos de 100 pb y 200.
- 25 Figura 2: (A) Modelo de expresión del gen TKTL1 humano en transferencias de Northern de ARNm con poli (A)⁺ de diferentes tejidos adultos humanos analizados con una sonda de ADNc para TKTL1. (B) Expresión de isoformas de la proteína TKTL1 en cinco líneas celulares tumorales derivadas de cuatro entidades tumorales diferentes. (C) Proteína TKTL1 de longitud completa expresada en *E. coli*.
- 30 Figura 3: Determinación de la actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 natural (A) y recombinante (B).
- Figura 4: Expresión de la proteína TKTL1 en
A-B: tejido de cuerpo normal del paciente 1 con carcinoma gástrico;
C-F: tejido tumoral del paciente 1 con carcinoma gástrico;
35 G-I: tejido de antro normal del paciente 2 con carcinoma gástrico,
J-N: células de carcinoma gástrico del paciente 2,
OP: carcinoma gástrico mal diferenciado;
Q: carcinoma de colon;
R: carcinoma de vejiga superficial;
S,T: carcinoma de vejiga invasivo mal diferenciado.
- 40 Aumento: G x50; C,H y J x100; A,B,D,E,I,K,M,O y S x200; F,L,N,P,Q,R y T x400.
- Figura 5: tinción de TKTL1 de carcinoma de vejiga no invasivo e invasivo
- Figura 6-8: Expresión de TKTL1 y Akt fosforilada (ph-Akt) en secciones incluidas en parafina de
A-C: tejido normal, de cáncer tiroideo papilar (CTP), de cáncer folicular (CTF) y de cáncer no
45 diferenciado (CTND); D: tejido normal y de cáncer pulmonar no microcítico CPNM, E: cáncer de colon; F: tejido normal y de cáncer de vejiga; G: carcinomas de próstata.
AEC = tinción roja; tinción con colorante de contraste con hematoxilina = tinción azul, las puntas de flecha amarillas indican tinción nuclear de ph-AKT.
- Figura 9-10: Expresión de TKTL1 en células endoteliales.
- Figura 11-12: Expresión de TKTL1 en células neuronales.
- 50 Figura 13-14: Dibujo esquemático de la ruta de la aGF-mam.
- Figura 15: Electroforesis bidimensional (2D) en gel de un complejo de multiproteína que contiene las isoformas de la proteína TKTL1 (flecha A), DNasaX y GATDH.
- Figura 16: Electroforesis bidimensional (2D) en gel de isoformas de la proteína TKTL1 de alto peso molecular (flecha) identificadas por inmunotinción.

Figura 17: Determinación por ELISA (A) de isoformas de la proteína TKTL1 y (B) de la actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 aislada. Valores obtenidos

- 5 (A)A1-A5: de leucocitos de individuos sanos,
 (A)A6-A10: de fibroblastos de individuos sanos,
 (A)B1-B5: de suero de individuos sanos,
 (A)B6-B10: de células cerebrales de individuos sanos,
 (A)A11-A12: sin material de sonda (nivel de fondo),
 (A)B11-B12: sin material de sonda (nivel de fondo),
- 10 (A)C1-C3: de leucocitos de pacientes con AD,
 (A)C4-C6: de fibroblastos de pacientes con AD,
 (A)C7-C9: de suero de pacientes con AD,
 (A)C10-C12: de células cerebrales de pacientes con AD,
 (A)D1-D3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)D4-D6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
- 15 (A)D7-D9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)D10-D12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)E1-E3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Huntington,
 (A)E4-E6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Huntington,
 (A)E7-E9: de suero de pacientes con enfermedad de Huntington,
 (A)E10-E12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Huntington,
- 20 (A)F1-F3: de leucocitos de pacientes con SLE,
 (A)F4-F6: de fibroblastos de pacientes con SLE,
 (A)F7-F9: de suero de pacientes con SLE,
 (A)F10-F12: de células renales de pacientes con SLE,
- 25 (A)G1-G3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)G4-G6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)G7-G9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)G10-G12: de células renales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (A)H1-H3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson con diabetes de tipo II,
- 30 (A)H4-H6: de fibroblastos de pacientes con diabetes de tipo II,
 (A)H7-H9: de suero de pacientes con diabetes de tipo II,
 (A)H10-H12: de células renales de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)A1-A5: de leucocitos de individuos sanos,
 (B)A6-A10: de fibroblastos de individuos sanos,
- 35 (B)B1-B5: de suero de individuos sanos,
 (B)B6-B10: de células cerebrales de individuos sanos,
 (B)A11-A12: sin material de sonda (nivel de fondo),
 (B)B11-B12: sin material de sonda (nivel de fondo),
 (B)C1-C3: de individuos sanos,
- 40 (B)C4-C6: de células neuronales de individuos sanos,
 (B)C7-C9: de células renales de individuos sanos,
 (B)C10-C12: de células de colon de individuos sanos,
 (B)D1-D3: de leucocitos de pacientes con AD,
 (B)D4-D6: de fibroblastos de pacientes con AD,
- 45 (B)D7-D9: de suero de pacientes con AD,
 (B)D10-D12: de células cerebrales de pacientes con AD,
 (B)E1-E3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (B)E4-E6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (B)E7-E9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (B)E10-E12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
- 50 (B)F1-F3: de leucocitos de pacientes con SLE,
 (B)F4-F6: de fibroblastos de pacientes con SLE,
 (B)F7-F9: de suero de pacientes con SLE,
 (B)F10-F12: de células renales de pacientes con enfermedad de SLE,
- 55 (B)G4-G6: de fibroblastos de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)G7-G9: de suero de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)G10-G12: de células renales de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)H1-H3: de leucocitos de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)H4-H6: de fibroblastos de pacientes con diabetes de tipo II,
- 60 (B)H7-H9: de suero de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)H10-H12: de células renales de pacientes con diabetes de tipo II.

Información general en relación con los ejemplos:

Origen y Cultivo de células

5 Procedentes de la ATCC se obtuvo la línea celular A549 de carcinoma pulmonar, la línea celular MCF7 de carcinoma de mama, la línea celular HepG2 de carcinoma hepático y las líneas celulares HCT116 y HT29 de carcinoma de colon. Las células se cultivaron en RPMI 1640 o en DMEM complementado con FCS al 10%, penicilina y estreptomina (Invitrogen) a 37 °C con CO₂ al 5%.

Análisis de transferencia de Northern

10 Se marcó una sonda de ADN de la región 3' no traducida (restos 1627 a 2368) del transcrito de TKTL1 (nº de acceso X91817) con [[alfa]-³²P]dATP y [[alfa]-³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) en una reacción cebada al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). La hibridación se realizó en fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7%, albúmina de suero bovino al 0,2%, PEG 6000 al 0,2%, polivinilpirrolidona 360000 al 0,05%, Ficoll 70000 al 0,05% y sulfato de dextrano al 0,5% a 65 °C durante una noche. La sonda no específicamente unida se eliminó por lavado a 65 °C en fosfato de sodio 40 mM, pH 7,2, SDS al 1% durante 60 minutos. Los filtros se expusieron a una película de rayos X (Kodak) durante 1-5 días. Se adquirió una transferencia de Northern de ARN poli(A)⁺ de tejido adulto humano múltiple procedente BD Biosciences Clontech.

Análisis de transferencia de Western

20 Para el análisis de transferencia de Western, se realizó la lisis de las células en un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, cloruro de sodio 150 mM, NP40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, azida sódica al 0,02%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). En cada pocillo se introdujeron alícuotas de 50 µg de proteína soluble, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% y se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore). Para la detección de las proteínas TKTL1 se usó MAb JFC12T10 acoplado a HRP en una concentración final de 1 µg/ml. El MAb se visualizó con un sistema de detección de transferencia de Western ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

25 La proteína TKTL1 purificada por afinidad de las líneas celulares se determinó usando procedimientos ELISA convencionales. Para el revestimiento de las placas del ensayo Elisa, se usaron tres anticuerpos (5 µg/ml) anti-TKTL1 monoclonales de IgG de ratón purificados por afinidad diferentes. Como reactivo secundario se usó el anticuerpo anti-TKTL1, JFC12T10, conjugado con peroxidasa de rábano picante a 5 µg/ml. Las proteínas unidas en el complejo multiproteína se purificaron por afinidad de líneas celulares usando anticuerpos dirigidos contra TKTL1, DNasaX, ph-Akt, GAPDH. La unión a determinadas proteínas se evaluó por el procedimiento de ELISA, usando, por ejemplo, la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y GAPDH; y la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y DNasaX; y la combinación de anticuerpos contra ph-Akt y DNasaX.

Análisis 2D de complejos multiproteína

35 Las muestras se analizaron por electroforesis 2D en gel de alta resolución (8x7 cm). Para cada muestra se aplicaron 2,5 µg de proteína a dos geles 2D y un gel 2D se tiñó con plata y, para realizar la inmunotinción, las proteínas del otro se transfirieron a membranas de PVDF por electrotransferencia semiseca.

Ejemplo 1: Moldeo de expresión del gen TKTL1 humano en transferencias de Northern de ARNm poli(A)⁺ de diferentes tejidos adultos humanos analizados con una sonda de ADNc para TKTL1

40 El modelo de expresión del gen TKTL1 humano se analizó con una sonda de ADNc para TKTL1 en transferencias de Northern de ARNm poli(A)⁺ de diferentes tejidos adultos humanos. En la Figura 2 (A) se muestran los resultados. Se detectaron cuatro transcritos de 1,4, 1,9, 2,5 y 2,7 kb. Mientras que en la mayoría de los tejidos el transcrito principal tenía un tamaño de 2,5 kb, en el corazón abundaba el pequeño transcrito de 1,4 y no existían los transcritos de 2,5 y 2,7 kb. Los tamaños de los transcritos se indican en kb.

Ejemplo 2: Aislamiento y Purificación de la proteína TKTL1 de longitud completa

45 La proteína TKTL1 de longitud completa se expresó en *E. coli* y se aisló por purificación de afinidad mediante la etiqueta His en el extremo N. Se cargó 1 µg de proteína TKTL1 purificada por afinidad sobre un gel de SDS de gradiente al 4-20% y se tiñó con Coomassie. Se detectaron proteínas de diferente tamaño. La proteína más grande (66kDa) representa la proteína TKTL1 de longitud completa etiquetada con His en el extremo N, mientras que las proteínas TKTL1 más pequeñas se deben probablemente a la escisión proteolítica en el extremo C ya presente antes del procedimiento de aislamiento. Se observa que la migración de la proteína TKTL1 de longitud completa etiquetada con His de 66kDa recombinante indica un tamaño de 75 kDa. Los tamaños del marcador de la proteína se indican en kDa.

Ejemplo 3: Determinación del nivel de expresión del gen de TKTL1 en tejidos midiendo los niveles de ARNm

de TKTL1.

En una reacción de tinción *in situ* pueden analizarse semicuantitativamente disecciones de biopsias para determinar el nivel de ARNm del gen TKTL1. La reacción de tinción se realiza de la siguiente manera: Se incuban disecciones de tejido en concentraciones de etanol ascendientes hasta el 100% de etanol. Después de la evaporación del alcohol las disecciones se hierven en tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para el tratamiento previo del tejido. La mezcla de hibridación se prepara mezclando 50 µl de tampón de hibridación listo para usar (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) con aproximadamente 5-10 pmol de las sondas. Las sondas son oligonucleótidos marcados con fluoresceína con la siguiente secuencia: TCTCATCACAAAGCAGCACAGGAC

Ejemplo 4: Determinación de la actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 original (A) y recombinante (B)

La reacción bi-sustrato y uni-sustrato de la proteína TKTL1 original (A) y recombinante (B) se determinó por la producción de NADH medida con respecto al aumento de absorbancia a 340 nm. Para determinar la reacción bi-sustrato se usó xilulosa-5-fosfato (X5P) y ribosa-5-fosfato (R5P) mientras que para la reacción uni-sustrato solo se usó X5P. En la Figura 3 se muestra un representante de tres ensayos enzimáticos independientes que conducen a resultados similares.

Ejemplo 5: Determinación por ELISA de isoformas de TKTL1

La combinación del anticuerpo JFC6T8 y JFC5T3 contra TKTL1 determina una isoforma de la proteína TKTL1 específicamente presente en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Los anticuerpos JFC6T8 y JFC5T3 se acoplaron a una placa ELISA y se incubaron con muestras de pacientes e individuos sanos. Después de eliminar el material no específico unido, se determinó la actividad enzimática como se ha descrito anteriormente. En muestras de individuos sanos se obtuvieron actividades enzimáticas elevadas. En la Figura 17 (A) se muestra un listado de resultados individuales.

Ejemplo 6: Identificación de isoformas de la proteína TKTL1 de elevado peso molecular por electroforesis 2D en gel

Se aislaron isoformas de la proteína TKTL1 de elevado peso molecular procedentes de un paciente con una enfermedad neurodegenerativa (AD), se analizaron por electroforesis 2D en gel y se identificaron por inmunotinción. En la Figura 16 se muestran los resultados.

Ejemplo 7: Complejo de multiproteína que incluye TKTL1, DNasaX y GAPDH

El complejo multi-proteína que incluía TKTL1, DNasaX y GAPDH procedente de células K562 de leucemia mielógena crónica humana se purificó por afinidad usando el anticuerpo JFC12T10 contra TKTL1 acoplado a un engarce de carbono. Se realizó una electroforesis 2D en gel de este complejo multiproteína. Por inmunotinción y determinación de secuencia, en el complejo se identificaron isoformas de la proteína TKTL1 (flecha A) y otras proteínas presentes. En la Figura 15 se muestran los resultados.

Ejemplo 8: Actividad transcetolasa de TKTL1, aislada de muestras derivadas de pacientes e individuos sanos, determinada por ELISA

El anticuerpo JFC3T9 contra TKTL1 se acopló a una placa ELISA y se incubó con muestras de pacientes e individuos sanos. Después de eliminar el material no específico unido, se determinó la actividad enzimática como se ha descrito anteriormente. En muestras de individuos sanos se obtuvieron actividades enzimáticas elevadas. En la Figura 17 (B) se muestra un listado de resultados individuales.

Ejemplo 12: Detección del Nivel de la Proteína TKTL1 en tejido canceroso y en tejido normal (sano) de tiroides, pulmón y colon

Mediante inmunohistoquímica se analizaron cortes en parafina de un espesor de 5 µm de tejido de cáncer y normal de tiroides, pulmón y colon. Para desenmascarar el antígeno, los cortes desparafinados se calentaron en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 1 minuto a 450 W seguido de 5 minutos a 100 W. Después de aclarar con dH₂O, se realizó la inhibición de peroxidasa endógena con una incubación de 5 minutos con H₂O₂ al 3%. Después, los cortes se expusieron a un sistema de bloqueo con biotina (DAKO) durante 10 minutos para bloquear la avidina-biotina endógena. Después de dos lavados en tampón Tris/solución salina (TBS), los portaobjetos se incubaron con suero de cabra al 1% durante 30 minutos para bloquear la tinción no específica. De manera sucesiva, los cortes se expusieron a anticuerpo anti-TKTL1 de ratón (clon JFC12T10; IgG_{2b} de ratón) (25 µg/ml) o anti-Ser473 fosfo-Akt (587F11; IgG_{2b} de ratón; Cell Signaling Technology) durante una noche a 4 °C. Después, los portaobjetos se lavaron en TBS y se incubaron con inmunoglobulinas anti-ratón biotiniladas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se trataron con estreptavidina-peroxida (DAKO). La tinción se reveló usando sustrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). La tinción de los núcleos con colorante de contraste se realizó usando hematoxilina acuosa.

En la Figura 6, 7 y 8 se muestran los resultados de esta tinción inmunohistoquímica. Para cada tipo de cáncer, se muestra un representante de tres experimentos independientes. En tejido de cáncer tiroideo la TKTL1 y la Akt

fosforilada se expresan altamente. En cáncer pulmonar no microcítico (CPNM) y en carcinomas de colon se expresan niveles elevados de TKTL1 y Akt fosforilada.

Ejemplo 13: Detección del nivel de la proteína TKTL1 en tumores de pacientes con carcinoma gástrico, pacientes con carcinoma de colon y pacientes con carcinoma no invasivo e invasivo de vejiga

- 5 Se determinó la expresión de la proteína TKTL1 en tumores de tres pacientes con carcinoma gástrico (Fig. 4A-P), un paciente con carcinoma de colon (Fig. 4Q), un paciente con carcinoma no invasivo de vejiga (Fig. 4R) y un paciente con carcinoma invasivo de vejiga (Fig. 4S-T) y se comparó con tejido normal correspondiente.

10 La determinación de la proteína TKTL1 se realizó usando un anticuerpo anti-TKTL1 monoclonal. El anticuerpo anti-TKTL1 se reveló por tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB; tinción marrón). La tinción con colorante de contraste se realizó con hematoxilina (tinción azul).

Las muestras del paciente 1 con carcinoma gástrico revelan fuerte expresión citoplásmica de TKTL1 en tejido tumoral pero ninguna expresión en las células estromales circundantes (Fig. 4C-F). Se observa expresión heterogénea en células tumorales (Fig. 4E-F). Los tejidos normales correspondientes no muestran expresión de TKTL1 (Fig. 4A-B).

- 15 Las muestras del paciente 2 con carcinoma gástrico revelan fuerte expresión citoplásmica dentro de células tumorales (Fig. 4J-N) y expresión heterogénea en células tumorales (Fig. 4 L). El tejido del antro normal correspondiente no mostró expresión de TKTL1 (Fig. 4G-I).

Las muestras del paciente 3 con carcinoma gástrico revelan expresión nuclear en un carcinoma gástrico mal diferenciado (Fig. 4O-P).

- 20 Las muestras del paciente con carcinoma de colon revelan tinción citoplásmica (Fig. 4Q).

Las muestras del paciente con carcinoma superficial de vejiga no revelan expresión de TKTL1 (Fig. 4R).

Las muestras del paciente con un carcinoma invasivo de vejiga mal diferenciado revelan fuerte expresión citoplásmica (Fig. 4S-T).

- 25 En la Figura 5 se muestra una comparativa de tejido de carcinoma no invasivo e invasivo de vejiga. El tejido de carcinoma no invasivo de vejiga no muestra tinción o solamente poca lo que indica que no existe expresión de TKTL1 mientras que el tejido de carcinoma invasivo de vejiga muestra fuerte tinción lo que indica fuerte expresión de TKTL1.

Ejemplo 14: Expresión de isoformas de la proteína TKTL1 en cinco líneas de células tumorales derivadas de cuatro entidades tumorales diferentes

- 30 La expresión de isoformas de la proteína TKTL1 en cinco líneas celulares tumorales derivadas de cuatro entidades tumorales diferentes se detectó usando un MAb que detecta específicamente isoformas de la proteína TKTL1 y que no reacciona con otros miembros de la familia de transcetolasa. En la Figura 2 (B) se muestran los resultados. Cada línea celular muestra un único patrón de expresión de isoformas de la proteína TKTL1. El peso molecular convencional se indica en kDa.

Ejemplo 15: Expresión de TKTL1 y de Akt fosforilada (ph-Akt) en tejido canceroso y normal

- 35 Se realizó análisis inmunohistoquímico de TKTL1 o ph-Akt en cortes de tejido tiroideo normal, de cáncer tiroideo papilar (CTP), folicular (CTF) y no diferenciado (CTND) (Fig. 6A-C) y de tejido normal y de CPNM (Fig. 7 D), de tejido de cáncer de colon (Fig. 7 E) y de tejido de cáncer de vejiga y de próstata o de tejido normal (Fig. 8F-G) con Anti-TKTL1 o anti-ph-Akt. El anti-TKTL1 o anti-ph-Akt se reveló por 3-amino-9-etilcarbazol (AEC; tinción roja). La tinción con colorante de contraste se realizó con hematoxilina (tinción azul). Se realizaron controles negativos usando IgG acoplada con isotipo.

La TKTL1 se localiza principalmente dentro del citoplasma pero también puede identificarse una tinción nuclear en un subconjunto de tumores. La Akt fosforilada se localiza dentro del citoplasma y/o del núcleo.

Ejemplo 16: Detección del nivel de TKTL1 en pacientes con carcinoma gástrico, en pacientes con carcinoma de colon, en pacientes con carcinoma no invasivo de vejiga y en pacientes con carcinoma invasivo de vejiga

- 45 Para desenmascarar el antígeno se calentaron cortes de parafina de un grosor de 3 µm en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 5 minutos a 900 W, durante 5 minutos a 900 W en dH₂O y durante 5 minutos en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) a 900 W. Después de un lavado en tampón fosfato/solución salina (PBS), se realizó la inhibición de peroxidasa endógena, como se ha descrito anteriormente. Después, los cortes se expusieron 15 minutos a tampón de bloqueo biotina-avidina (Vector Laboratories). El bloqueo de la tinción no específica se realizó con suero de cabra como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos primarios se visualizaron con el complejo de peroxidasa de rábano picante acoplado a avidina biotinilada (ABC) y tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) (kit Elitet; Vector

Laboratories) y tinción con colorante de contraste con hematoxilina de Mayer.

En las Figuras 4, 5 y 9-16 se muestran los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas.

Ejemplo 17: Cuantificación de transcritos de TKTL1 en muestras de adenocarcinoma gástrico y pulmonar y sus tejidos normales correspondientes

- 5 Para visualizar el producto de amplificación de TKTL1 de 150 pb, se cargaron 15 μ l de reacción PCR en tiempo real sobre un gel de agarosa al 3%. Las diferencias de expresión entre el tejido tumoral y el tejido normal correspondiente se habían calculado basándose en los datos en tiempo real y se muestran como veces de inducción en la muestra de tumor con respecto a la correspondiente muestra normal. (B) Cuantificación del transcrito en tiempo real del gen de TKT, TKTL1, TKTL2 y β -actina en un adenocarcinoma pulmonar y muestra normal correspondiente. El nivel de expresión más elevado se observó para la β -actina. Dentro de la familia de genes de transcetolasa, el gen de TKT muestra el mayor nivel de expresión. El nivel de expresión de TKTL1 y TKTL2 en pulmón normal es bajo en comparación con el de TKT y β -actina. A diferencia de esto, el nivel de expresión de TKTL1 en adenocarcinoma pulmonar es 60 veces superior al correspondiente en tejido normal.

Ejemplo 18: Diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas

- 15 Se analizaron líneas celulares de fibroblastos, fibroblastos de prepucio o leucocitos de sujetos sanos y de pacientes con la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas para determinar anomalías de TKTL1 mediante ELISA, análisis de electroenfoque en gel, electroforesis 2D en gel e inmunotinción. Los experimentos mediante ELISA se realizaron por estrategias ELISA diferentes. Un tipo de ELISA representa un ELISA típico, en el que el anticuerpo de captura o de detección se dirige contra una determinada proteína. El otro tipo de ELISA usado
- 20 consiste en un anticuerpo dirigido contra una proteína y un anticuerpo contra otra proteína. Un ejemplo del ELISA del tipo 1 es la combinación del anticuerpo JFC12T10 contra TKTL1 y el anticuerpo JFC10T9 contra TKTL1. JFC12T10 detecta un epítipo de la proteína TKTL1 y no reacciona en cruzado con TKT ni TKTL2. JFC10T9 detecta otro epítipo de TKTL1. La proteína TKTL1 puede detectarse y medirse usando los JFC12T10/JFC10T9 mediante ELISA. Un ejemplo del ELISA de tipo 2 es el anticuerpo JFC12T10 dirigido contra TKTL1 y el anticuerpo JFC11D8 dirigido
- 25 contra DNasaX. Usando este ELISA puede determinarse la interacción de la proteína TKTL1 y DNasaX. Los dos tipos de reacciones de ELISA se realizaron con muestras de personas sanas y de pacientes. Un tipo de muestra consiste en fluidos corporales de tipo suero y se analizó directamente para determinar la presencia de proteínas e interacciones de proteínas. Otro tipo de análisis se realizó usando un anticuerpo (por ejemplo JFC12T10 o JFC11D8) acoplado a un engarce de carbono. Usando procedimientos de purificación por afinidad se aislaron
- 30 complejos multiproteína de células (derivados de cultivos de células o de tejidos originales). Los complejos multiproteína se analizaron por electroenfoque o electroforesis 2D en gel seguido por inmunotinción o determinación de la actividad enzimática (por ejemplo reacción bi- o uni-sustrato de transcetolasa; ensayo de DNasa, actividad GAPDH). Usando estos ensayos, pudieron identificarse isoformas de la proteína específicamente presentes en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como AD. En pacientes con trastornos neurodegenerativos como
- 35 pacientes con AD, se habían detectado variantes de TKTL1 con pH alcalino alto, reacción bi- o uni-sustrato más baja y afinidad más baja a tiamina. Adicionalmente, usando PAGE convencional, en células intactas o en extractos de células de estos pacientes en comparación con individuos sanos, se detectaron isoformas más pequeñas de la isoproteína y una mayor cantidad de proteínas más pequeñas en comparación con TKTL1 de longitud completa. Además, en individuos sanos que después (meses y años más tarde) mostraron enfermedad neurodegenerativa
- 40 como AD, se había observado una reacción bi- o uni-sustrato reducida de TKTL1 o una menor afinidad de TKTL1 por la tiamina. Las variantes de TKTL1 observadas conducen a metabolismo de azúcar reducido en células. Este metabolismo reducido de azúcar conduce a la formación de AGE potenciada y a la formación de AGE que conduce a agregados de proteínas de moleculares elevados y a la muerte celular. Esta muerte celular no deseada de células necesarias para la función correcta del cerebro es una causa importante para estas enfermedades neurodegenerativas. Para identificar individuos que no tienen variantes de TKTL1 con una reacción bi- o uni-sustrato
- 45 reducida o menor afinidad por tiamina, se establecieron anticuerpos contra TKTL1 que pueden usarse para aislar proteínas TKTL1 de muestras a ensayar (por ejemplo, JFC12T10). Estas muestras pueden ser fluidos corporales (por ejemplo suero) o muestras de células (por ejemplo proteínas de fibroblastos o leucocitos). Los anticuerpos contra TKTL1 acoplados a placas ELISA capturan las proteínas TKTL1 y después de retirar por lavado las proteínas
- 50 TKT y TKTL2, puede determinarse enzimáticamente la reacción bi- o uni-sustrato (trans)-cetolasa en una reacción enzimática acoplada, por ejemplo, por acumulación del NADH reducido (los ensayos enzimáticos se han descrito anteriormente). De manera similar la reacción enzimática se realizó a diferentes concentraciones de tiamina. Reduciendo el nivel de tiamina en el ensayo se identificaron variantes de TKTL1 en pacientes con enfermedades neurodegenerativas con una afinidad reducida por tiamina. Usando esta estrategia de ELISA y análisis enzimáticos,
- 55 pueden identificarse variantes de TKTL1 que predisponen a enfermedades neurodegenerativas en un momento antes de que se presenten los síntomas de enfermedades neurodegenerativas. Esto puede usarse para prevenir enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, aplicando derivados de tiamina más solubles como benfotiamina o una dieta con niveles reducidos o con determinados tipos de azúcares (por ejemplo glucosa). Además de la identificación de variantes de TKTL1 con una reacción bi o uni-sustrato reducida o menor afinidad por tiamina, las
- 60 variantes de TKTL1 con una solubilidad reducida o variantes de TKTL1 presentes en complejos de elevado peso molecular se identificaron en pacientes con enfermedades neurodegenerativas de tipo AD. Los autores de la

invención establecen anticuerpos específicos contra TKTL1 que reaccionan específicamente contra variantes de TKTL1 presentes en complejos de elevado peso molecular en el núcleo de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como AD (JFC7T4). Usando reacciones ELISA o tinciones inmunohistoquímicas, estas variantes de TKTL1 específicas de enfermedades pueden identificarse en fluidos corporales (por ejemplo suero) o en muestras de tejido (por ejemplo leucocitos, fibroblastos, biopsias). Adicionalmente en combinación con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas presentes en estos complejos multiproteína, puede realizarse ELISA para detectar la presencia de interacciones de proteínas. Dicho ELISA de tipo 2 que consiste en el anticuerpo JFC8T7 contra TKTL1 y el anticuerpo JFC7D4 contra DNasaX identifica una interacción de proteína de TKTL1 y DNasaX, específica para células que entran en apoptosis. Otro ELISA de tipo 2 que consiste en el anticuerpo JFC8T7 contra TKTL1 y el anticuerpo JFC3G6 contra GAPDH identifica una interacción de proteína de TKTL1 y GAPDH, específica para células que entran en apoptosis. La presencia de estos complejos de proteína puede usarse para la detección y terapia de enfermedades neurodegenerativas. La identificación de dichas interacciones de proteínas entre las proteínas TKTL1 y otras de tipo GAPDH, DNasaX y ph-Akt puede usarse para el aislamiento de compuestos anti-apoptóticos. Estos compuestos pueden usarse como agentes farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos que se unen específicamente a TKTL1 pueden identificarse marcando por afinidad y, por ejemplo, por medio de tecnología Biacore. Un efecto anti-apoptótico puede detectarse usando muerte celular programa reducida (visualizada, por ejemplo, por escalera apoptótica, caspasa-3, anexina). La TKTL1 y GAPDH están estrechamente unidas entre sí. La reacción trans(cetolasa) de TKTL1 escinde azúcares de tipo X5P que conduce a la producción de GAP. Como GAPDH está fuertemente unido a TKTL1, el GAP producido se usa directamente de GAPDH que conduce a la producción de 1,3fosfoflicerato concomitante con la reducción de NAD^+ a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Para el aislamiento de pequeños compuestos que inhiben interacciones de TKTL1 y GAPDH deben usarse diferentes concentraciones de NAD^+ ya que la unión de algunos compuestos depende de la concentración de NAD^+ . Otro tipo de interacción de proteína se detectó usando el anticuerpo JFC12T10 como único anticuerpo. Si la proteína TKTL1 está presente como una sola proteína, no puede realizarse la reacción ELISA si sólo se usa un anticuerpo como anticuerpo de captura y de detección. En el caso del anticuerpo JFC12T10 contra TKTL1 puede usarse como anticuerpo de captura y de detección. Por lo tanto, usando este anticuerpo pueden detectarse interacciones de proteína TKTL1 y otra proteína TKTL1. Como algunas de las isoformas de la proteína TKTL1 dímeros de secuencias de proteína erróneas en N terminal que consisten en TKTL1 y TKTL1 pueden discriminarse en homo y hetero- dímeros de TKTL1. Algunos de estos dímeros consisten en la proteína de TKTL1 de longitud completa unida a otra proteína TKTL1 de longitud completa (homodímero de TKTL1). Algunos de estos dímeros consisten en una proteína TKTL1 de longitud completa y una isoforma TKTL1 más pequeña, en la que el extremo N es erróneo. La discriminación puede realizarse usando anticuerpos contra TKTL1 localizados en diferentes sitios dentro de la proteína de TKTL1. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos contra TKTL1 localizados en el extremo N con anticuerpos localizados en el extremo C y el resultado de este ELISA puede compararse con un ELISA usando solamente anticuerpos localizados en el extremo C. La relación entre estos dos resultados ELISA puede usarse para la identificación de pacientes y para la identificación de individuos sanos que más tarde desarrollarán una enfermedad asociada a TKTL1. (Véanse también las Fig. 11-12)

Ejemplo 19: Expresión de TKTL1 en células endoteliales

La mayoría de los tejidos y células normales no muestran expresión de TKTL1. En la retina, en células endoteliales y en células neuronales existe una expresión de TKTL1. La retina, las células endoteliales y las células neuronales resultan dañadas por altos niveles de glucosa. Como se muestra en la Figuras 9 y 10 la proteína TKTL1 se expresa en el núcleo y/o el citoplasma de células endoteliales (y en la retina y en células neuronales; no mostradas).

REIVINDICACIONES

1. El uso de la enzima TKTL1 como molécula indicadora y diana para la detección cualitativa y cuantitativa del grado de uso y del flujo correcto del proceso de la ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) en un individuo mamífero (paciente),
- 5 **caracterizado porque** en una muestra biológica obtenida de dicho individuo (paciente) se realizan las siguientes etapas:
- determinación (i) de la actividad y/o la concentración de la proteína TKTL1 o determinación de la actividad y/o la concentración del gen de TKTL1 o del ARNm de TKTL1 dentro de dicha muestra de dicho individuo (paciente) y dentro de una muestra de control y/o determinar (ii) la localización celular y/o el estado de agregación y/o el estado de dimerización de la proteína TKTL1 dentro de dicha muestra de dicho individuo (paciente) y dentro de una muestra de control,
 - comparación de los datos determinados obtenidos de dicha muestra de dicho individuo (paciente) con los datos obtenidos de la muestra de control, y
 - toma (i) de un nivel potenciado o disminuido del nivel de actividad y/o de concentración de la proteína TKTL1 o del gen de TKTL1 o del ARNm de TKTL1 en dicha muestra del individuo en comparación con la muestra de control como una indicación de un grado del uso potenciado o disminuido de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos, respectivamente,
- 10 y (ii) una localización celular anómala y/o un estado de agregación anómalo y/o un estado de dimerización anómalo de la proteína TKTL1 en dicha muestra del individuo en comparación con la muestra de control como una indicación de una ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos.
- 20
2. El uso de la reivindicación 1 para la detección y supervisión de una enfermedad asociada con una potenciación o disminución y/o anomalía de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** se realiza durante un procedimiento de formación de imágenes molecular *in vivo* o *in vitro*.
- 25
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido, una biopsia, un fluido corporal, una secreción, un frotis, suero, orina, semen, heces, bilis, un líquido que contiene células, células sometidas a lisis, restos de células, péptidos o ácidos nucleicos.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la determinación se realiza a nivel de la proteína, es decir siendo la diana la proteína TKTL1.
- 30
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la determinación a nivel de la proteína se realiza usando una molécula que se une específicamente a la proteína TKTL1.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha molécula es un anticuerpo dirigido contra TKTL1 o un fragmento de dicho anticuerpo anti-TKTL1 o un peptidomimético que comprende un epítipo de unión a antígeno o un mini-anticuerpo.
- 35
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la determinación se realiza a nivel del ácido nucleico es decir siendo la diana el gen de TKTL1 o el ARNm de TKTL1.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que para la determinación se usa al menos una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse con el gen de TKTL1 o con un ARNm de TKTL1.
- 40
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que para la determinación se usa un ácido nucleico químico que comprende un ácido nucleico TKTL1.

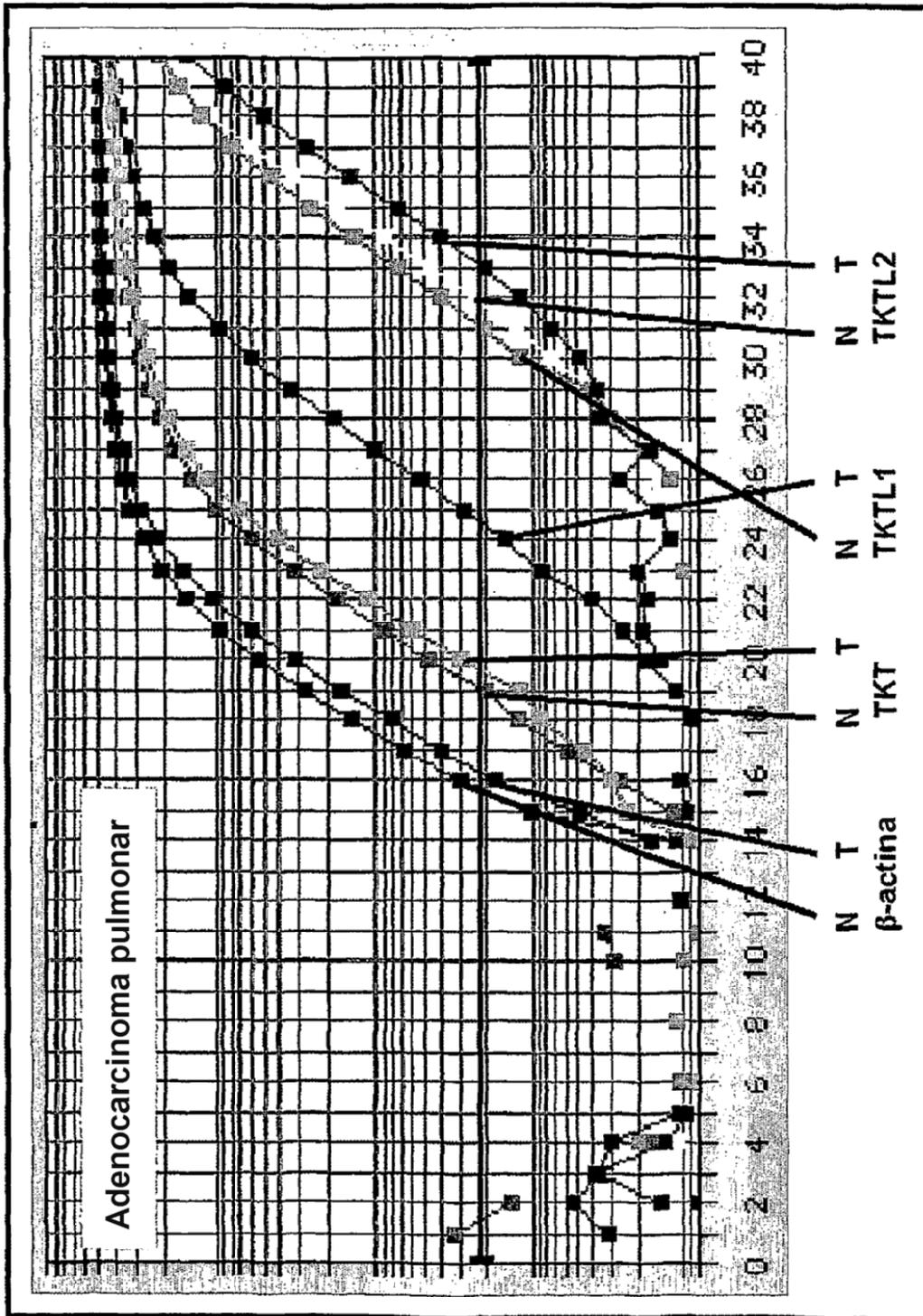


Fig. 1

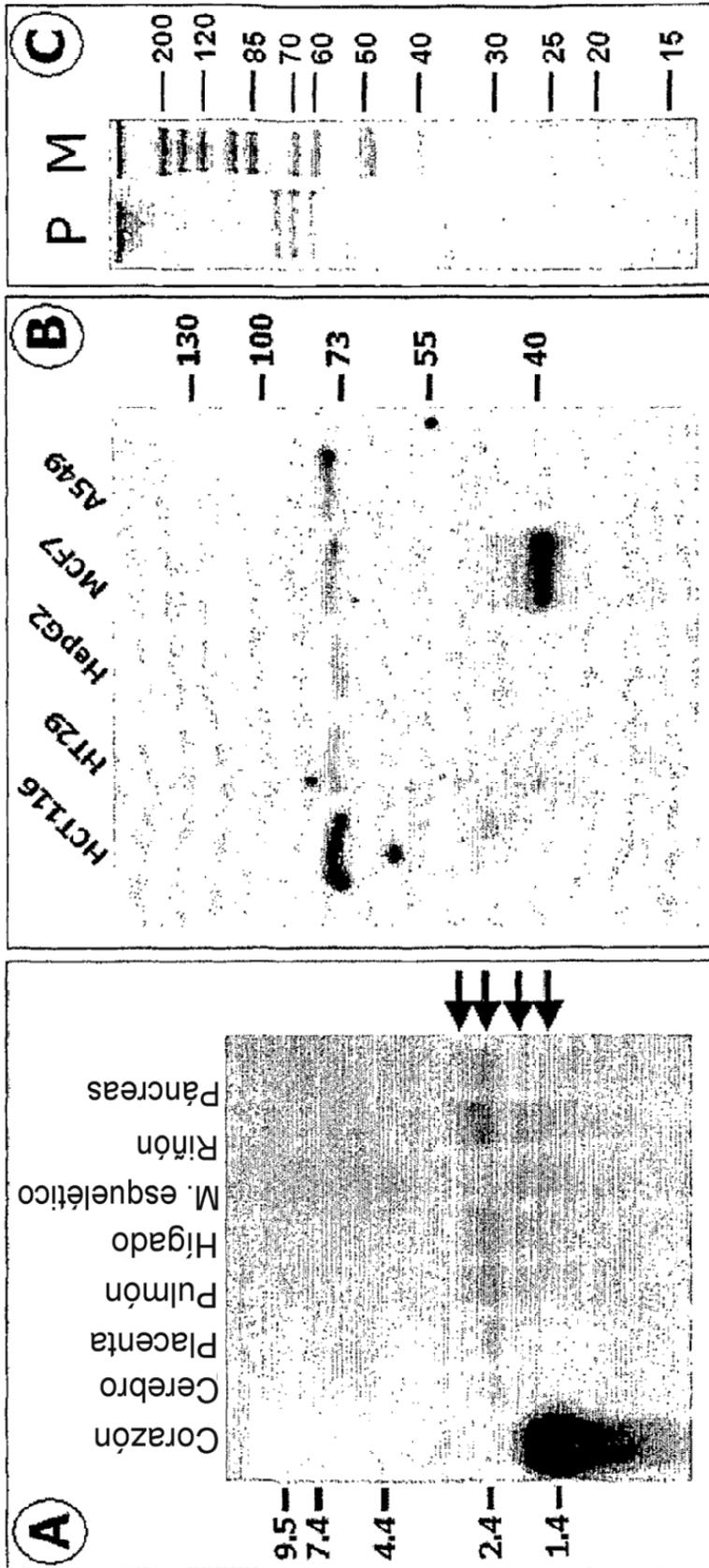


Fig. 2

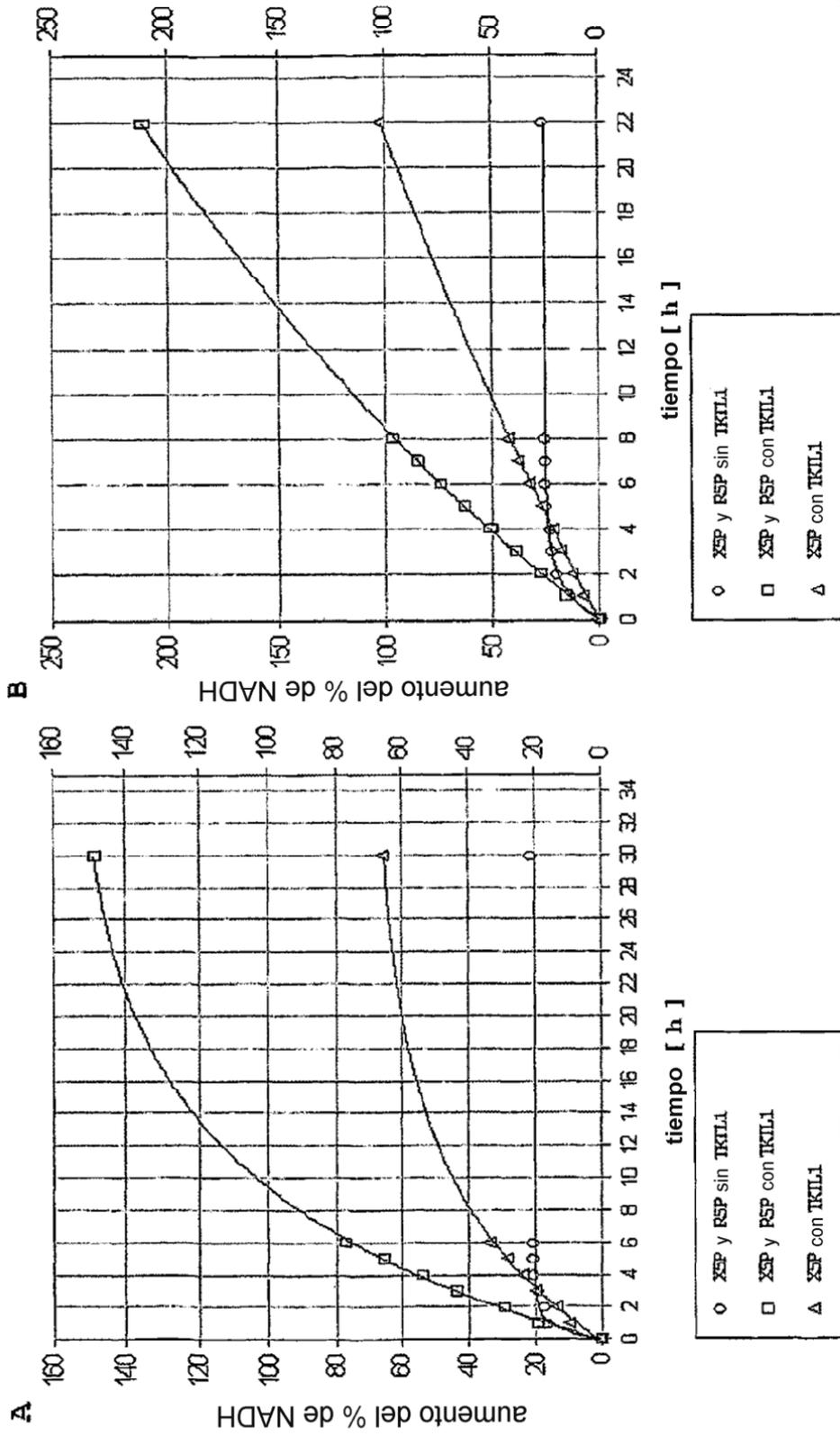


Fig. 3

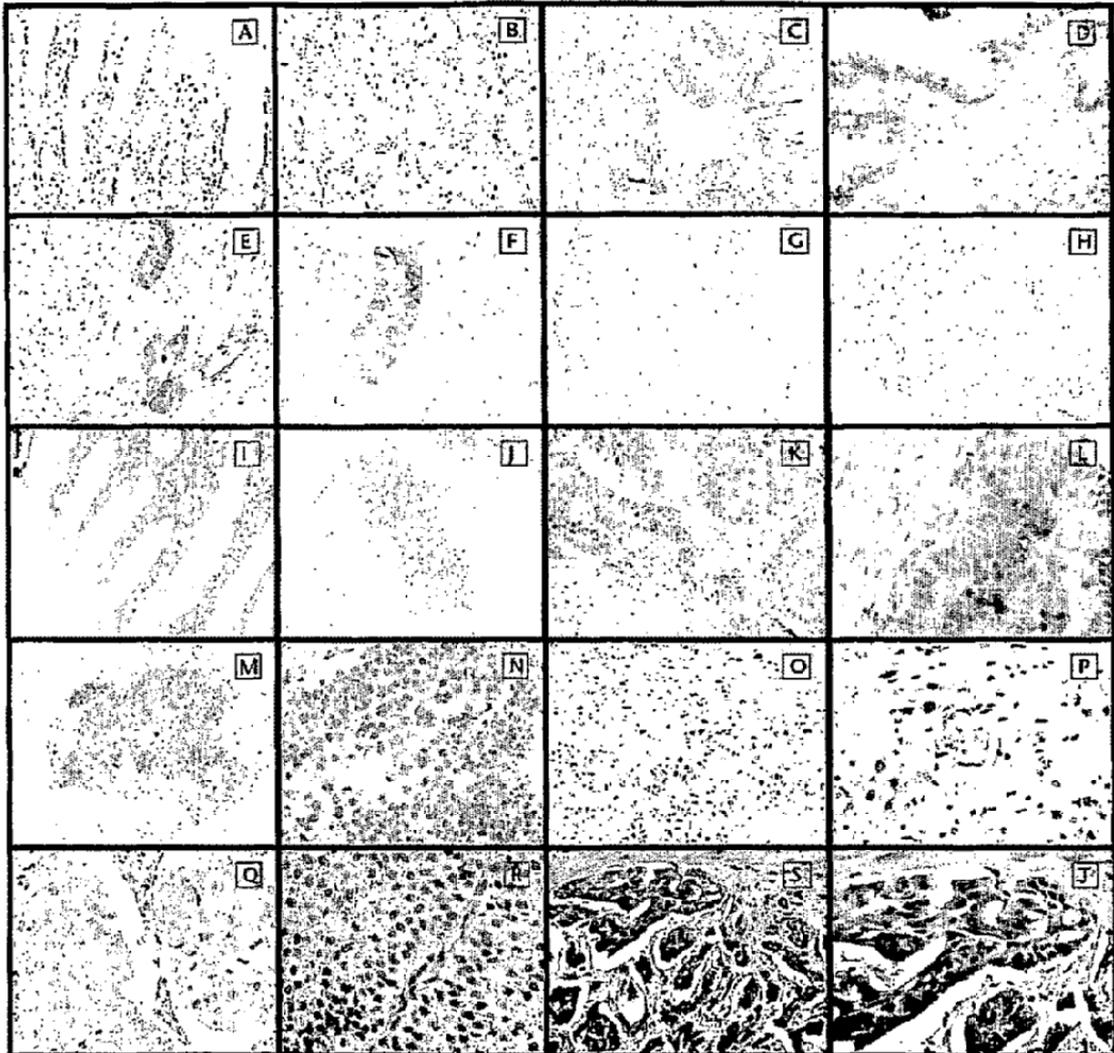


Fig.4

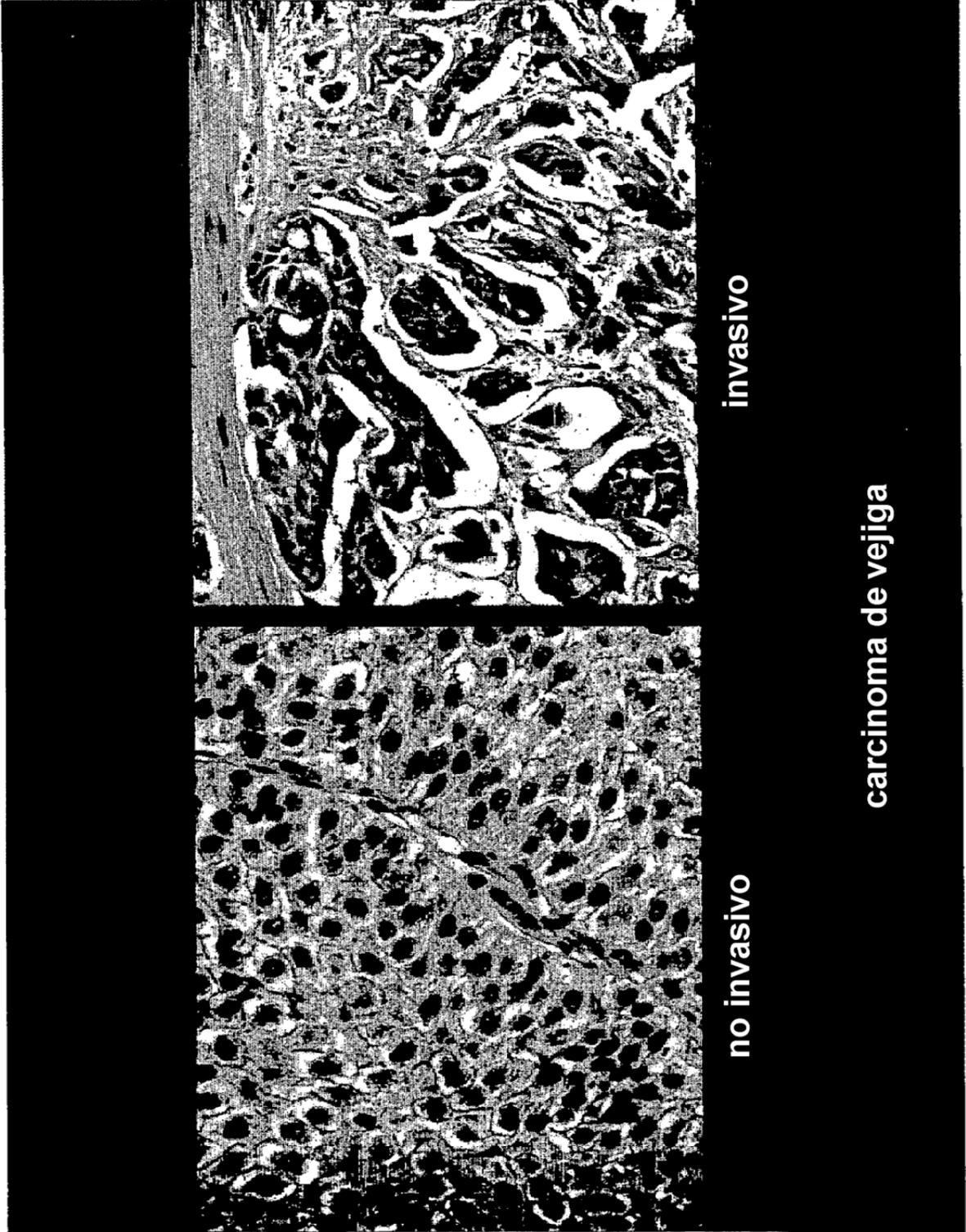


Fig. 5

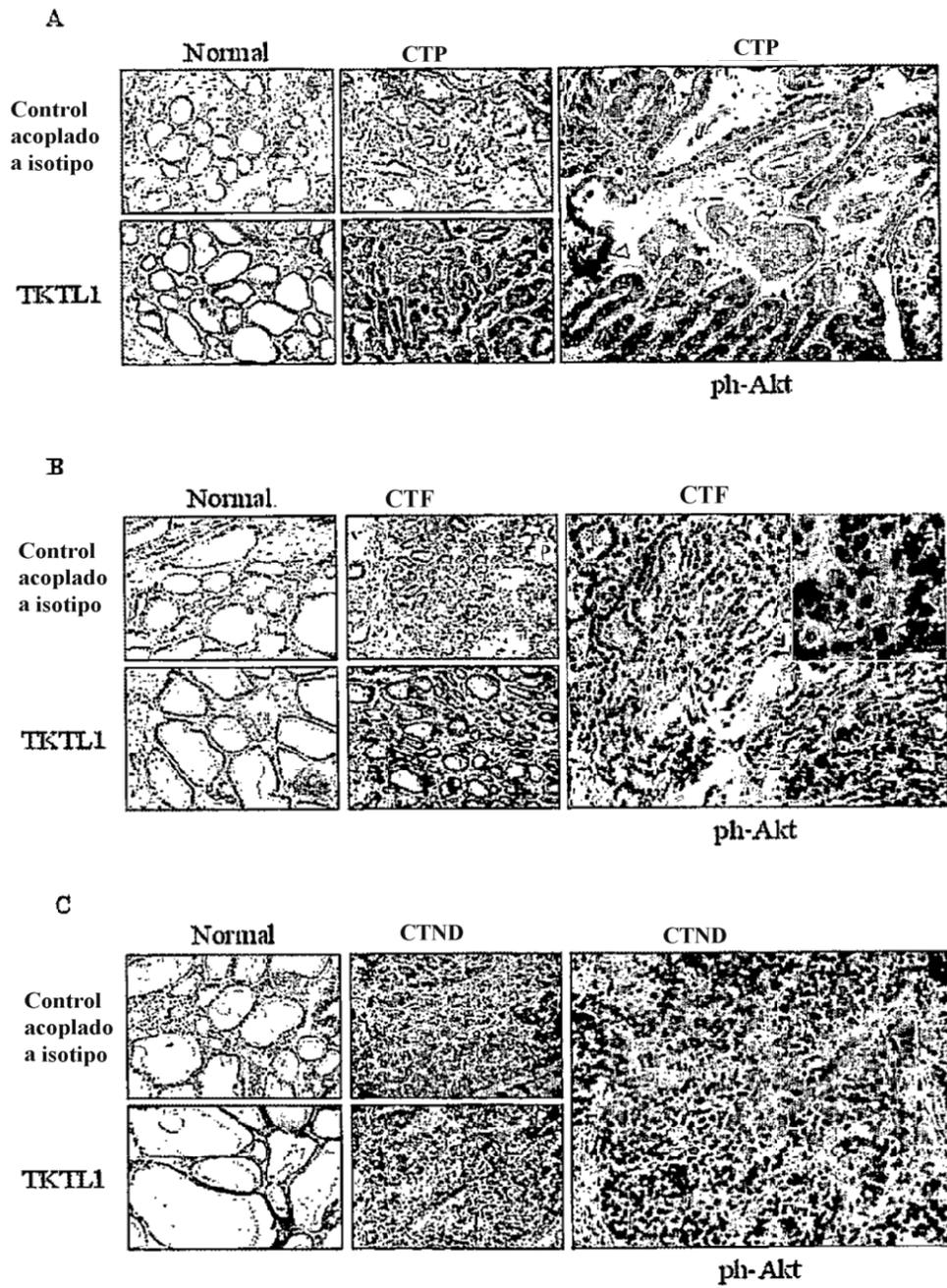


Fig.6

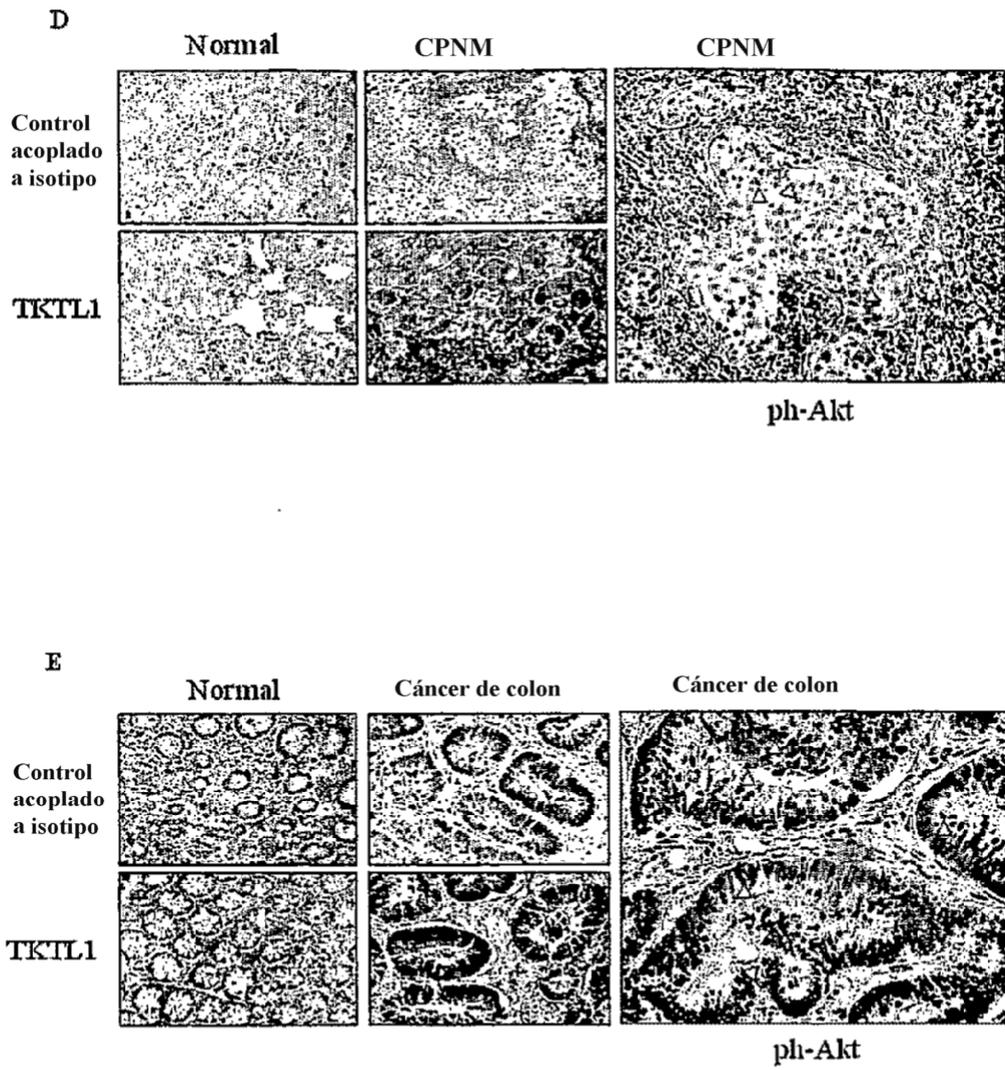


Fig.7

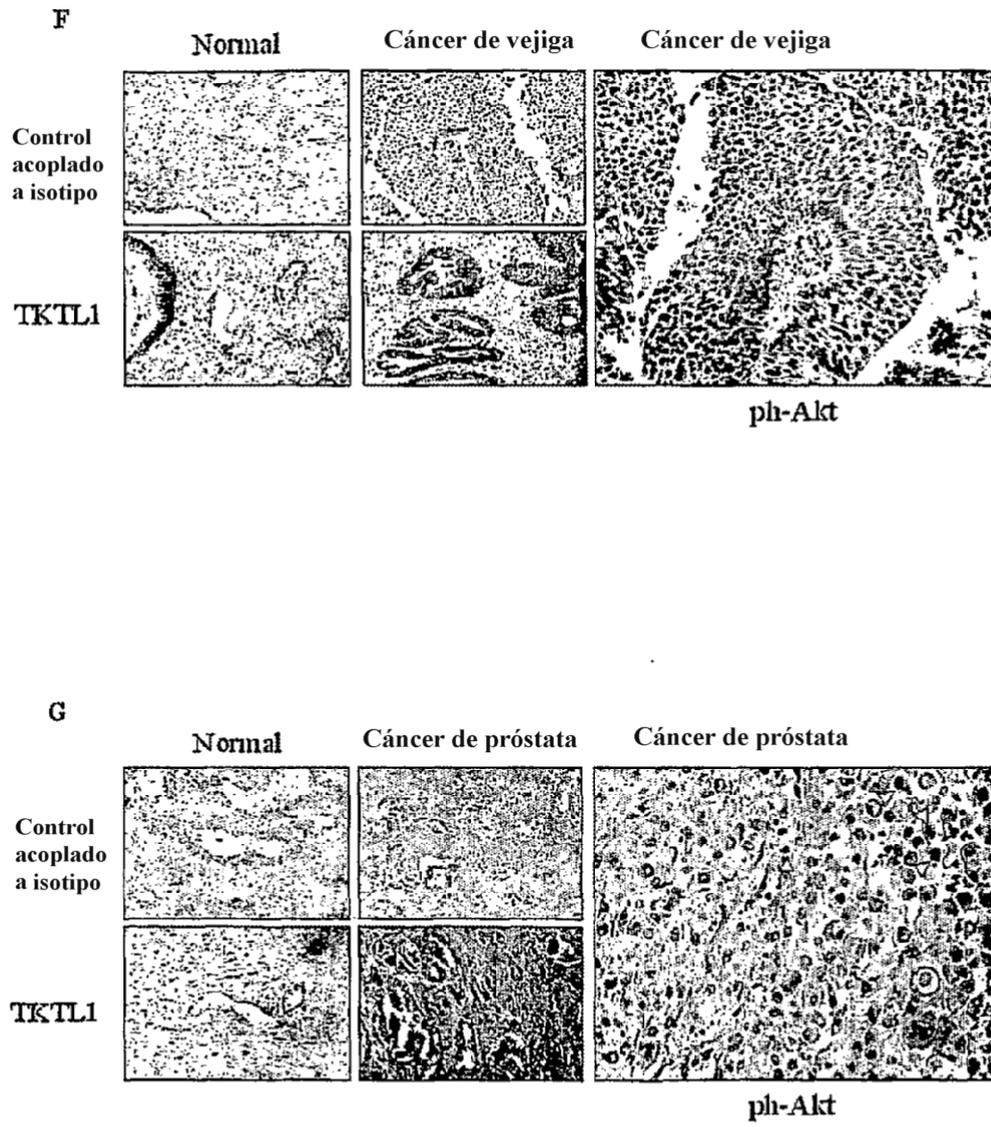
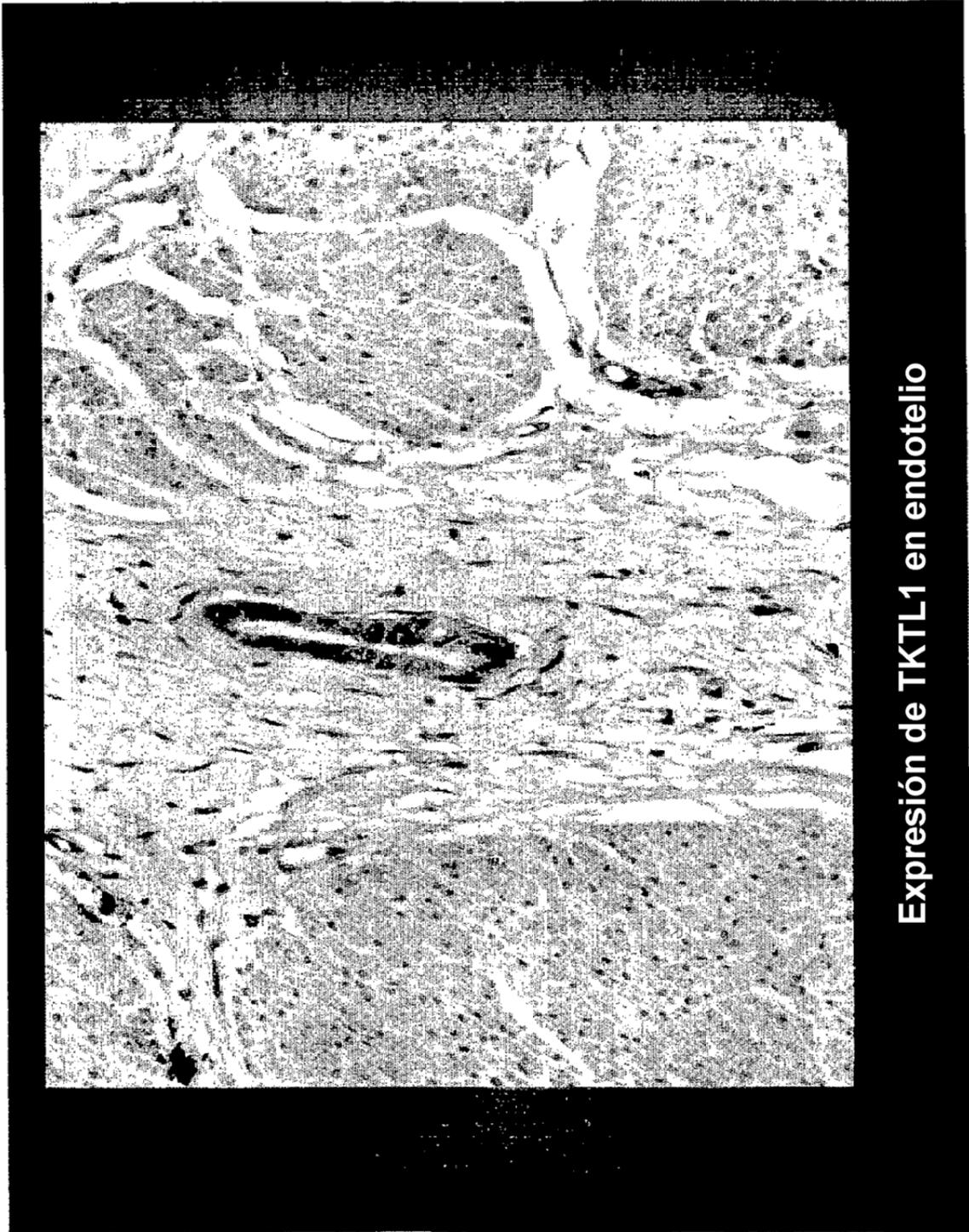
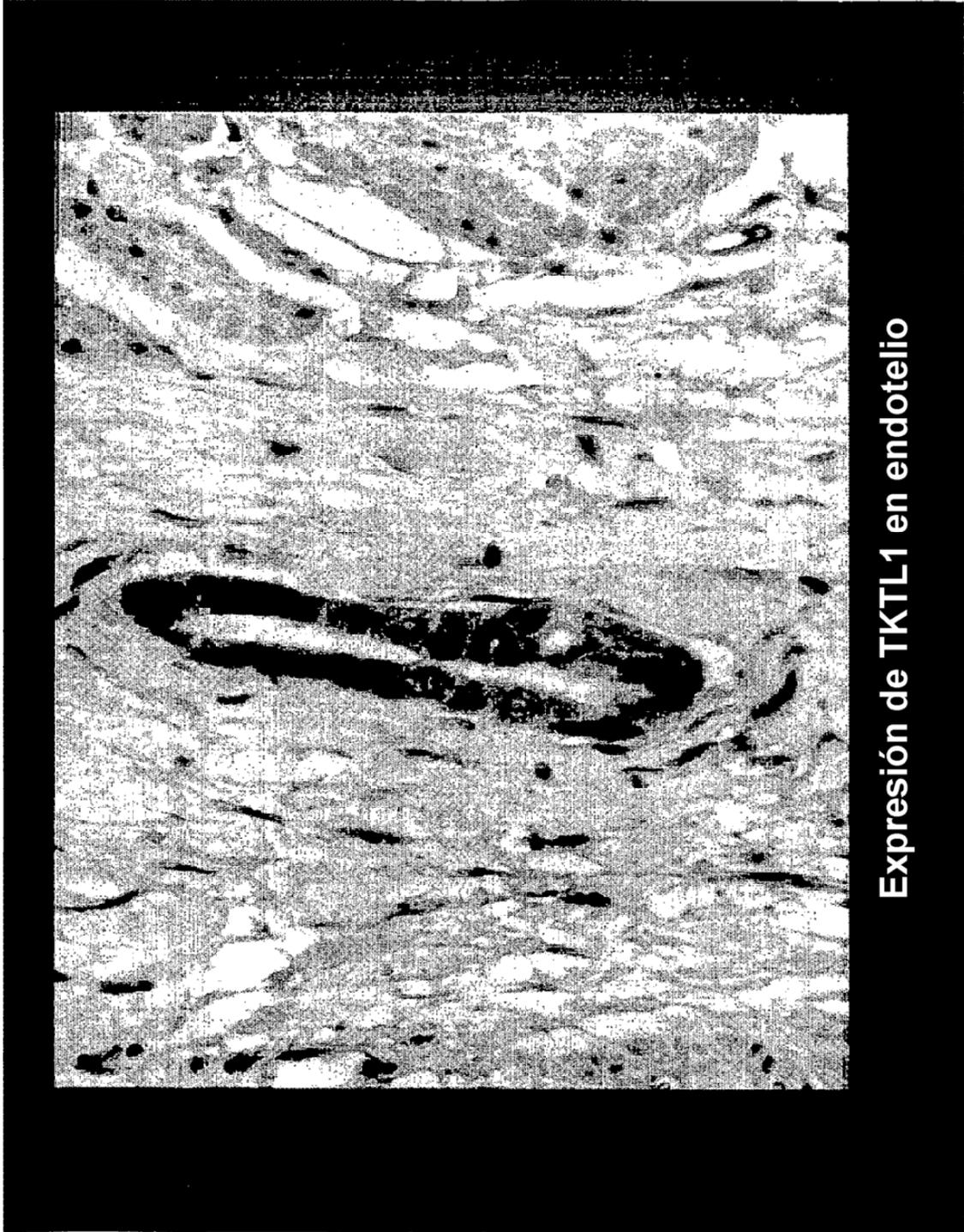


Fig.8



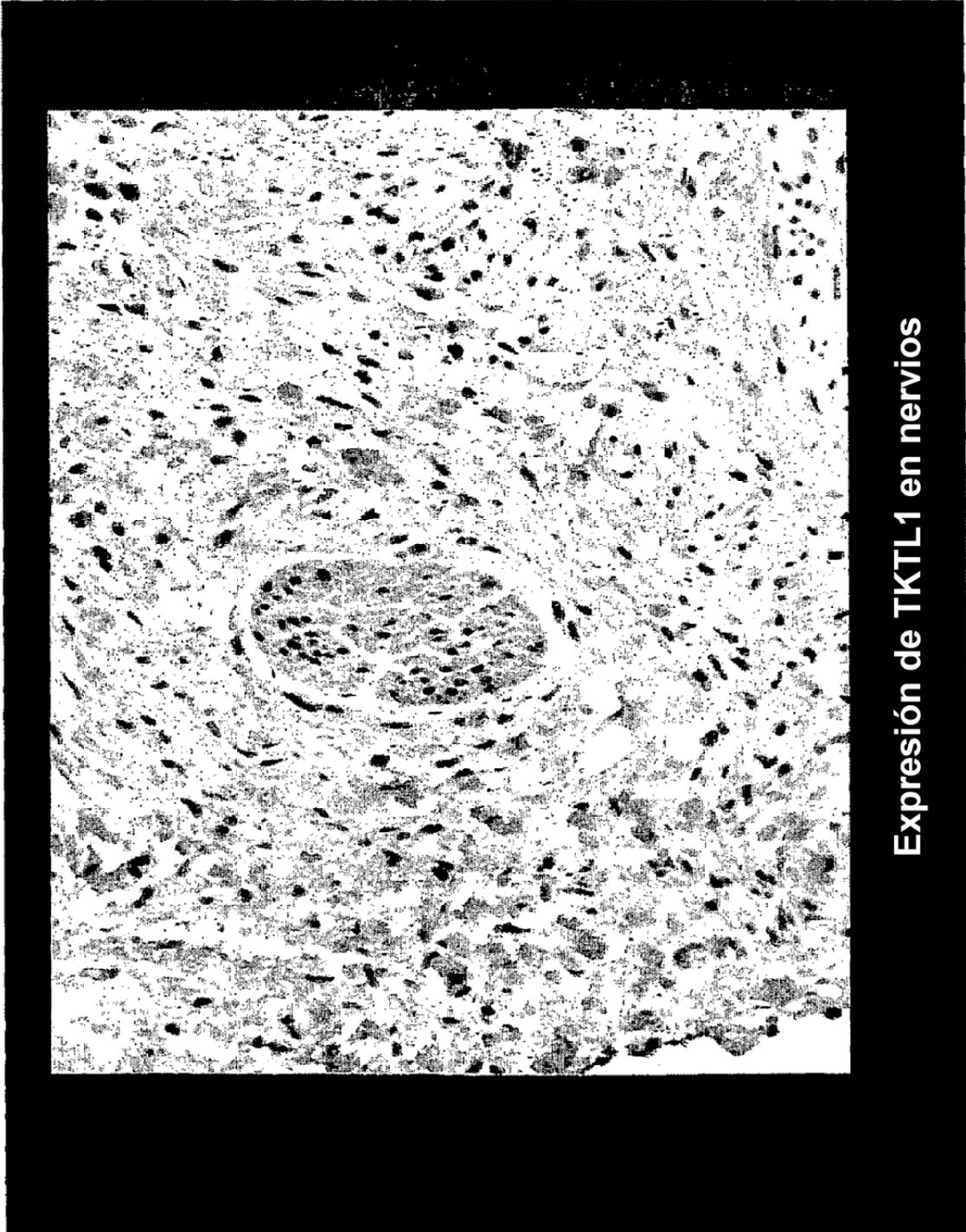
Expresión de TKTL1 en endotelio

Fig. 9



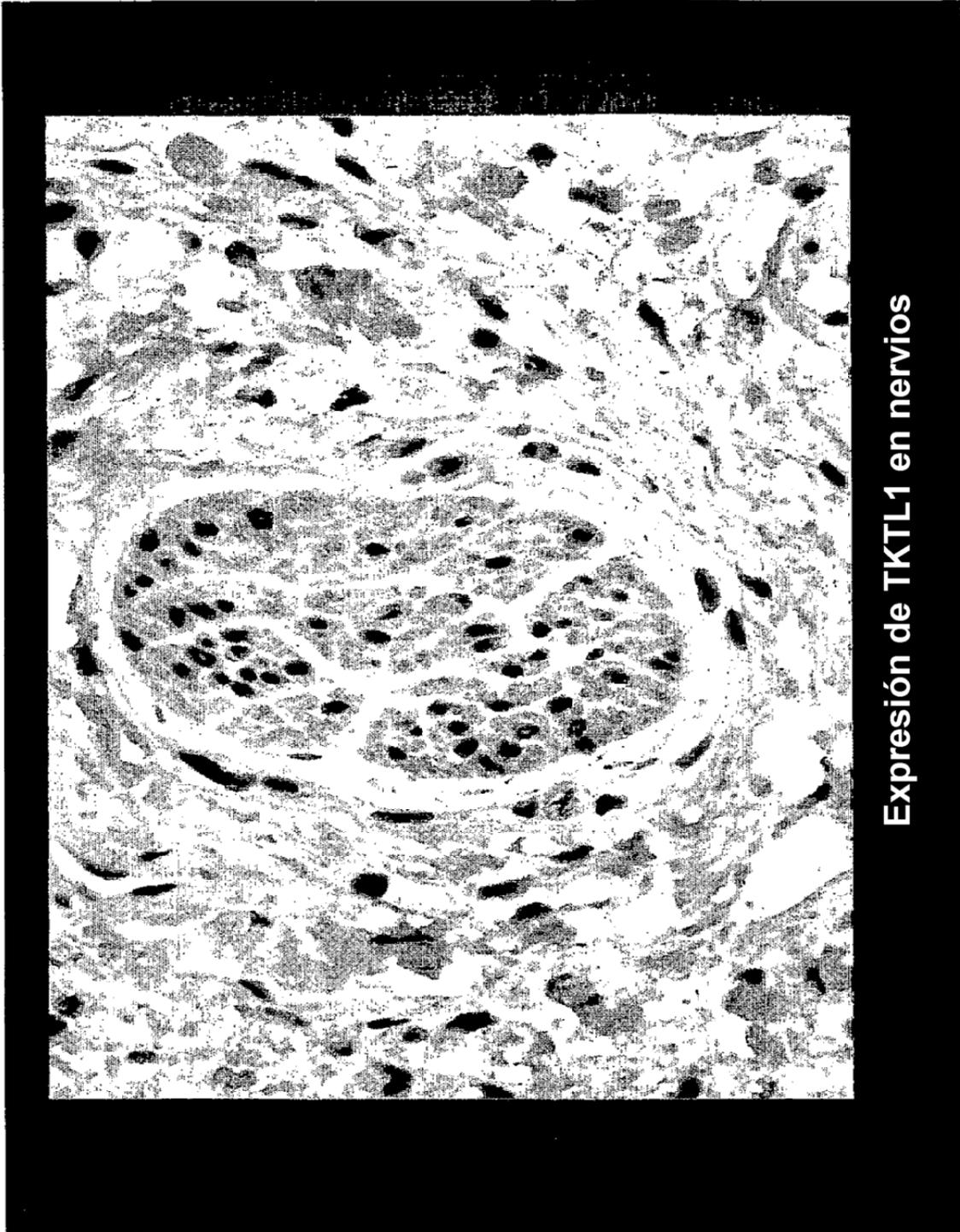
Expresión de TKTL1 en endotelio

Fig. 10



Expresión de TKTL1 en nervios

Fig. 11



Expresión de TKTL1 en nervios

Fig. 12

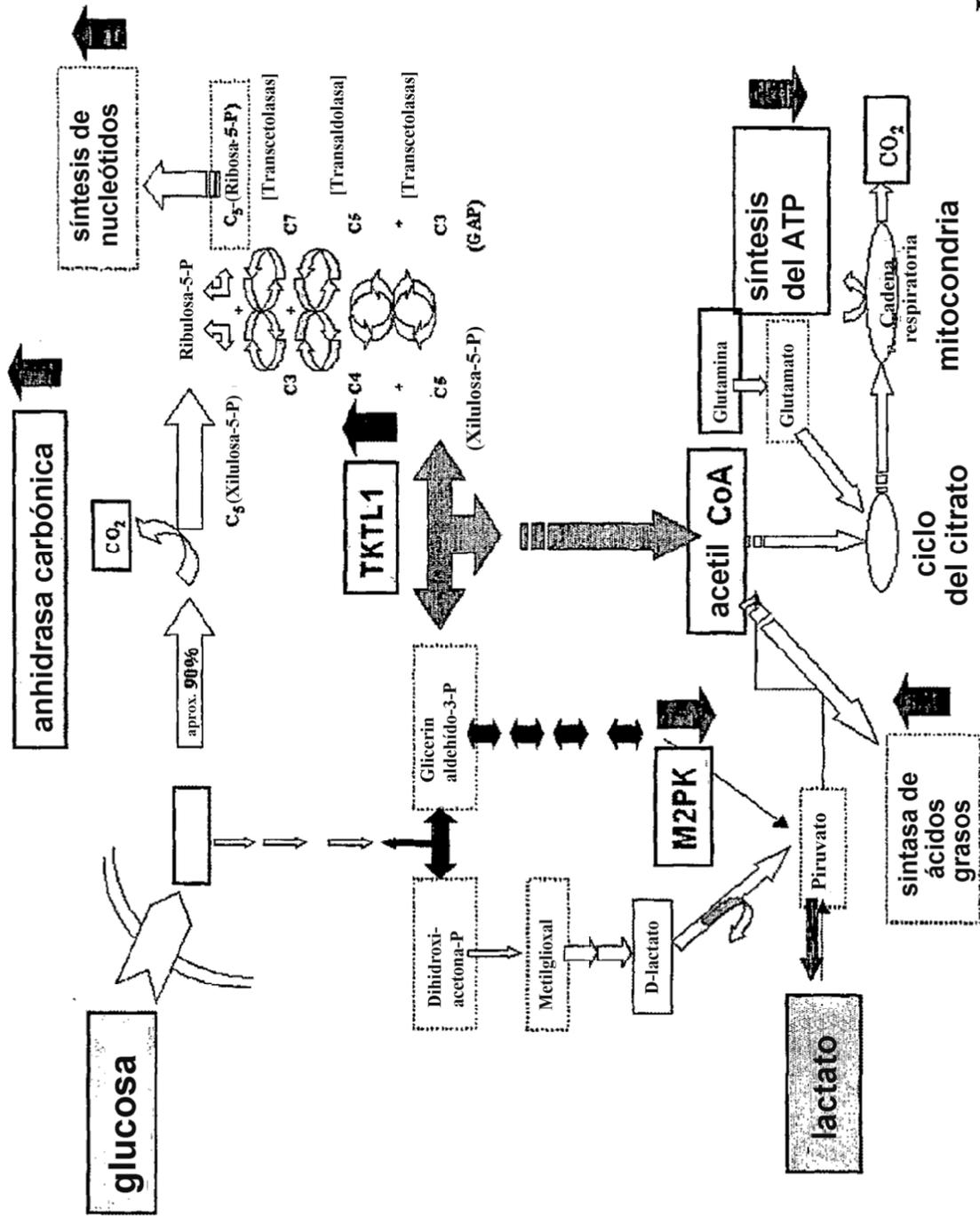


Fig. 13

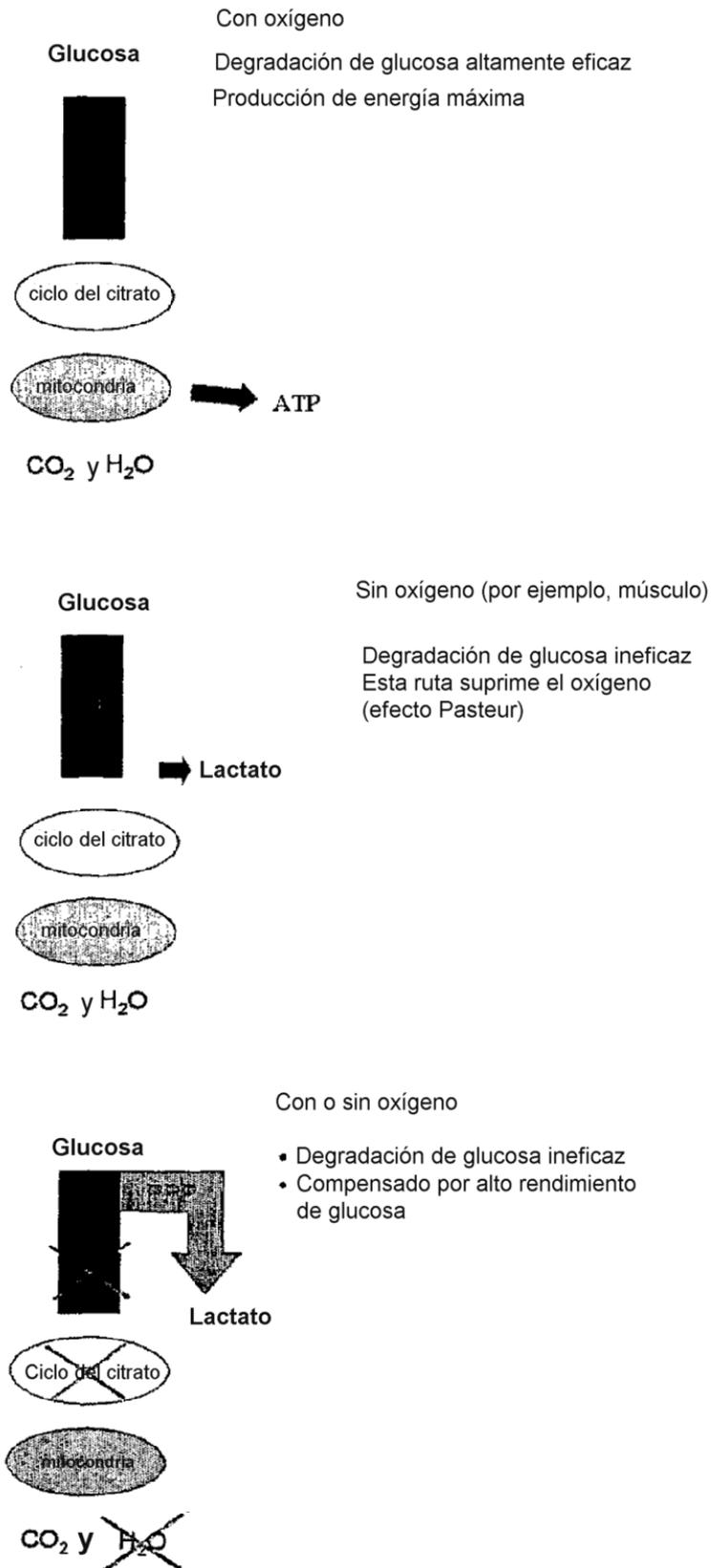
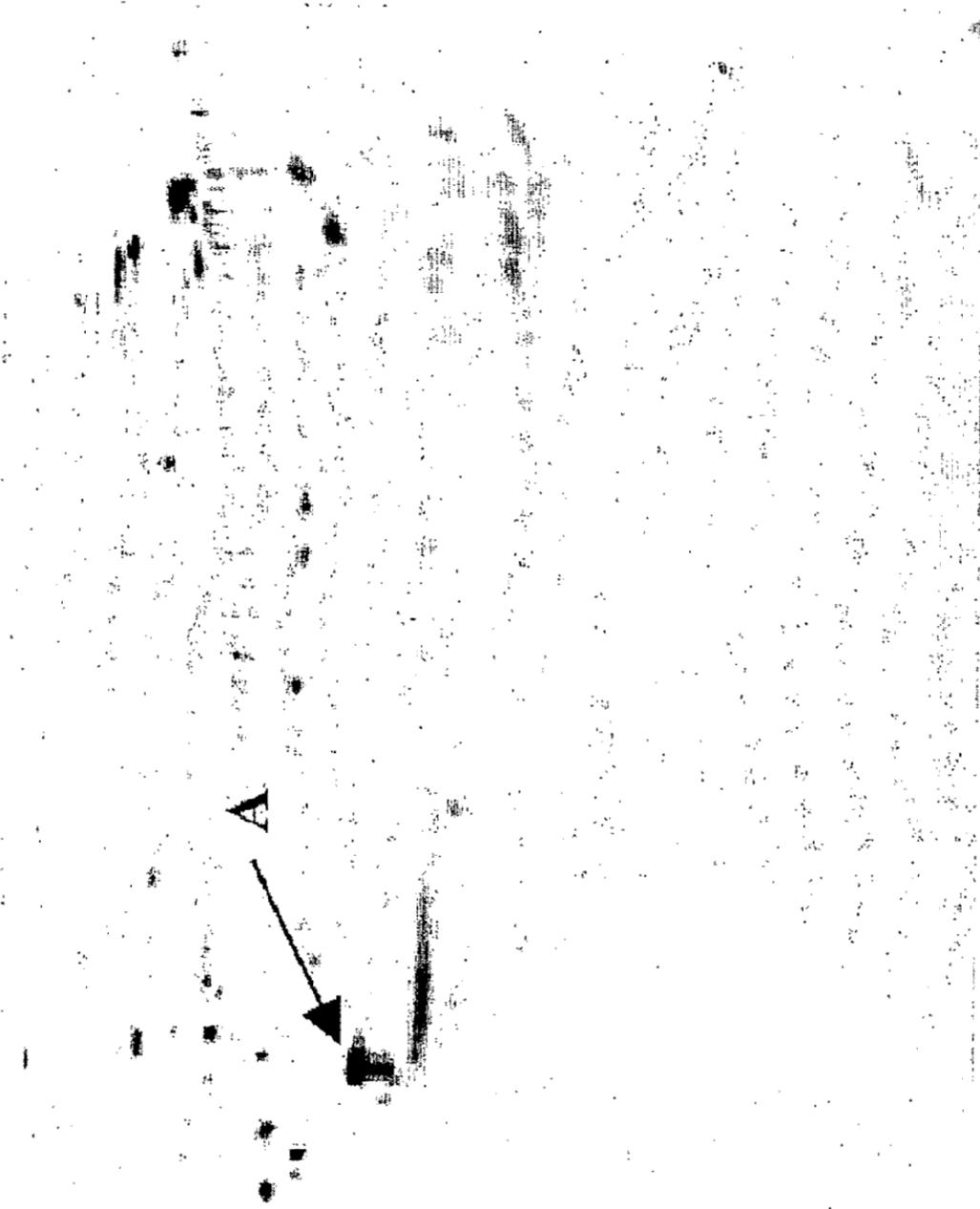


Fig. 14



Electroforesis bidimensional en gel de un complejo de multiproteína con TKTL1

Fig. 15



Isoformas de TKTL1 de alto peso molecular

Fig. 16

A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,054	0,037	0,050	0,039	0,036	0,055	0,043	0,047	0,041	0,051	0,014	0,017
B	0,043	0,036	0,039	0,044	0,034	0,048	0,039	0,037	0,043	0,056	0,017	0,015
C	0,893	0,699	0,124	0,937	0,860	0,146	0,119	0,773	0,493	0,169	0,926	0,791
D	1,189	1,005	1,703	0,790	0,639	1,047	1,369	0,420	1,533	0,258	0,303	1,539
E	1,422	1,890	0,903	1,629	1,380	1,307	0,477	1,488	1,400	1,045	1,243	1,568
F	0,911	0,576	1,380	2,158	0,701	1,045	1,344	0,289	1,206	1,638	2,010	1,454
G	1,257	1,450	0,799	1,489	1,257	1,057	1,346	0,892	0,701	1,924	1,830	1,835
H	1,530	0,803	1,322	0,519	0,506	1,503	1,256	0,493	0,620	0,913	1,772	1,134
B												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,018	1,935	1,804	1,409	2,005	1,930	1,460	2,103	1,884	1,709	0,037	0,042
B	1,480	1,993	1,635	1,993	1,920	1,488	1,703	1,939	1,794	1,504	0,036	0,039
C	1,593	1,429	1,500	1,703	1,229	1,593	1,559	1,703	1,550	1,838	1,993	1,504
D	0,273	0,493	0,300	0,180	0,320	0,228	0,219	0,302	0,320	0,250	0,183	0,248
E	0,239	0,396	0,320	0,370	0,329	0,284	0,270	0,320	0,401	0,222	0,199	0,243
F	0,410	0,399	0,370	0,323	0,385	0,299	0,378	0,322	0,399	0,461	0,295	0,348
G	0,281	0,310	0,352	0,383	0,356	0,328	0,344	0,325	0,294	0,274	0,287	0,299
H	0,193	0,190	0,218	0,301	0,317	0,170	0,194	0,253	0,199	0,207	0,242	0,322

A - Determinación por ELISA de isoformas de la proteína TKTL1

B --Actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 aislada

Fig. 17