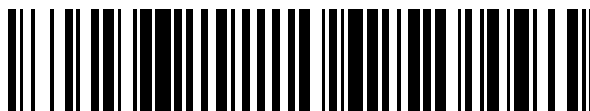


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 564**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2009** **E 09778819 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013** **EP 2344665**

54 Título: **Uso de EEF1A como biomarcador para el cribado de inhibidores de MetAP2**

30 Prioridad:

06.11.2008 EP 08019432

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

06.05.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**KELLNER, ROLAND;
ZENKE, FRANK y
BOMKE, JOERG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 402 564 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de EEF1A como biomarcador para el cribado de inhibidores de MetAP2

Área de la invención.

La presente invención hace referencia a un método para el cribado de compuestos, que inhiban la actividad de MetAP2, proporcionando un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2 y/o EEF1A, incubando al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados, y detectando la inhibición de MetAP2 determinando EEF1A con un residuo de metionina N-terminal (MetEEF1A). Otro objeto de la invención concierne a un método para la monitorización de la probabilidad de respuesta a un tratamiento de enfermedades cancerígenas, que están causadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de MetAP2, determinando MetEEF1A en una muestra biológica, tomada de un mamífero en uso de dicho tratamiento con al menos un inhibidor de MetAP2, administrado a dicho mamífero. La solicitud también hace referencia al uso de EEF1A como biomarcador.

La síntesis de proteínas procarióticas y eucarióticas se inicia con un codón AUG que especifica una metionina N-terminal. En la mayoría de las proteínas celulares, la metionina se elimina de manera cotraduccional, y esta eliminación de la metionina iniciadora se requiere para una función adecuada de estas proteínas, es decir, actividad, localización y estabilidad. El procesamiento de la metionina N-terminal se logra mediante la acción de dos metaloproteasas intracelulares: la metionina aminopeptidasa 1 y 2 (MetAP1 y MetAP2). Las MetAP1 y MetAP2 son diferentes en una serie de aspectos clave. Dichos aspectos incluyen la especificidad del sustrato y el control de la expresión. Por ejemplo, MetAP2 puede procesar un conjunto limitado de proteínas intacto por parte de MetAP1. Además, la inducción de la expresión de MetAP2 está asociada a la proliferación celular, mientras que MetAP1 es expresado de manera constitutiva. Más recientemente, se ha mostrado que MetAP1 juega un papel en la fase G2/M del ciclo celular, mientras que la inhibición de MetAP2 conduce a la obstaculización de la G1.

El papel biológico de MetAP2 no se entiende bien, sin embargo, la enzima juega un papel importante en el desarrollo embrionario y la vasculogénesis, y la inhibición de la actividad enzimática se considera una aproximación atractiva para la terapia del cáncer. El producto natural fumagilina y su análogo TNP-470 bloquean de manera selectiva la actividad de MetAP2 e inhibe la proliferación de células endoteliales. Aunque el compuesto anti angiogénico TNP470 inhibe MetAP2 fuertemente y de manera irreversible, su uso terapéutico se encuentra limitado debido a una toxicidad significativa. Un conocimiento más profundo sobre las interacciones del sustrato puede ayudar a explicar los efectos anti-angiogénicos y antitumorales de los inhibidores de MetAP2.

Ha sido postulado recientemente, que las células sensibles a los fármacos pueden tener sustratos específicos de MetAP2 que no pueden ser procesados por la enzima del tipo 1. Varias aproximaciones se tomaron, por tanto, para determinar si las células tratadas con los fármacos tienen defectos específicos en el procesamiento de la metionina. La fumagilina, TNP-470 y A-832234 se utilizaron en ensayos basados en células para estudiar la inhibición de MetAP2 y para identificar proteínas marcadoras nuevas y robustas para la inhibición de MetAP2.

La proteína constitutiva o "housekeeping", gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se detectó después de la inhibición selectiva del procesamiento de la metionina hace casi una década. Un ensayo inicial para la enzima MetAP2 celular activa se conoce a partir de Turk et al. (1999) Chem & Biol 6: 823-833, el cual está basado en el desplazamiento de movilidad en gel bidimensional de la enzima GAPDH de células tratadas con TNP-470. El ensayo sólo puede utilizarse para los inhibidores de MetAP2 irreversibles. Wang et al. (2008) PNAS 105(6): 1838-1843, inició esfuerzos para establecer un ensayo para diferenciar variantes de GAPDH con metionina N-terminal no procesada, a partir de GAPDH procesada madura- suponiendo que la electroforesis por isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés) unidimensional podría separar las variantes de GAPDH con y sin metionina N-terminal, y que la IEF seguida de inmunoblot podría proporcionar un ensayo para las variantes de GAPDH como un marcador para la inhibición celular de MetAP2. Sin embargo, la GAPDH fue identificada en células tratadas y no tratadas del carcinoma de colon humano HCT-116 con una secuencia N-terminal que carecía de metionina. Hasta ahora, no se ha podido establecer un sistema de detección robusto y fiable para monitorizar este supuesto marcador.

El arte previo describe además la detección de la proteína 14-3-3 γ como biomarcador para MetAP2 (WO 2002/39990 A2). Se ha informado que la isoforma 14-3-3 γ es inducida cuando un compuesto inhibidor de MetAP2 se aplica a células de mamíferos. Pertenece a la familia de proteínas 14-3-3 γ . La detección específica de la isoforma 14-3-3 γ se ve obstaculizada por el hecho de que las isoformas relacionadas muestran propiedades muy similares en los estudios analíticos de proteínas, e incluso más específicamente, debe detectarse una isoforma 14-3-3 γ modificada.

Warder et al. (2008) J Proteome Res 7: 4807-4820, describió el descubrimiento, identificación, y caracterización de los marcadores farmacodinámicos candidatos de la inhibición de MetAP2. Los sustratos específicos de MetAP2 recién descubiertos incluían tioredoxina-1 (Trx-1), SH3 de unión a proteínas ricas en ácido glutámico (SH3BGRL) y

el factor de elongación 2 eucariótico (e-EF2). Los estudios además confirmaron la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la ciclofilina A (CypA) como sustratos de MetAP2.

Por lo tanto, el problema técnico que conforma la base de la presente invención es proporcionar un método para el cribado de compuestos, que inhiban de manera efectiva la actividad proteolítica de MetAP2. Es otro problema de la presente invención proporcionar un biomarcador que permita la identificación y caracterización de las propiedades de inhibición de MetAP2 de tales compuestos in-vitro e in-vivo. Es aún otro problema proporcionar sustancias para la detección de la actividad modificada de MetAP2, lo cual hace posible una monitorización simple y rápida de enfermedades dependientes de la proliferación.

La presente invención resuelve el problema proporcionando un método para el cribado de compuestos que inhiban la actividad de la metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2), que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2 y/o el factor de elongación de traducción eucariótico 1 alfa (EEF1A), en donde el sistema se selecciona a partir del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,

(b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados, y

(c) detectar la inhibición de MetAP2 determinando el EEF1A con el residuo de metionina N-terminal (MetEEF1A).

Se ha demostrado, de manera sorprendente, por parte de los inventores, que la proteína EEF1A es un sustrato para MetAP2, pero parece no estar procesado por MetAP1. Consecuentemente, la proteína mencionada EEF1A representa un marcador novedoso que es muy adecuado para monitorizar el nivel de la actividad de MetAP2. Se ha observado de manera inesperada que el biomarcador subyacente EEF1A de la invención, es procesado diferencialmente después de estudios basados en células utilizando inhibidores de MetAP2. Debido a que la metionina iniciadora del EEF1A no se divide después de la inhibición farmacológica de MetAP2, la proteína lleva una metionina N-terminal en lugar de un residuo de glicina acetilado.

La proteína EEF1A ya ha sido descrita en el estado del arte mediante secuencia y otras características; sin embargo, una conexión con MetAP2 no ha sido identificada anteriormente. El factor de elongación de traducción eucariótico 1 alfa (EEF1A), es una proteína citoplásmica de 50 kD de la familia del factor de elongación de unión a GTP (subfamilia EF-Tu/EF-1A). El factor está implicado en la biosíntesis de proteínas y se observa, en especial, en un complejo de exportación nuclear que está compuesto de Exportina-5 (XPO5), EEF1A, Ran y ARNt aminoacilado. La interacción con la XPO5 promueve la unión dependiente de GTP del aminoacil- ARNt al sitio A de los ribosomas. La mencionada proteína EEF1A puede ser denominada de otra forma, tal como por ejemplo eEF1A, EF1A, EF1 α , EF1alfa, EF1a, miembro 7 del conjunto de receptores de leucocitos (LENG7) y el factor de elongación Tu (EF-Tu). Debe considerarse que el EF-Tu es, en realidad, una proteína de otra estructura y función.

EEF1A comprende un grupo de diferentes proteínas EEF1A1, EEF1A2, etc., que se encuentran incluidas bajo el ámbito de protección. Ambas isoformas mencionadas de manera explícita presentan N-terminales idénticos y son especialmente aplicables en el método de la invención. La referencia a una isoforma de EEF1A específica no debe entenderse que limita el ámbito de protección, ya que los miembros proteicos del grupo representado por EEF1A pueden ser reemplazados entre sí. El contenido de la presente especificación, en lo referente a una isoforma específica de EEF1A1, tal como EEF1A1, se considera válida y se puede aplicar sin restricciones a otros miembros del grupo EEF1A, si es adecuado en el mismo. Además, no se excluye que se caractericen más isoformas de EEF1A, lo que también muestra una elevada homología con algunos o incluso todos los miembros del grupo EEF1A, en particular en el N-terminal, además de una fuerte afinidad de sustrato con MetAP2. Por lo tanto, el contenido de la presente invención no se encuentra restringido a las isoformas actualmente conocidas de EEF1A, sino que cubrirán cada isoforma de EEF1A de elevada homología con las mismas y una elevada afinidad de sustrato con MetAP2. La isoforma de EEF1A puede ser asignada fácilmente mediante los números de acceso (por ejemplo, P68104, Q05639), que son en general aceptados y se encuentran establecidos en numerosas bases de datos, tales como GenBank, SwissProt, y similares.

En la primera etapa (a), se proporciona un sistema celular. El sistema celular se define como cualquier sujeto, siempre que el sujeto comprenda células. Por tanto, el sistema celular puede seleccionarse del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos. El alcance del sistema celular también comprende partes de tales entidades biológicas, es decir, muestras de tejidos, órganos y mamíferos. Deberá entenderse que cada sistema celular en el orden mencionado representa una muestra del respectivo sistema siguiente.

En particular, la muestra celular se toma in-vivo o in-situ de un mamífero que va a ser evaluado. La extracción de una muestra celular cumple con la buena práctica médica. Las muestras biológicas pueden tomarse de cualquier clase de especie biológica, pero la muestra se toma en especial de un animal de laboratorio o de un humano, de manera más preferente una rata, ratón o humano, de manera más preferente un humano.

En la presente invención, el sistema celular puede además comprender un fluido biológico, en donde la muestra de fluido corporal consiste en sangre, suero, plasma, saliva u orina. Resulta también preferente tomar una muestra de tejido mediante biopsia, una dosis tomada especialmente de la localización de la dolencia. Las muestras biológicas pueden originarse a partir de cualquier tejido, tal como el útero, glándula pituitaria, hígado, cerebro, colon, mama, tejido adiposo, etc. La muestra puede ser purificada para eliminar las sustancias perturbadoras, tales como los inhibidores para la formación de enlaces de hidrógeno.

La muestra celular hace referencia a cualquier tipo de células primarias o células modificadas genéticamente, bien en su estado aislado, en cultivo o como línea celular, siempre que sean capaces de expresar MetAP2 y/o EEF1A, preferentemente MetAP2 y EEF1A.

Deberá entenderse que las variantes, mutantes, partes o secuencias de proteínas homólogas de MetAP2 que tengan la misma función, se encuentran incluidas en el alcance de la definición, además de la protección. El grado de modificación entre la secuencia original y sus derivados se encuentra inevitablemente limitado por la necesidad del reconocimiento del sustrato y el corte de metionina. De manera preferente, la homología asciende a al menos 85%, más preferentemente al menos 95%, de manera más preferente al menos 98%. Las posibles modificaciones comprenden la delección, inserción, sustitución, modificación y adición de al menos un aminoácido, o la fusión con otro ácido proteico. Las células modificadas genéticamente son capaces de expresar la proteína MetAP2 mediante transfección con vectores apropiados que albergan el correspondiente gen o partes del mismo. De manera preferente, las células recombinantes son de origen eucariótico.

El contenido previo referente a las modificaciones de MetAP2 se considera válido y se puede aplicar sin restricciones a las modificaciones de EEF1A si fueran oportunas. Como resultará obvio para el experto en el arte, no deberá interpretarse que la presente invención está limitada a la proteína de longitud completa EEF1A de SEQ ID Nos: 1 y 2 (ver la Figura 11). Fragmentos fisiológicos o artificiales de EEF1A, modificaciones secundarias de EEF1A, modificaciones dependientes de la especie, además de variantes alélicas de EEF1A, también son abarcadas por la presente invención. A este respecto, se entiende que una "variante alélica" representa el producto génico de una de dos o más formas diferentes de un gen o una secuencia de ADN que puede existir en un locus genético único. Los fragmentos artificiales abarcan, de manera preferente, un péptido producido de manera sintética o mediante técnicas recombinantes, el cual comprende al menos el N-terminal de interés diagnóstico que consiste en, al menos, los 20 aminoácidos contiguos N-terminales tal como se derivan de la secuencia revelada en SEQ ID Nos: 1 o 2, de manera preferente, al menos los 40 aminoácidos contiguos N-terminales, de manera más preferente al menos los 60 aminoácidos contiguos N-terminales, de manera sumamente preferente al menos los 82 aminoácidos contiguos N-terminales. Resulta particularmente preferente que tales fragmentos N-terminales muestren una identidad completa con los correspondientes N-terminales de las proteínas de acuerdo a SEQ ID Nos: 1 y 2, a fin de asegurar el reconocimiento completo del sustrato. Un fragmento de ese tipo puede ser utilizado, de manera ventajosa, como un estándar en un inmunoensayo. De manera preferente, EEF1A de longitud completa o una variante fisiológica de este marcador es detectado en un método de acuerdo a la presente invención.

En un modo de realización más preferente de la presente invención, una línea celular se proporciona en la etapa (a) del método de cribado. Las líneas celulares más preferentes de la presente invención son las células de endotelioma cerebral de ratón (bEND.3), células de carcinoma de colon humano (HCT116), células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y/o células de fibrosarcoma humano (HT1080).

La muestra celular se almacena, por ejemplo congelada, cultivada durante un cierto periodo o sometida inmediatamente al proceso de la etapa (b). Antes de incubarla con compuestos a ser cribados, la muestra celular se divide en múltiples partes. Al menos dos partes se proporcionan; una se utiliza para el cribado, mientras que la otra se utiliza como control. De manera preferente, la cantidad de partes para el cribado excede la cantidad de partes de control. De manera habitual, las numerosas partes se someten a cribado de alto rendimiento (del inglés high-throughput screening).

Tal como se utiliza en la presente patente, un "compuesto con actividad inhibidora de MetAP2" es un agente que bloquea al menos parte de los efectos biológicos de MetAP2, lo cual hace referencia a cualquier factor, agente, compuesto, ya sea endógeno o exógeno en origen, que sea capaz de unirse a, e interactuar con MetAP2 y por lo tanto de detener ciertos efectos biológicos de MetAP2. El experto en el arte sabría que, por ejemplo, uno de los efectos biológicos de MetAP2 es promover la proliferación celular.

Los compuestos están compuestos de estructuras químicas y/o biológicas capaces de interactuar con una molécula diana. En la presente patente, cualquier componente de la señalización de MetAP2 se considerará como "molécula diana", que no está limitada a la proteína diana MetAP2, sino que puede además comprender el gen codificador o un producto génico del mismo, o una proteína reguladora, o un componente de una vía de transducción de señales que comprende dicho gen o productos génicos de la misma. Por consiguiente, la interacción específica de compuestos puede implicar o bien la mera selección, o la inducción de las modificaciones en la función celular, o puede incluso incluir ambos efectos de manera simultánea.

Los compuestos a ser cribados en el método de la invención no se encuentran restringidos de ninguna manera. En particular, los compuestos se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos, péptidos, carbohidratos, polímeros, pequeñas moléculas que tienen un peso molecular entre 50 y 1.000 Da, y proteínas. Estos compuestos se encuentran disponibles, a menudo, en genotecas. Resulta preferente incubar un único compuesto dentro de una parte distintiva de la muestra celular. Sin embargo, es también posible investigar el efecto cooperativo de los compuestos mediante la incubación de al menos dos compuestos dentro de una parte. Una parte adicional de células es incubada de manera simultánea en ausencia de compuestos.

El término “incubación” denota el contacto de los compuestos con las células durante un periodo definido, que depende de la clase de compuestos y/o de la diana. El proceso de incubación también depende de varios parámetros diferentes, por ejemplo, el tipo de célula y la sensibilidad de detección, cuya optimización sigue los procedimientos rutinarios conocidos para los expertos en el arte. El procedimiento de incubación puede ser realizado sin conversión química o puede implicar una reacción bioquímica. Añadir soluciones químicas, y/o aplicar procedimientos físicos, por ejemplo, el impacto del calor, puede mejorar la accesibilidad de las estructuras diana en la muestra. Los productos de incubación específicos se forman como resultado de la incubación.

En la etapa (c), la identificación de compuestos efectivos en el contexto de la invención, se lleva a cabo indirectamente mediante la determinación de la presencia de EEF1A con metionina N-terminal. La determinación se lleva a cabo en un momento específico y se correlaciona con la fuerza de la señal al comienzo del experimento y con el control positivo/negativo. O el sistema de control no se incuba con los compuestos (control negativo), o bien el sistema de control se incuba con un compuesto estándar que no tiene actividad inhibitoria de MetAP2 (control negativo), o bien un compuesto estándar que tiene actividad de inhibición de MetAP2 (control positivo). La actividad es revelada por un cambio en el procesamiento de proteínas, es decir, la metionina iniciadora no se divide después del tratamiento con un compuesto de inhibición potencial. Las comparaciones por pares se realizan entre cada uno de los tratamientos. Una comparación de un par implica los datos de procesamiento de proteínas para el biomarcador dado EEF1A bajo una condición de tratamiento determinada en comparación a los datos de procesamiento de proteínas para esta proteína bajo una condición de un segundo tratamiento. La comparación se lleva a cabo utilizando una técnica estadística adecuada con al ayuda de programas conocidos y comercialmente disponibles.

La detección puede realizarse aplicando la célula intacta a un método de detección de elección. Resulta preferente, sin embargo, proporcionar extractos celulares en primer lugar. La lisis celular puede llevarse a cabo en tampones de lisis adecuados y bien conocidos, lo que puede causar un choque osmótico y perforar la membrana celular. La estabilidad de la estructura celular puede también ser destruida mediante tratamiento con fuerzas mecánicas, tales como un molino de bolas, una prensa French Press, ultrasonido, etc., por degradación enzimática de la pared celular y la membrana celular, respectivamente, y/o por la acción de tensioactivos. El biomarcador puede ser purificado adicionalmente para eliminar sustancias perturbadoras o el biomarcador EEF1A puede estar concentrado en la muestra. El proceso de purificación o proceso downstream y/o la concentración se llevan a cabo, de manera preferente, mediante el método de precipitación, diálisis, filtración en gel, elución en gel, o cromatografía, tal como cromatografía HPLC o cromatografía de intercambio iónico. Se recomienda combinar varios métodos para mejores rendimientos.

Pruebas adecuadas para detectar la inhibición de MetAP2 son conocidas por los expertos en el arte o pueden ser fácilmente diseñadas como una cuestión de rutina. Muchos diferentes tipos de ensayos se conocen, ejemplos de los cuales se exponen a continuación. Aunque el ensayo de acuerdo a la invención puede ser cualquier ensayo adecuado para detectar y/o cuantificar la expresión de genes, la MetEEF1A se determina de manera preferente mediante sustancias que interactúan de manera específica con MetEEF1A.

El término “sustancias específicas” tal como se utiliza en la presente patente comprende moléculas con elevada afinidad con MetAP2 a fin de asegurar una unión fiable. Las sustancias son, de manera preferente, específicas a partes de la proteína. Dichas partes representan una restricción a aquellas regiones que son suficientes para la expresión de una función específica, es decir, la provisión de un determinante estructural para el reconocimiento. Todos los truncamientos se encuentran, inevitablemente, limitados por la necesidad de preservar el reconocimiento único. Sin embargo, las partes de los productos génicos pueden ser muy pequeñas. De manera preferente, las sustancias son mono-específicas a fin de garantizar una interacción exclusiva y dirigida con la diana única elegida. Se requiere particularmente, que las sustancias específicas sean capaces de discriminar entre EEF1A (por ejemplo, una proteína con un residuo de glicina acetilado en el N-terminal) y MetEEF1A (es decir, la proteína con un residuo de metionina en el N-terminal).

El reconocimiento de la proteína o de las partes N-terminales de las mismas de acuerdo con la invención pueden realizarse mediante una interacción específica con sustancias en el nivel primario, secundario y/o terciario de la estructura de una secuencia de aminoácidos. La única modificación de la secuencia de aminoácidos en el N-terminal favorece el reconocimiento de la estructura primaria. En el contexto de la presente invención, el término “reconocimiento” - sin estar limitado a ello - hace referencia a cualquier tipo de interacción entre las sustancias específicas y la diana, en particular una unión o asociación covalente o no covalente, tal como un enlace covalente,

interacciones hidrofóbicas/ hidrofílicas, fuerzas de van der Waals, pares de iones, enlaces de hidrógenos, interacciones ligando-receptor, interacciones entre el sitio de unión del anticuerpo y del epítipo, apareamiento de bases de nucleótidos, y similares. Tal asociación puede además abarcar la presencia de otras moléculas tales como péptidos, proteínas u otras secuencias de nucleótidos.

- 5 Las sustancias específicas están compuestas de estructuras químicas y/o biológicas capaces de interactuar con la molécula diana de tal manera que hace posible un reconocimiento, unión e interacción. En particular, las sustancias se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos, péptidos, carbohidratos, polímeros, pequeñas moléculas que tengan un peso molecular entre 50 y 1.000 Da y proteínas, de manera preferente ácidos nucleicos y proteínas. Las sustancias específicas expresan una sensibilidad y especificidad suficiente para asegurar una detección fiable. Una
- 10 sustancia específica tiene al menos una afinidad de 10^{-7} M para su correspondiente molécula diana. La sustancia específica tiene una afinidad de 10^{-8} M o incluso más preferente de 10^{-9} M para su molécula diana. Como será apreciado por el experto en el arte, el término específica se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen de manera significativa a la sustancia específica para MetEEF1A. De manera preferente, el nivel de unión a una biomolécula distinta a la molécula diana da como resultado una afinidad de unión de solamente
- 15 un 10% de la afinidad de la molécula diana, de manera más preferente sólo un 5% o menos. Una sustancia específica más preferente completará tanto los anteriores criterios mínimos para la afinidad además de para la especificidad.

- Las proteínas o péptidos se seleccionan, de manera preferente, del grupo que consiste en anticuerpos, citocinas, lipocalinas, receptores, lectinas, avidinas, lipoproteínas, glicoproteínas, oligopéptidos, ligandos peptídicos y
- 20 hormonas peptídicas. De manera más preferente, los anticuerpos se utilizan como sustancias específicas. "Anticuerpo" denota un polipéptido esencialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo. De acuerdo con la invención, los anticuerpos se encuentran presentes como inmunoglobulinas intactas o una cantidad de fragmentos bien caracterizados. Los fragmentos se seleccionan, de manera preferente, del grupo que consiste en fragmentos F_{ab} , fragmentos F_c , anticuerpos de cadena única (scFv), regiones variables, regiones
- 25 constantes, cadena H (V_H), y cadena L (V_L), de manera más preferente fragmentos F_{ab} y scFv. Los fragmentos, tales como los fragmentos F_{ab} y fragmentos F_c , pueden producirse mediante corte utilizando varias peptidasas. Además, los fragmentos pueden ser modificados por ingeniería genética y expresados de manera recombinante, de manera preferente los scFv.

- El término "ácido nucleico" hace referencia a un polímero sintético o natural de ADN o ARN de cadena simple o
- 30 doble que incluye, de manera alternativa, nucleótidos sintéticos, no naturales o modificados, que pueden ser incorporados en polímeros de ADN o ARN. Cada nucleótido consiste en una fracción de azúcar, una fracción de fosfato, y o bien un residuo de purina o de pirimidina. Los ácidos nucleicos son, de manera preferente, ADN o ARN de cadena doble o sencilla, cebadores, oligonucleótidos antisentido, ribosomas, enzimas de ADN, aptómeros y/o ARNip o ARN interferente pequeño, o partes de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden modificarse de manera
- 35 opcional como ADN fosforotioato, ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés) o spiegelmer. Las sondas de ácido nucleicos, particularmente preferentes, para ser utilizadas como sustancias específicas de MetAP2 son aptómeros.

- Se ha observado que los aptómeros de ADN y ARN expresan una elevada afinidad para una amplia variedad de moléculas diana. Las estructuras diana pueden comprender proteínas, péptidos y pequeñas moléculas, tales como
- 40 colorantes orgánicos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas, alcaloides, etc. Resultan más preferentes los aptómeros de ARN ya que el grupo 2'-hidroxilo disponible en el ARN promueve un par de contactos intra- e intermoleculares, siendo los últimos entre moléculas de la misma secuencia, de diferentes secuencias, o entre ARN y cualquier otra molécula que no esté compuesta por ARN. Estos ligandos de ácido nucleico pueden ser identificados por un procedimiento de selección in-vitro eficiente – el así llamado proceso SELEX (evolución sistemática de ligandos por
- 45 enriquecimiento exponencial). Debido a que el ARN es muy susceptible a la degradación nucleotídica en soluciones biológicas, los aptómeros de ARN deberían ser modificados químicamente utilizando fosforotioatos, ácidos nucleicos bloqueados, o Spiegelmers, por ejemplo. Las versiones de ARN-L de los aptómeros llamadas Spiegelmers son, especialmente, de larga vida, ya que son esencialmente inmunes a los procesos de degradación naturales. Debido a su elevada afinidad para un amplio espectro de dianas estructurales, los aptómeros actúan de manera muy similar
- 50 a los anticuerpos.

Los aptómeros pueden ser sintetizados utilizando la química de la fosforamidita estándar. Además, los aptómeros de ARN que tengan aproximadamente 30 nucleótidos, pueden ser sintetizados de manera favorable en grandes cantidades mediante transcripción in-vitro. La selección, síntesis, y purificación de aptómeros son bien conocidas por los expertos en el arte.

- 55 Las sustancias específicas pueden ser marcadas, al hacerlo el marcado depende de sus características inherentes y en el método de detección a ser aplicado, es decir, la sensibilidad requerida, fácil conjugación, requerimientos de estabilidad, e instrumentación disponible y provisiones de eliminación. Para la detección de productos de incubación específicos, los métodos aplicados dependen de los productos de incubación específicos a ser monitorizados y son bien conocidos para los expertos en el arte. Ejemplos preferentes de métodos de detección adecuados de acuerdo a

la presente invención son la luminiscencia, en particular la fluorescencia, además de coloración VIS y/o emisión radiactiva.

La luminiscencia concierne a la emisión de luz como resultado de la quimioluminiscencia, bioluminiscencia o fotoluminiscencia. La quimioluminiscencia implica la emisión de luz visible como resultado de una reacción química, mientras que la bioluminiscencia requiere la actividad de la luciferasa. La actualmente preferente fotoluminiscencia, que también es conocida como simulación de fluorescencia, está causada por la absorción de fotones, preferentemente proporcionados mediante radiación, que es liberada de nuevo como fotón con un desplazamiento en la longitud de onda de 30 a 50 nm y dentro de un periodo de aproximadamente 10^{-8} segundos. Los instrumentos para la detección por fluorescencia incluyen, pero no se limitan a los habituales fluorímetros de sobremesa, lectores de placas multipocillos de fluorescencia, fluorímetros de fibra óptica, microscopios de fluorescencia y sistemas de microchips/microfluidicos acoplados con detección de fluorescencia.

La coloración VIS denota la visualización de cualquier sustancia acromática a fin de hacerla visible a simple vista. De manera preferente, la intensidad de la coloración se mide mediante un fotómetro.

La radiación radiactiva de los isótopos se mide mediante centelleo. El proceso del centelleo líquido implica la detección de la desintegración beta dentro de una muestra, a través de la captura de las emisiones beta en un sistema de disolventes y de solutos orgánicos a los que se denomina como cóctel de centelleo. El electrón de la desintegración beta emitido por isótopos radiactivos tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P y ^{35}S en la muestra excita la molécula de disolvente, la que a cambio transfiere la energía al soluto. La emisión de energía del soluto (fotón de luz) se convierte en una señal eléctrica mediante un tubo fotomultiplicador dentro del contador de centelleo. El cóctel debe además actuar como un agente solubilizante que mantiene una suspensión uniforme de la muestra. Los fotones de rayos gamma a menudo surgen como resultado de otros procesos de desintegración (series de desintegración) para eliminar el exceso de energía del núcleo recientemente formado. No tienen masa y producen poca, si acaso alguna, ionización directa por colisión a lo largo de su trayectoria. Los fotones gamma se absorben para la detección y cuantización mediante uno o más de tres mecanismos: El efecto Compton, el efecto fotoeléctrico y la producción de pares. Un isótopo de desintegración gamma favorable de la presente invención es ^{125}I .

Un método de marcado no se encuentra particularmente limitado siempre que un marcador sea detectado fácilmente. Una "sustancia específica marcada" es una que está enlazada, ya sea de manera covalente a través de un conector o un enlace químico, o de manera no covalente a través de interacciones iónicas, de van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno, a un marcador de tal manera que la presencia de la proteína MetEEF1A pueda ser detectada mediante la detección de la presencia del marcador enlazado al biomarcador.

El ligamiento covalente de un anticuerpo anti-MetEEF1A a una enzima puede realizarse mediante diferentes métodos, tales como el acoplamiento con glutaraldehído. Ocurre tanto que la enzima y el anticuerpo se entrecruzan con glutaraldehído a través de grupos de aminoácidos libres, como que los productos derivados de las enzimas y anticuerpos conectados se eliminan. En otro método, la enzima se acopla al anticuerpo a través de los residuos de azúcar si es una glicoproteína, tal como la peroxidasa. La enzima es oxidizada por periodato de sodio y entrecruzada directamente con grupos de aminoácidos del anticuerpo. Otras enzimas que contienen carbohidratos pueden también acoplarse al anticuerpo de esta manera, sin embargo algunas veces se observa una pérdida en la actividad debida a la oxidación, por ejemplo, una actividad disminuida de la fosfatasa alcalina. El acoplamiento de enzimas puede también realizarse mediante el entrecruzamiento de los grupos de aminoácidos del anticuerpo con grupos libres de tiol de una enzima, tal como la β -galactosidasa, utilizando un conector heterobifuncional, tal como succinimidil 6-(N-maleimido) hexanoato.

La unión inmunológica específica de un anticuerpo a una proteína puede detectarse directa o indirectamente. Los marcadores directos incluyen etiquetas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionucleidos, y similares, unidos al anticuerpo. Puede utilizarse un anticuerpo marcado con yodo- 125 (^{125}I). Un ensayo de quimioluminiscencia utilizando un anticuerpo quimioluminiscente específico para el marcador de la proteína es adecuado para la detección sensible, no radiactiva de niveles de proteínas. Un anticuerpo marcado con fluorocromo es también adecuado. Ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina. Marcadores indirectos incluyen varias enzimas bien conocidas en el arte, tal como la peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina (AP), -galactosidasa, ureasa y similares. Un sistema de detección de peroxidasa de rábano puede ser utilizado, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), lo que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Un sistema de detección de fosfatasa alcalina puede ser utilizado con el sustrato cromogénico p-nitrofenilfosfato, por ejemplo, lo cual produce un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar, un sistema de detección de β -galactosidasa puede ser utilizado con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranososa (ONPG), lo cual produce un producto soluble detectable a 410 nm. Un sistema de detección de ureasa puede ser utilizado con un sustrato, tal como urea- púrpura de bromocresol.

De manera preferente, los anticuerpos se encuentran marcados con fracciones detectables, lo que incluye, pero no se limita a, colorante fluorescente, por ejemplo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregón™,

rodamina, rojo Texas, tetraodamina isotiocianato (TRITC), Cy3, Cy5, etc., marcadores fluorescentes, por ejemplo proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) ficoeritrina, etc., compuestos de auto-deactivación fluorescente que se activan mediante proteasas asociadas a tumor, enzimas, por ejemplo luciferasa, HRP, AP, etc., nanopartículas, biotina, digoxigenina y similares.

- 5 De manera preferente, los ácidos nucleicos están marcados con digoxigenina, biotina, sustancias quimioluminiscentes, colorantes fluorescentes, perlas magnéticas, partículas coloidales, reactivos densos en electrones, enzimas, todos ellos bien conocidos en el arte, o con isótopos radiactivos. Los isótopos preferentes para marcar los ácidos nucleicos en el alcance de la invención son ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , o ^{125}I , de manera más preferente ^{32}P , ^{33}P , or ^{125}I .
- 10 Una variedad de técnicas de inmunoensayos, que incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos, pueden ser utilizadas. El término "inmunoensayo" abarca técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA), tal como la técnica de inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA) e inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA), además de inmunoensayos por electroforesis capilar (CEIA), radioinmunoensayo (RIA);
- 15 ensayos inmunoradiométricos (IRMA), inmunoensayos de polarización fluorescente (FPIA) y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, tales inmunoensayos pueden automatizarse. Los inmunoensayos pueden también ser utilizados en conjunción con fluorescencia inducida por láser. Los inmunoensayos que utilizan liposomas, tales como inmunoensayos liposomales de inyección de flujo e inmunosensores liposomales, son también adecuados para su uso en la presente invención. Además, los ensayos de nefelometría, en los que la
- 20 formación de complejos proteína/ anticuerpo da como resultado una difusión de la luz aumentada que se convierte a una señal de tasa máxima en función de la concentración del marcador, son adecuados para su uso en los métodos de la presente invención.

- Por ejemplo, los anticuerpos se utilizan como sustancias específicas a MetEEF1A y los productos de incubación se detectan mediante el marcado de los anticuerpos, de manera preferente por ensayo ELISA, RIA, inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo de partículas solubles (SPIA) o ensayo western blot.
- 25

- Los componentes de los ensayos ELISA son enzimas que se encuentran enlazadas a un compañero de la reacción inmunológica. El antígeno trazador (derivado del analito) de MetEEF1A se marca, de manera preferente, en el ensayo competitivo ELISA utilizando un anticuerpo de captura única (de aquí en adelante denominado primario), mientras que el anticuerpo se marca de manera preferente en el ensayo ELISA no competitivo, que comprende, de
- 30 manera preferente, la precipitación del complejo antígeno- anticuerpo por un segundo anticuerpo (de aquí en adelante denominado como secundario) que se dirige a otro epítipo de MetEEF1A distinto del anticuerpo primario. Los complejos que consisten en antígeno y dos anticuerpos se denominan también complejos tipo sándwich. La detección comprende la subsiguiente conversión enzimática de un sustrato a un producto, de manera preferente un producto coloreado, que es reconocido por coloración visual, bioluminiscencia, fluorescencia o la medición de
- 35 señales eléctricas (electrodo enzimático). Las enzimas favorables para el marcado en la presente invención son conocidos por el experto en el arte, tal como la peroxidasa (por ejemplo, HRP), cloranfelicil acetiltransferasa (CAT), proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), glutatión S-transferasa (GST), luciferasa, β -galactosidasa y AP.

- Adicionalmente preferente, son los inmunoensayos radiactivos que utilizan isótopos radiactivos que, o bien son
- 40 incorporados en un inmunoreactivo durante la síntesis, de manera preferente en el trazador de MetEEF1A, o posteriormente acoplados a un inmunoreactivo del ensayo, de manera preferente a un anticuerpo. Los isótopos radiactivos preferentes en el método de la invención son ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , y ^{125}I , y de manera más preferente ^{14}C , ^{35}S , y ^{125}I . Un método ventajoso sigue el principio de unión competitivo. Una cantidad constante de MetEEF1A radiactivo y una cantidad variable del marcador de MetEFF1A de la muestra a ser analizada compiten por una
- 45 cantidad definida de anticuerpo que se encuentra presente en exceso. El desplazamiento del trazador es directamente proporcional a la concentración de marcador que puede evaluarse mediante una curva de calibración.

Antígenos o anticuerpos, respectivamente, que son marcados de manera favorable con fluoróforos, se utilizan en inmunoensayos FIA.

- El inmunoensayo SPIA utiliza el cambio de color de las partículas de plata como resultado de la aglutinación. No se
- 50 requiere ni un anticuerpo secundario ni una reacción del indicador, lo cual lo hace particularmente útil en el alcance de la presente invención. Igualmente ventajosa resulta la prueba de aglutinación en látex, que utiliza anticuerpos que se enlazan a partículas de látex coloreadas. Sin embargo, requiere una fuerte inmovilización de MetEFF1A para eliminar antígenos no enlazados y/o no enlazados de manera específica en etapas previas de lavado.

- En general, todos los métodos para la detección incluyen etapas de lavado intensivas para separar antígenos no
- 55 enlazados y/o no enlazados de manera específica del complejo MetEEF1A/ anticuerpo. Además, el procedimiento experimental de cualquier método de detección es bien conocido por los expertos en el arte.

Otro método de detección ventajoso para los productos de incubación específicos de la invención es el ensayo de inmunoelctrotransferencia o western blot. En primer lugar, un gel se mezcla y se funde, las muestras preparadas previamente se cargan en el gel y se fraccionan mediante electroforesis. Las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida se transfieren a una membrana de nitrocelulosa a la que los anticuerpos pueden aplicarse para detectar la proteína específica de interés, la MetEEF1A. Debido a que el proceso de transferencia no es eficiente al 100%, puede que la MetEFF1A residual en el gel sea coloreada de manera no selectiva utilizando azul de Comassie. El ensayo de Western blot se realiza de manera simple y ventajosa cuando una determinación exacta de la concentración es prescindible.

Existe una cantidad distintiva de anticuerpos específicos contra el EEF1A existente. Los anticuerpos se producen de manera habitual en los organismos mamíferos cuando se genera una respuesta inmune por los antígenos que son extraños al organismo y que tienen un peso molecular que excede 3.000 g/mol. En detalle, se conocen anticuerpos policlonales que están dirigidos al antígeno EEF1A humano. Especies hospedadoras ventajosas para la producción de anticuerpos comprenden la cabra, el conejo, y el ratón. Pueden seleccionarse anticuerpos adicionales policlonales y monoclonales contra EEF1A originados a partir de diferentes especies y fragmentos del mismo. Técnicas comunes, tales como la tecnología de hibridomas, son bien conocidas por los expertos en el arte. Los anticuerpos dirigidos contra EEF1A se aplican como sustancias específicas en el método de la invención.

Una señal del marcador directo o indirecto puede ser analizada, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico, utilizando un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de ^{125}I , o utilizando un fluorómetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Para la detección de anticuerpos ligados a enzimas, un análisis cuantitativo puede realizarse utilizando un espectrofotómetro, tal como un Lector de Microplacas EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención pueden automatizarse o realizarse de manera robótica, y la señal de múltiples muestras puede ser detectada simultáneamente.

Los anticuerpos pueden ser inmovilizados en una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de una matriz cromatográfica o magnética, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos de microtitulación), piezas de un material o membrana de sustrato sólido (por ejemplo, plástico, nylon, papel) y similares. Una tira de ensayo puede ser preparada recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Esta tira puede ser, entonces, sumergida en la muestra de prueba y procesada rápidamente a través de etapas de lavados y detección para generar una señal que pueda medirse, tal como una zona coloreada.

Formatos físicos útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones discretas, direccionables para la detección de una pluralidad de diferentes biomarcadores. Tales formatos incluyen micromatrices de proteínas o chips de proteínas. En estos modos de realización, cada localización de superficie discreta puede comprender anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores de proteínas para la detección en cada localización. Las superficies pueden comprender, de manera alternativa, una o más partículas discretas (por ejemplo micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en localizaciones discretas de una superficie, donde las micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores de proteínas para la detección.

El análisis puede llevarse a cabo en una variedad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización puede ser utilizado para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de prueba. De manera alternativa, podrían desarrollarse formatos de una única muestra para facilitar el diagnóstico o pronóstico de manera oportuna.

Las imágenes ópticas vistas y grabadas, de manera opcional, por una cámara o cualquier otro dispositivo de grabación (por ejemplo, un fotodiodo o un dispositivo de almacenamiento de datos), se procesan adicionalmente de manera opcional en cualquiera de los modos de realización de la presente patente, por ejemplo, digitalizando la imagen y almacenando y analizando la imagen en un ordenador. Una variedad de equipo periférico disponible comercialmente y software, se encuentra disponible para digitalizar, almacenar y analizar un video digitalizado o una imagen óptica digitalizada. Un sistema convencional lleva la luz del área de la muestra de ensayo a una cámara con dispositivo de carga acoplada refrigerada (cámara CCD, por sus siglas en inglés), de uso habitual en el arte. Una cámara CCD incluye una matriz de elementos de imagen (píxeles). La luz proveniente de la muestra es representada en forma de imagen en el CCD. Los píxeles en particular que corresponden a las regiones de la muestra, se muestrean para obtener lecturas de intensidad de luz para cada posición. Los múltiples píxeles se procesan en paralelo para aumentar la velocidad. Los aparatos y métodos de la invención se utilizan fácilmente para ver cualquier muestra, por ejemplo mediante técnicas con microscopio de fluorescencia o de campo oscuro.

El análisis del biomarcador puede lograrse, por ejemplo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y/o espectrometría de masas, por ejemplo espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS, por sus siglas en inglés), espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS, por sus siglas en inglés), espectrometría de masas o MS (por sus siglas en inglés) en tándem, etc., de manera preferente espectrometría de masas, de manera más

preferente por MALDI-TOF/MS o MS en tándem. EL análisis del biomarcador comprende la determinación de la masa de la proteína completa y/o la determinación de los fragmentos de proteínas. De manera preferente, al menos la masa completa está determinada, a lo que continúa la determinación de las masas de los fragmentos. Considerando la espectrografía de masas MALDI-TOF, el biomarcador se adsorbe en una matriz adecuada que muestra una alta absorción en la longitud de onda del láser excitado, evitando por tanto la generación de iones fragmentados. El biomarcador permanece estable por la generación suave de iones que permiten la separación de otros componentes celulares. La detección de espectrómetros de masa con analizador de tiempo de vuelo se basa en un principio de separación de la masa en ultravacío. Para tomar en consideración son las especies ionizadas que comienzan desde la misma posición al mismo tiempo, siendo aceleradas mediante un campo electrostático homogéneo constante. Sus velocidades se encuentran relacionadas, sin ambigüedad, con su relación masa-a-carga, y los tiempos de llegada en un detector indican directamente sus masas.

La determinación del biomarcador puede realizarse mediante secuenciación o electroforesis. Ejemplos no limitativos del análisis de secuencias incluye la secuenciación de Edman, la secuenciación de matriz capilar, secuenciación de ciclos térmicos, secuenciación en fase sólida, secuenciación con espectrometría de masas, tal como MALDI-TOF/MS y secuenciación por hibridización, de manera preferente secuenciación de Edman. Ejemplos no limitativos de análisis por electroforesis incluyen electroforesis de gel en placa, tal como electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, electroforesis capilar, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y electroforesis por isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés), de manera preferente IEF en 1D. El análisis con IEF se colorea en especial con azul de Comassie o plata.

Los procesos electroquímicos y las sondas, se encuentran también bien establecidos y descritos en la patente WO 2003/060464 A2, por ejemplo.

De manera preferente, la inducción y acumulación de MetEEF1A se detecta por IEF a lo largo de una primera dimensión seguida de al menos un método que se selecciona del grupo de transferencia de Western blot, espectrometría de masas y secuenciación N-terminal. La MetEF1A que lleva el residuo terminal de metionina, se encuentra con más carga positiva en un pH neutro en comparación con la isoforma EEF1A acetilada constitutiva, que permite que las dos isoformas sean separadas por su pI (punto isoeléctrico). Por consiguiente, el anticuerpo para el western blot no tiene que ser mono-específico a MetEEF1A, sino que en general se puede aplicar cualquier anticuerpo específico a EEF1A, es decir aquellos que son reactivos a todas las isoformas de EEF1A o específicos a las dos isoformas de EEF1A que comienzan bien con una glicina acetilada (acGlyEEF1A) o una metionina (MetEEF1A). El contenido previo que concierne a la aplicación única de los métodos de detección es válido y se puede aplicar sin restricciones a las combinaciones del mismo.

En otro modo de realización del método de cribado, la detección de la inhibición de MetAP2 puede ser refinada, de manera adicional, en la etapa (c). Para este propósito, la etapa (c) comprende las sub-etapas adicionales de:

(c') correlacionar una cantidad de señal o un cambio en la señal de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema, y

(c'') detectar un nivel de inhibición de MetAP2 comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema celular que no está incubado con los compuestos y/o en un sistema celular que está incubado con un compuesto estándar que tiene actividad inhibidora de MetAP2.

El sistema celular de la invención se incuba con varias concentraciones de un inhibidor de MetAP2 identificado. La cantidad de señal emitida o el cambio en la señal que se observa en presencia del inhibidor es un indicativo del cambio en la actividad experimentado por el compuesto. El cambio en la señal es un cambio en la intensidad de la señal y/o la vida efectiva de la señal. No importa si el cambio en la señal da como resultado una disminución o un aumento de la señal. Incluso la pérdida de cualquier señal se considera como un cambio en la señal. La cantidad o el cambio de señal, respectivamente, pueden entonces relacionarse con la concentración del inhibidor en la muestra, es decir, la curva de calibración permite la lectura de medición de una concentración coincidente. De manera preferente, la curva de calibración se basa en la ecuación de Lambert-Beer si se utiliza coloración UV/VIS o luminiscencia. La concentración del biomarcador se calcula posteriormente considerando la parte molar de MetEEF1A dentro del complejo del producto si se encuentra presente. De manera preferente, la razón molar de la sustancia específica y MetEEF1A es 1:1, que está presente en complejos anticuerpo/MetEEF1A por ejemplo, de manera que la concentración molar de los productos de incubación corresponde a la concentración molar de MetEEF1A.

La eficacia de los compuestos se diagnostica comparando la concentración de MetEEF1A en la muestra con los niveles de concentración de MetEEF1A conocidos de o bien las células no tratadas y/o bien las células tratadas. Debe entenderse que las concentraciones conocidas se prueban estadísticamente, representando por tanto un cierto nivel o rango, respectivamente. Cualquier concentración medida, que difiera del nivel de concentración de MetEEF1A de células no tratadas, indica una anomalía de la muestra de células sometida a prueba, mientras que un compuesto no puede ser clasificado como un inhibidor en una concentración de MetEEF1A que sea comparable al

nivel de concentración de células no tratadas. Resulta preferente medir concentraciones, que son más elevadas que el nivel de concentración del producto génico de células no tratadas, para detectar la inhibición de MetAP2. Utilizando este método, los inventores han demostrado sensibilidad en concentraciones submicromolares o incluso nanomolares. La gráfica de calibración revela que el método puede ser aplicado en un rango dinámico que abarca un par de magnitudes.

De acuerdo con otro modo de realización para evaluar la eficacia de los compuestos, el presente método de cribado se realiza de una manera tal que adicionalmente en la etapa (c) se determina EEF1A con un residuo de glicina N-terminal acetilada (acGlyEEF1A), en la etapa (c') una cantidad de señal, o cambio en la señal de acGlyEEF1A se correlaciona con una concentración de acGlyEEF1A en el sistema y, de manera opcional, se determina una razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A, y en la etapa (c'') la concentración de acGlyEEF1A y/o la razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A se compara con otra concentración de acGlyEEF1A y/o otra razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A en un sistema celular que no está incubado con los compuestos y/o en un sistema celular que está incubado con un compuesto estándar que tiene actividad inhibidora de MetAP2. El contenido previo referente a la determinación, correlación y detección en perspectiva de MetEEF1A, es válido y puede aplicarse sin restricciones a la detección de acGlyEEF1A si fuera oportuno.

Entre aquellos compuestos que se revelan para reducir la actividad de MetAP2, cada uno o algunos de los ejemplos representativos se seleccionan para un análisis más detallado. En un modo de realización preferente de la presente invención, el método de cribado implica otra etapa (d), que comprende la detección de la unión específica de compuestos a la diana de la proteína MetAP2. De manera preferente, se eligen los compuestos que muestran la mayor discrepancia con el control. Se analizan para su especificidad para excluir otra señal de transducción, la cual no se inicia por la unión a la diana de la proteína MetAP2 de la invención o moléculas asociadas de la misma, y de manera adicional se someten a prueba para una reactividad cruzada de tales características a fin de evitar reacciones adversas u otros efectos por trayectorias ligadas si ocurre un acoplamiento molecular simultáneo a estructuras diana adicionales. Son conocidos varios métodos en el arte para la detección específica y/o unión mono-específica, tales como los experimentos de desplazamiento en gel, mediciones con Biacore, análisis de la estructura en rayos X, estudios de unión competitiva, y similares. En un modo de realización preferente del método de cribado, se detecta la unión mono-específica de sustancias a las estructuras diana de la invención.

La dirección y fuerza de la expresión de MetEEF1A puede también explicarse mediante el análisis diferencial del procesamiento de proteínas del biomarcador de la invención, de tal manera que pueda reconocerse o una regulación por ascenso o bien una regulación por disminución distintiva, lo que forma la base de la elección del compuesto. Aunque el cribado de compuestos, que inhiben la actividad de MetAP2, resulta preferente en el alcance de la presente invención, el método también puede dirigirse al cribado de activadores de MetAP2. La invención también hace referencia a un método para el cribado de compuestos, que activan la actividad de MetAP2, que comprenden las etapas de:

(a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que sea capaz de expresar MetAP2, en donde el sistema se selecciona del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,

(b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados,

(c) determinar la MetEEF1A,

(c') correlacionar una cantidad de señal, o un cambio en la señal, de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema,

(c'') detectar la actividad de MetAP2 comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema celular que se incuba con un compuesto estándar que tiene actividad activadora de MetAP2, y de manera opcional

(d) detectar la unión específica de compuestos a MetAP2.

La activación de MetAP2 hace referencia a cualquier disminución que pueda observarse o medirse en los niveles de expresión de MetEEF1A, en comparación con un sistema de control. La medición de los niveles de expresión puede llevarse a cabo utilizando cualquier técnica que puedan tener biomarcadores en una muestra biológica. Ejemplos de estas técnicas se han discutido con anterioridad. Es otra realización de la presente invención que en el caso de la activación del procesamiento de EEF1A, la concentración de MetEEF1A se encuentra por debajo de al menos dos veces la concentración de MetEEF1A en el sistema de control, de manera preferente al menos 10 veces, de manera más preferente al menos 25 veces, de la manera más preferente al menos 40 veces. En un modo de realización muy preferente de la invención, la activación de MetAP2 da como resultado la conversión completa de MetEEF1A en acGlyEEF1A (es decir, ausencia de MetEEF1A).

El contenido previo de la presente especificación, en lo referente al método para el cribado de inhibidores de MetAP2 se considera tan válido y aplicable, sin restricciones, al método para el cribado de los moduladores de MetAP2, si fuera oportuno. En particular, el contenido anterior y en desarrollo en lo referente a los inhibidores de MetAP2, es válido y aplicable, sin restricciones, a los activadores de MetAP2, si fuera oportuno; al hacerlo debe entenderse por parte del experto en el arte que ciertos efectos de compuestos activadores e inhibidores son diamétricos de manera inherente.

El método de la invención se aplica de manera preferente para el cribado de compuestos que proporcionan actividad anti-proliferativa. En la presente patente, se aplica un cultivo celular proliferativo, tal como un carcinoma de pulmón de células pequeñas, un carcinoma de pulmón de células no pequeñas, un osteosarcoma, un carcinoma de mama humano o una línea celular de fibroblasto de ratón inhibida por contacto, en particular. Por consiguiente, resulta particularmente preferente cribar compuestos con actividad angiogénica y/o anti-tumoral. Tales actividades se encuentran asociadas a condiciones fisiológicas y/o patológicas, que son generadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de MetAP2. Los inhibidores de MetAP2 son muy útiles como agentes citotóxicos para el tratamiento de enfermedades proliferativas, de manera preferente el cáncer incluyendo tumores y metástasis. Los inhibidores de MetAP2 son particularmente adecuados para la inhibición del crecimiento de varios linfomas, sarcomas, carcinomas y mielomas. Además, los inhibidores de MetAP2 son adecuados para el tratamiento de las enfermedades dependientes de angiogénesis, por ejemplo varias enfermedades neovasculares oculares.

La solicitud también muestra un modo de realización del método para el cribado de compuestos terapéuticos para una indicación anti-proliferativa, en donde en una etapa (a) se proporciona un mamífero, en una etapa (b) el compuesto a ser cribado se administra a un mamífero, y en la etapa (c) un efecto terapéutico se detecta determinando MetEEF1A en una muestra biológica tomada de un mamífero. Debe entenderse que la expresión "compuestos terapéuticos para una indicación anti-proliferativa" hace referencia al uso de compuestos apropiados para el tratamiento de cuadros clínicos, que se caracterizan por un crecimiento celular, división y propagación excesiva, incontrolada y acelerada, y por lo tanto, los compuestos son terapéuticos en la aplicación anti-proliferativa.

El mamífero de la etapa (a) es, de manera preferente, un organismo no humano, de manera más preferentemente un animal de laboratorio, de manera más preferente especies tales como ratones o ratas que puedan ser genéticamente modificadas. El mamífero sufre de cualquier cuadro clínico proliferativo que esté asociado con un nivel menor o una ausencia de MetEEF1A. Este nivel de expresión del biomarcador MetEEF1A, en base a la proteína, se mide en una muestra de biopsia, tal como una muestra de tejido de un tejido tumoral o plasma de dicho paciente mamífero, y se establece como línea de referencia.

En la etapa (b), es posible poner en contacto los ratones y ratas, por ejemplo, con los compuestos candidatos por inyección, infusión, por vía oral o por vía rectal. Resulta preferente incubar un compuesto único dentro de una parte distintiva de los organismos no humanos. La etapa (b) puede también llevarse a cabo in-vitro mediante la exposición de una muestra ex-vivo, tal como una muestra de tejido de un tumor o plasma del paciente mamífero a dicho medicamento anti-MetAP2. Resulta preferente un paciente humano si se está llevando a cabo la etapa (b) in-vitro.

En la etapa (c), el nivel de expresión de MetEEF1A se mide nuevamente de una manera idéntica a la etapa (a), y las diferencias en los niveles de expresión medidos en la etapa (a) y (c) se calculan. Cualquier diferencia se basa de manera inherente en un cambio hacia la línea de referencia inicial, confirmando por tanto una interacción de un compuesto de cribado definido con MetAP2. El aumento deseado en los niveles de expresión de MetEEF1A indica una inhibición con éxito de MetAP2, lo que está correlacionado con el efecto terapéutico. Una relación de ese tipo puede establecerse mediante la monitorización de la secuencia cronológica del efecto contra una dosis única o múltiple del compuesto de cribado definido utilizando solamente el mamífero tratado. El efecto se determina mediante parámetros cualitativos, por ejemplo disminuyendo la gravedad de los síntomas, o bien mediante parámetros cuantitativos, por ejemplo una tasa reducida del crecimiento celular, tamaño reducido del tumor, etc. Un aumento en el nivel de expresión de los biomarcadores MetEEF1A obtenidos en la etapa (c) en comparación a la etapa (a) indica una probabilidad aumentada de que dicho mamífero responda terapéuticamente al tratamiento con dicho compuesto de cribado. Este aumento puede lograr un umbral bajo la condición de que la comparación se lleve a cabo con un mamífero de control sano (es decir, que no presente ninguna anomalía proliferativa), lo que muestra de forma inherente una actividad de MetAP2 regulada por disminución. Por consiguiente, la etapa de determinación (c) se lleva a cabo de manera favorable, en comparación con otro mamífero que muestra efectos proliferativos y/o no proliferativos. El mamífero comparado no se encuentra expuesto a los compuestos a ser cribados, sino tratado de una manera idéntica para medir los niveles de MetEEF1A. La etapa (c) comprende, de manera preferente, las sub-etapas adicionales de:

(c') correlacionar una cantidad de señal o un cambio en la señal con una concentración de MetEEF1A en el sistema, y

(c'') detectar un nivel de actividad anti-proliferativa comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema de células proliferativas y/o no proliferativas.

Es adicionalmente preferente que al menos dos sujetos de un organismo no humano que sufra de un trastorno proliferativo, sean proporcionados como muestra, a un subconjunto de los cuales se administran los compuestos, y el patrón de procesamiento de proteínas se correlaciona con los síntomas del trastorno en sujetos a los que los compuestos han sido administrados y sujetos a los que no se les ha administrado ningún compuesto. Sobra decir que los principios básicos del método de cribado en general son válidos y se pueden aplicar sin restricciones a cualquier modo de realización especial de acuerdo con la presente patente, si fuera oportuno.

Con el efecto terapéutico, el nivel cualitativo se incorpora a la etapa (c). Un “efecto terapéutico relevante” alivia hasta cierto punto uno o más síntomas de una enfermedad o regresa a la normalidad, ya sea parcial o completamente, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o que causan la enfermedad o las condiciones patológicas. Además, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” denota una cantidad que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido esta cantidad, tiene la siguiente consecuencia: tratamiento mejorado, alivio, prevención o eliminación de una enfermedad, síndrome, condición, dolencia, trastorno o efectos secundarios o además la reducción en el avance de una enfermedad, dolencia o trastorno. La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” además abarca las cantidades que son efectivas para el aumento de la función fisiológica normal. Someter a prueba varios compuestos hace posible la selección de aquel compuesto que sea más apropiado para el tratamiento del sujeto mamífero. La tasa de dosis in-vivo del compuesto elegido se ajusta previamente, de manera ventajosa, a la proliferación de las células específicas con respecto a sus datos in-vitro. Por lo tanto, la eficacia terapéutica se aumenta de manera destacada.

La identificación de compuestos que después de la actividad de MetAP2, de manera preferente, inhiben la actividad de MetAP2, que está asociada con un trastorno o condición determinada, puede conducir al desarrollo de fármacos que puedan ser administrados a un paciente en dosis terapéuticamente efectivas para evitar, tratar o controlar dicho trastorno o condición. Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para su administración a través de cualquier método deseado, por ejemplo por métodos por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), vía rectal, vía nasal, vía tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Tales formulaciones pueden prepararse utilizando todos los procesos conocidos en el arte farmacéutico mediante, por ejemplo, la combinación del ingrediente activo con el(los) excipiente(s) o adyuvante(s).

La invención también hace referencia a un método para monitorizar la probabilidad o la respuesta al tratamiento de enfermedades cancerígenas que están causadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de MetAP2, en donde MetEEF1A se determina en una muestra biológica tomada del mamífero. En necesidad de tal tratamiento con al menos un inhibidor de MetAP2, o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, es administrado a dicho mamífero. Un aumento en el nivel de expresión de dicho biomarcador a lo largo del periodo de monitorización indica una actividad disminuida de MetAP2, que está asociada con una probabilidad aumentada de que dicho mamífero responda al tratamiento con dicho compuesto. El compuesto se obtiene, de manera preferente, mediante el método de cribado de la invención tal y como se ha explicado anteriormente. Por tanto, el contenido previo de la presente especificación referente al método de cribado es válido y se puede aplicar sin restricciones al método de monitorización, si fuera oportuno.

La identificación de EEF1A descrita con anterioridad proporciona una herramienta poderosa para evaluar la progresión de un estado, condición o tratamiento. La presente invención puede ser utilizada como un marcador clínico para monitorizar la eficacia de un compuesto inhibidor de MetAP2 en cada paciente individualmente. De manera específica, el EEF1A puede ser identificado en un paciente antes de un evento, tal como la menopausia, cirugía, el comienzo de un régimen terapéutico, o la terminación de un régimen terapéutico, para proporcionar un resultado a modo de línea de referencia. Esta línea de referencia puede entonces compararse con el resultado obtenido utilizando métodos idénticos ya sea durante o bien después de tal evento. Esta información puede ser utilizada tanto para el propósito de un diagnóstico como para un pronóstico. La información sobre el marcador clínico puede ser utilizada adicionalmente para optimizar la dosificación y el régimen de un compuesto activo mediante la monitorización de la inducción y acumulación de MetEEF1A en la muestra biológica del sujeto. De manera adicional, el método de la presente invención puede ser utilizado para encontrar un compuesto terapéuticamente efectivo y/o una cantidad o régimen terapéuticamente efectivo para el compuesto seleccionado, seleccionando y optimizando individualmente, de ese modo, una terapia para un paciente.

Por consiguiente, el método de monitorización de la invención puede ser utilizado en medicina en humanos y de uso veterinario. El mamífero es, de manera preferente, un animal de laboratorio y/o un organismo no humano. En la presente patente, los compuestos pueden ser administrados antes o después del comienzo de una enfermedad una o varias veces, actuando como terapia. El término “cantidad efectiva” o “dosis efectiva” o “dosis” son utilizados en la presente patente de manera intercambiable, y denotan una cantidad del compuesto farmacéutico que tiene un efecto relevante terapéutico o profiláctico sobre una enfermedad o condiciones patológicas, es decir, que causa en un tejido, sistema, animal o humano una respuesta médica o biológica que se busca o se desea, por ejemplo, por parte de un investigador o médico.

Los productos médicos mencionados del uso de la invención, se utilizan en particular para el tratamiento terapéutico. La monitorización se considera un tipo de tratamiento, en donde los compuestos se administran de manera preferente, en distintos intervalos, por ejemplo a fin de reforzar la respuesta y eradicar los patógenos y/o los síntomas de una enfermedad relacionada con MetAP2 por completo. Bien un compuesto idéntico o bien diferentes compuestos pueden ser aplicados. El medicamento puede también ser utilizado para reducir la probabilidad de desarrollar una enfermedad o incluso evitar la iniciación de enfermedades asociadas con la actividad de MetAP2 por adelantado o para tratar la aparición y continuación de los síntomas. En el significado de la invención, el tratamiento profiláctico es aconsejable si el sujeto posee cualquier condición previa para las condiciones patológicas o fisiológicas mencionadas, tales como una disposición familiar, un defecto genético, o una enfermedad que haya sufrido previamente.

Las enfermedades referentes a la invención son enfermedades cancerígenas, que se seleccionan del grupo de enfermedades cancerígenas de la región otorrinolaringológica, los pulmones, mediastino, tracto gastrointestinal, sistema urogenital, sistema ginecológico, mamas, sistema endocrino, enfermedades de la piel y óseas, además de sarcomas de tejido blando, mesoteliomas, melanomas, neoplasmas del sistema nervioso central, enfermedades cancerígenas durante la infancia, linfomas, leucemia, síndromes paraneoplásicos, metástasis de tumor primario desconocido (MPD o síndrome CUP, del inglés "cáncer with unknown primary tumor), carcinomatosis peritoneal, malignidades relacionadas con la inmunosupresión y/o metástasis tumorales. De manera más específica, los tumores pueden ser designados como los siguientes tipos de cáncer: adenocarcinoma de mama, de próstata y de colon; todas las formas de cáncer de pulmón que se inician en los tubos bronquiales; cáncer de médula ósea, melanoma, hepatoma, neuroblastoma, papiloma; apudoma, coristoma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma (por ejemplo, carcinoma de Walker, carcinoma de células basales, carcinoma basoescamoso, carcinoma de Brown-Pearce, carcinoma ductal, tumor de Ehrlich, carcinoma in-situ, carcinoma de grado 2, carcinoma de células de Merkel, cáncer de mucosa, carcinoma bronquial no parvicelular (no de células pequeñas), carcinoma de células en grano de avena, carcinoma papilar, carcinoma escirro, carcinoma bronquio-alveolar, carcinoma bronquial, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transicionales), trastorno funcional histiocítico; leucemia (por ejemplo en relación con leucemia de linfocitos B, leucemia de células mixtas, leucemia de células nulas, leucemia de linfocitos T, leucemia crónica de linfocitos T, leucemia asociada al VHTL-II, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia de mastocitos y leucemia mieloide), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, tumor solitario de células plasmáticas; reticuloendoteliosis, condroblastoma; condroma, condrosarcoma; fibroma; fibrosarcoma; tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, leucosarcoma, mesotelioma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma, mesenquimoma, mesonefroma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma; odontoma, teratoma; timoma, corioblastoma, adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistadenoma, tumor de células de la granulosa, ginandroblastoma, hidradenoma, tumor de células de los islotes, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células de la teca, leiomioma, leiomiomasarcoma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, rabiomioma, rabiomiomasarcoma, endinoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafín, angioqueratoma, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomas, glomangioma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfangiosarcoma, pinealoma, cistosarcoma filoides, hemangiosarcoma, linfangiosarcoma, mixosarcoma, carcinoma ovárico, sarcoma (por ejemplo, sarcoma de Ewing, experimental, sarcoma de Kaposi y sarcoma de mastocitos), neoplasias (por ejemplo, neoplasias óseas, neoplasias mamarias, neoplasias del sistema digestivo, neoplasias colorectales, neoplasias hepáticas, neoplasias pancreáticas, neoplasias de la hipófisis, neoplasias testiculares, neoplasias orbitales, neoplasias de cabeza y cuello, del sistema nervioso central, neoplasias del órgano auditivo, de la pelvis, del tracto respiratorio y del tracto urogenital), neurofibromatosis y displasia del epitelio escamoso cervical.

El tumor se selecciona de manera preferente del grupo de tumores del epitelio escamoso, la vejiga, el estómago, los riñones, la cabeza, el cuello, el esófago, cuello uterino, el tiroides, el intestino, el hígado, el cerebro, la próstata, el tracto urogenital, el sistema linfático, el estómago, la laringe y/o el pulmón.

El tumor se selecciona de manera adicionalmente preferente del grupo de adenocarcinoma de pulmón, carcinomas de pulmón de células pequeñas, cáncer pancreático, glioblastomas, carcinoma de colon y carcinoma de mama. Además, se da preferencia al tratamiento y/o monitorización de un tumor de la sangre y el sistema inmunológico, de manera más preferente para el tratamiento y/o monitorización de un tumor seleccionado del grupo de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfática aguda y/o leucemia linfática crónica. Tales tumores pueden también ser designados como tipos de cáncer en el sentido de la invención.

En otro modo de realización de la presente invención, el carcinoma de boca de células escamosas de la lengua, el carcinoma de células escamosas de la cabeza, el carcinoma de células escamosas de cuello, el cáncer de páncreas y cáncer de mama quedan excluidos del contenido que se busca mediante el método para la monitorización.

La invención también hace referencia a un método para determinar la actividad de MetAP2 que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2, en donde el sistema se selecciona del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,

5 (b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados, y

(c) determinar la actividad de MetAP2 determinando MetEEF1A y correlacionando una cantidad de señal, o un cambio en la señal de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema, en donde la actividad de MetAP2 y la concentración de MetEEF1A son inversamente proporcionales.

10 Mediante el método de la invención, cualquier actividad parcial entre la inhibición completa o la actividad máxima puede ser establecida, o incluso pueden lograrse los umbrales mencionados anteriormente. La proporcionalidad inversa puede seguir bien una función lineal, o bien una función no lineal. Más aún, el contenido previo referente a los métodos para el cribado de compuestos además de la monitorización de condiciones fisiológicas y/o patológicas es válido y se puede aplicar sin restricciones al método para determinar la actividad de MetAP2.

15 Otro método in-vivo para predecir la probabilidad de que un paciente que sufre de cáncer responderá terapéuticamente al tratamiento con un fármaco anti-MetAP2, comprende las etapas de (a) medir, en una muestra de tejido de una biopsia de un tejido tumoral o plasma de dicho paciente, el nivel de expresión del biomarcador MetEEF1A en base a proteínas, (b) exponer ex-vivo una muestra de tejido de un tumor o plasma de dicho paciente a dicho fármaco anti-MetAP2, y (c) medir, en dicha muestra de tejido expuesta de la etapa (b), el nivel de expresión de dicho biomarcador especificado en la etapa (a) junto con el cálculo de las diferencias en los niveles de expresión
20 medidos en las etapas (b) y (c), en donde un aumento en el nivel de expresión de dicho biomarcador obtenido en esta etapa (c) en comparación con la etapa (a), indica una probabilidad aumentada de que dicho paciente responde terapéuticamente al tratamiento con dicho fármaco anti-MetAP2.

25 Es además objeto de la invención, el uso de EEF1A que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o EEF1A2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (véase la Figura 11), o variantes, mutantes, partes de la secuencia de aminoácidos o al menos un 85% de secuencias homólogas que tengan la misma función, o un ácido nucleico que codifica EEF1A1 y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica EEF1A2, como biomarcador para una reducción de la actividad de MetAP2.

30 El biomarcador puede ser utilizado para la monitorización, determinación y/o predicción de la reducción de la actividad de MetAP2, el estado de la proliferación celular y/o la reducción de la probabilidad de desarrollar un tumor y/o un crecimiento tumoral progresivo. Los diferentes usos pueden abarcarse bajo el término general "evaluación". Sobre decir que los datos son monitorizados durante un periodo específico, mientras que los datos se determinan en un momento en particular. Tanto el periodo como el momento pueden ser designados fácilmente por el experto en el arte dependiendo de los ensayos experimentales realizados. Más aún, el EEF1A puede ser utilizado como biomarcador para predecir in-vitro la eficacia farmacéutica y/o la respuesta clínica de un mamífero que sufre de
35 cáncer ante un fármaco inhibidor de MetAP2, que está pensado para ser administrado y/o es administrado en el tratamiento contra el cáncer. El tratamiento subyacente es en particular un tratamiento de primera línea, y el fármaco inhibidor con el que el paciente mamífero va a ser tratado, es administrado en monoterapia. En un modo de realización alternativo del tratamiento subyacente, dicho fármaco se combina con un agente quimioterápico, y dicho paciente ha desarrollado cáncer refractario a la quimioterapia.

40 En el ámbito de la presente invención, se proporciona por primera vez un método para el cribado de los inhibidores o moduladores de MetAP2, aplicando el único biomarcador EEF1A. La presente invención muestra la inducción y la acumulación de MetEEF1A en células cuya actividad enzimática de MetAP2 es interrumpida. EEF1A como biomarcador para los inhibidores de MetAP2 presenta varias ventajas. Es una proteína celular abundante, así que puede ser detectada con facilidad en muestras tumorales. El estatus N-terminal de EEF1A refleja la actividad enzimática de MetAP2 durante un periodo, representando realmente de este modo la consecuencia de la inhibición
45 de MetAP2, y correlacionándose mejor con la eficacia del compuesto de prueba. Además, la lectura de MetEEF1A es sobre un sustrato específico de MetAP2, pero de MetAP2 en sí mismo, así que puede ser utilizado para todos los tipos de inhibidores de MetAP2. El sustrato es procesado por MetAP2, pero no por MetAP1, lo que hace posible demostrar que una actividad anti-angiogénica y anti-proliferativa es posible, de manera específica, debido a la inhibición de la actividad proteolítica de MetAP2.
50

La inhibición del procesamiento de metionina mediante MetAP2 bloquea el crecimiento de células tumorales in-vitro. Los inhibidores de MetAP2 incluso inducen MetEEF1A en una forma dependiente de la dosis, similar a la observada para su actividad antiproliferativa. El marcador robusto tiene el potencial para monitorizar la inhibición de MetAP2 no sólo en células sino también en sujetos animales y humanos tratados con inhibidores de MetAP2. La inducción de
55 MetEEF1A se correlacionó también con la actividad in-vivo anti-angiogénica y anti-tumoral. El estado N-terminal de

EEF1A es un biomarcador destacado para la inhibición celular de MetAP2 in-vitro e in-vivo. El procesamiento de EEF1A beneficia la monitorización de la inhibición de MetAP2 en ensayos clínicos y preclínicos.

El análisis de la isoforma EEF1A procesada diferencial es muy adecuada para pruebas de cribado a gran escala. El nuevo marcador permite la identificación de nuevos inhibidores de MetAP2. Los compuestos pueden ser identificados y evaluados con un mecanismo celular específico de acción y de manera adicional, su potencial para ejercer efectos anti-angiogénicos y/o anti-proliferativos pueden ser demostrados de manera favorable. La caracterización de EEF1A, en particular de MetEEF1A, implicado seriamente en el reconocimiento del sustrato mediante MetAP2 da como resultado la provisión de composiciones farmacéuticas para el tratamiento diagnóstico, profiláctico o terapéutico y/o la monitorización de condiciones, que son causadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de MetAP2. Su uso es una aproximación novedosa y prometedora para un amplio espectro de terapias que causan una reducción inmediata y directa de los síntomas que están claramente conectados con las enfermedades dependientes de MetAP2. Los compuestos son especialmente beneficiosos como agentes anticancerígenos en mamíferos.

Por lo tanto, en el cribado y la monitorización in-vitro de tales condiciones fisiológicas y patológicas, EEF1A se clasifica como biomarcador para detectar y caracterizar la actividad de MetAP2. El método de detección además del método presentado de monitorización de la invención puede ser realizado de una manera simple y rápida. Además, el kit apropiado se produce de manera eficiente en cuanto a su coste. Establecer como diana las isoformas EEF1A es altamente específico para la actividad de MetAP2 y trastornos médicos impulsados por la misma. Todas las sustancias de detección se caracterizan por una alta afinidad, especificidad y estabilidad; bajos costes de producción y de manejo adecuado. Estas características forman la base para una acción reproducible, en donde se incluye la ausencia de reactividad cruzada, y para una interacción fiable y segura con sus estructuras diana coincidentes.

Debe entenderse que la presente invención no se encuentra limitada a los métodos en particular, sustancias específicas, usos y kits descritos en la presente patente, ya que tal materia puede, por supuesto, variar. Debe entenderse además, que la terminología utilizada en la presente patente es para el propósito de describir los modos de realización en particular únicamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que únicamente se define por las reivindicaciones adjuntas. Tal como se utiliza en la presente patente, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras tales como "uno/a", "un", y "el/la" incluyen sus correspondientes referentes en plural a menos que el contexto claramente indique algo diferente. Por tanto, por ejemplo, la referencia "una sustancia" incluye una única o varias sustancias diferentes, y la referencia "un método" incluye referencia a etapas equivalentes y métodos conocidos para un experto en el arte, y así sucesivamente. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente patente tienen el mismo significado que habitualmente se entiende por parte del experto en el arte al que la presente invención pertenece.

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente patente pueden ser utilizados en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación ejemplos adecuados. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no de forma limitativa. Dentro de los ejemplos, se utilizan reactivos estándar y tampones que están libres de actividades contaminantes (cuando sea práctico). Los ejemplos han de interpretarse particularmente de manera que no están limitados a las combinaciones de características demostradas explícitamente, sino que las características ejemplificadas pueden combinarse sin restricciones nuevamente si el problema técnico de la invención se resuelve.

Cultivo celular y tratamiento con inhibidores de MetAP2

Se cultivaron células de endotelioma de cerebro de ratón (bEND3, ECACC Nr.9609129) a 37°C y 10 % de CO₂ en D-MEM (Invitrogen, #41965), complementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (Pan Biotech, #3302), 1mM de piruvato de sodio (Invitrogen, #11360) y 1 x Solución de aminoácidos no esenciales (Sigma, M7145). Se cultivaron células de carcinoma de colon humano (HCT116, ATCC CCL 225) a 37°C y 10 % de CO₂ en MEM alfa (Invitrogen, #22571) complementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (Pan Biotech, #3302), 2 mM de glutamina (Invitrogen, #25030), y 1mM de piruvato de sodio (Invitrogen, #11360). Se cultivan células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, PromoCell, C-12200), a 37°C y 5% de CO₂ en un medio de crecimiento de células endoteliales (PromoCell, C-22020) con una mezcla complementaria (PromoCell, C-39215). Se cultivaron células de fibrosarcoma humano (HT1080, ATCC CCL-121) a 37°C y 10% de CO₂ en D-MEM (Invitrogen, #41965), complementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor (Pan Biotech, #3302).

Las células se retiraron de los matraces de cultivos celulares con tripsina/EDTA (Invitrogen, #15400), se contaron utilizando una cámara Thoma (VWR, #631-1117), y se colocaron en platos de cultivo de tejidos (VWR, #391-2002, #391-2003) en un medio fresco (densidad celular: HT1080, bEND3: 0.5 a 1*10⁶ células en 30 ml del medio por plato de 15 cm, HCT116: 1*10⁶ células en 10 ml de medio por plato de 10 cm). Se cultivaron las células durante la noche y se trataron con un vehículo de control (0.5 % DMSO; Merck, #1.02931) o con inhibidores específicos de metionina aminopeptidasa 2 (Fumagillin: Sigma, F-6771; TNP-470; inhibidor de Abbott A-832234: Sheppard et al. (2005) 96 encuentro de la AACR (American Association for Cancer Research), Resumen #2531) durante diferentes periodos de tiempo (2 hrs, 6 hrs, 24 hrs, 48 hrs) a las concentraciones indicadas. El medio se recogió en tubos de ensayo tipo

Falcon y las células añadidas se lavaron dos veces con una solución de tampón fosfato salino de Dulbecco (D-PBS, por sus siglas en inglés) (Invitrogen, #14190). El lavado con D-PBS se combinó con el medio. Las células incluidas se incubaron durante 20 minutos con 5 ml de verseno (EDTA) (Invitrogen, 15040), se retiraron de la placa, y se combinaron con la solución del medio/lavado. Las células se centrifugaron durante 4 minutos en 300*g a temperatura ambiente, 5
dieron re-suspendidas en 0.5 ml de D-PBS (Invitrogen, #14190), y se contaron en una cámara Thoma. Las células se centrifugaron nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las células fueron re-suspendidas en un tampón de lisis con IEF (7 M de urea, 2M de tiourea, 4% de CHAPS, 1% de Farmalita pH 3-10 (GE Healthcare) en una densidad de 2×10^7 células por ml se incubaron durante 30 min con agitación suave. Los lisados se centrifugaron durante 5 min en 10.000*g, los sobrenadantes se recogieron en micro tubos eppendorf con medio fresco y finalmente se congelaron a -
10 70°C.

Separación por IEF

Los extractos celulares se separaron por electroforesis para un análisis detallado. El isoelectroenfoco se llevó a cabo en un rango de gradiente de pH 7-9. Los geles de IEF (CleanGel IEF ultra ETC1001-52 de ETC, Alemania) fueron rehidratados en 7 M de urea, 2 M de tiourea, 1 % DTE, 4% CHAPS, 3% Servalyte 7-9 durante 120 min, y se cargaron en una unidad de electroforesis Multiphor II (GE Healthcare). Las muestras (5 µl) se aplicaron cerca del ánodo y se sometió a dicha unidad con un tampón ánodo (6 M de glicina) y un fluido cátodo 10 (Serva, Alemania). Después del enfoque previo del gel (700 V, 30 min), se consiguió la entrada de la muestra a 20°C a 500 V durante 30 min. La separación se llevó a cabo a 2000V durante 210 min, seguido por la definición de la banda a 2500 V durante 10 min. Después de la eliminación, el gel fue equilibrado en un tampón de transferencia (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 M cloruro de guanidinio, 1 mg/ml DTT) para transferencia (blot) por difusión en membrana de PVDF y se dejó en ejecución durante la noche. Posteriormente, la membrana se coloreó o con azul de Coomassie o bien fue inmunocoloreada con EEF1A1 de PcAb de conejo anti-humano (Proteintech Group, USA; 11402-1-AP) durante 3 h y se detectó con reactivo ECL-Plus (GE Healthcare).

Secuenciación de proteínas N-terminales

La determinación de la secuencia amino terminal se logró, para los diferentes extractos celulares, después de la separación por isoelectroenfoco, transferencia western blot en membrana PVDF y tinción con azul de Coomassie. Se eliminaron las bandas individuales de azul de Coomassie y se aplicaron a un secuenciador de proteínas Procise 491 (Applied Biosystems, USA) y se sometieron al mismo de acuerdo al protocolo estándar.

Digestión enzimática y análisis de masa

Las bandas de gel de acrilamida coloreadas con azul de Coomassie se eliminaron después de la separación por IEF, se lavaron dos veces con 50% de acetonitrilo y se enjuagaron con acetonitrilo puro. La digestión en gel se llevó a cabo añadiendo 0.1 µg de tripsina disuelta en 10 µl de bicarbonato de amonio con pH 7.4 a la banda de gel. La incubación se realizó a 37°C durante la noche. Los alícuotas de la mezcla de digestión se aplicaron a una placa diana de una espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex, Bruker, Germany), y se añadió ácido α-ciano-4-hidroxinámico como una matriz. El análisis de masa se realizó y se detectaron fragmentos de péptidos aplicando protocolos estándar. Las listas de la masa peptídica lograda se contrastó con la base de datos SwissProt utilizando el algoritmo de búsqueda Mascot (Matrix Science, UK) para identificar la proteína. Además, los distintos péptidos de un mapa peptídico de masas fueron utilizados para estudios posteriores de fragmentación de espectrometría de masas a fin de determinar la secuencia primaria de aquellos péptidos individuales y para la anotación no ambigua de proteínas.

La tabla 1 contiene información explicativa para la Figura 10. Los compuestos se incubaron con células Bend3 durante 48 h en las concentraciones indicadas, se lisaron y se evaluó el desplazamiento de movilidad electroforética de EEF1A en un gel de IEF. Los compuestos utilizados se caracterizaron como inhibidores de MetAP2 y como inhibidores de la proliferación de células HUVEC con las potencias indicadas (IC50). La inhibición de MetAP2 se midió mediante corte del tripéptido Met-Ala-Ser y posterior detección de la metionina dividida utilizando una reacción de acoplamiento a enzima compuesta de L-amino oxidasa y peroxidasa (Wang et al. (2003) Biochemistry 42(17): 5035-5042). La inhibición de la proliferación de células HUVEC por parte de los compuestos indicados se midió utilizando un kit ELISA BrdU colorimétrico de Roche (Suiza; número de catálogo: 11 647 229 001). En este caso los compuestos se incubaron en diluciones en serie con las células endoteliales HUVEC durante 72 h y posteriormente se procesaron para la detección de BrdU.

La Figura 1 muestra el patrón relacionado con tratamiento de extractos celulares de diferentes células endoteliales y cancerígenos después de la separación por IEF con una nueva banda observada después de aplicar los inhibidores de MetAP2 (carril 1, 5, 9: las proteínas marcadoras de IEF; carril 2, 6, 12: 100 nM TNP470; carril 3, 7:

1 µM de ácido 2-[2-((Z)-3-dietilamino-propenil)-4-fluoro-bencenosulfonilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-1-carboxílico, que es idéntico a A-832234; carril 4, 8, 11: 0.5 % DMSO).

La Figura 2 muestra una vista aumentada para los carriles 2-4 de la Figura 1.

La Figura 3 muestra los resultados de la secuenciación de Edman que confirma Met¹ en el N-terminal de EEF1A después de la inhibición de MetAP2. La secuencia detectada para las células HT1080 + bEND3 tratadas con TNP470 es M¹GKEKTHINI.

- 5 La Figura 4 muestra la identificación de la proteína después de la digestión en gel de la Banda 1 y la Banda 2 (ver la Figura 2) y el mapa peptídico de masas y la anotación de la base de datos.

- La Figura 5 muestra la determinación del N-terminal que comprende las etapas de: localización del péptido N-terminal, determinación de la secuencia mediante MSMS y caracterización del procesamiento N-terminal. El mapa peptídico de masas de la Banda 1 corresponde a la secuencia acGKEKTHINIWIGHVDSGK (M+H⁺: 2.073,2); el mapa de masas de la Banda 2 corresponde a la secuencia MGKEKTHINIVVIGHVDSGK (M+H⁺: 2.162,2).
- 10

La Figura 6 muestra el análisis MSMS de la masa parental 2.073,2 D de la digestión trípica de la Banda 1, que revela la secuencia acGKEKTHINIVVIGHVDSGK.

La Figura 7 muestra el análisis MSMS de la masa parental 2.162,2 D de la digestión trípica de la Banda 2, que revela la secuencia MGKEKTHINIVVIGHVDSGK.

- 15 La Figura 8 muestra la evaluación de la identificación de EEF1A para dos extractos celulares (carril 1, 3: DMSO; carril 2, 4: TNP470).

La Figura 9 muestra el desplazamiento de movilidad del EEF1A en los extractos celulares bEND3 tratados con TNP470. Ninguna banda adicional tuvo lugar en la muestra de control (0.5 % DMSO) después de 48 h.

- 20 La Figura 10 muestra el desplazamiento de movilidad del EEF1A1 con controles negativos distinguibles de manera inequívoca de los inhibidores activos de MetAP2 (TNP-470, A-832234; carril 1-4: ver Tabla 1).

La Figura 11 muestra el alineamiento de secuencia de EEF1A1 (P68104; SEQ ID NO: 1) y EEF1A2 (Q05639; SEQ ID NO: 2), que presenta un 92.7 % de identidad de secuencia. Ambos números de acceso hacen referencia a la base de datos de secuencias Swiss-Prot.

EJEMPLO 1: El patrón relacionado con tratamiento muestra una nueva banda con pl inferior después del IEF.

- 25 La separación por IEF de los extractos celulares después del tratamiento de diferentes células endoteliales y cancerígenas (de ratón: bEND3, humanas: HT1080, HCT116), se llevó a cabo en un rango de pH 7-9 (Figura 1). Al comparar los extractos de células tratadas con DMSO y tratadas con el inhibidor de MetAP2 (100 nM TNP-470; 1 µM de ácido 2-[2-((Z)-3-dietilamino-propenil)-4-fluoro-bencenosulfonilamino]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-1-carboxílico, que es idéntico a A-8322345), se detectó una nueva banda proteica (Figura 1, banda 2, ver flecha) después de la tinción con azul de Coomassie. Se muestra una vista aumentada en la Figura 2.
- 30

EJEMPLO 2: La caracterización de EEF1A1 mediante secuenciación de Edman

- Mediante la secuenciación N-terminal de la banda proteica tal como se obtuvo en el Ejemplo 1, se determinó la secuencia de aminoácidos MGKEKTHINI. Una comparación con una secuencia de una base de datos identificó la correspondiente proteína como EEF1α para la Banda 2 (Figura 3). Ninguna señal de aminoácidos se detectó para la Banda 1, lo cual es habitual para las proteínas bloqueadas en el N-terminal.
- 35

EJEMPLO 3: Caracterización de EEF1A1 mediante espectrometría de masas

- La digestión trípica en gel de la Banda 1 y Banda 2 tal como se obtuvo en el ejemplo 1 se aplicó para análisis de masa. Las listas de masas correspondientes también identificaron la proteína EEF1A1 para ambas digestiones en la búsqueda en bases de datos. Esta anotación de acuerdo con el resultado de la secuencia N-terminal de la Banda 2 (ver el Ejemplo 2, Figura 3). Los péptidos trípticos anotados con respecto a la secuencia de EEF1A1 se muestran en la Figura 4.
- 40

De manera sorprendente, la comparación de ambos mapas de masas mostraron que cada uno contenía una masa peptídica diferencial. La Banda 2 contenía un péptido Mm= 2.162 D que no estaba presente en la Banda 1; para la Banda 1 se detectó exclusivamente un péptido de Mm= 2.073 D (Figura 5).

- 45 La fragmentación de espectrometría de masas del péptido a una Mm= 2.162 D identificó el péptido que contiene la metionina MGKEKTHINIVVIGHVDSGK (Figura 7), y el péptido de Mm= 2.073 D identificó la forma acetilada y

dividida en el extremo amino –terminal acGKEKTHINIVVIGHVDSGK (Figura 6). Esta observación se realizó de acuerdo con la presencia de la Banda 2 de EEF1A1 en especial después del tratamiento con TNP470.

EJEMPLO 4: El inmunoanálisis confirma la identidad de EEF1A1

- 5 Ambas bandas tal como se obtuvieron en el Ejemplo 1 fueron detectadas de manera específica utilizando un anticuerpo policlonal de EEF1A1 anti humano de PcAb de conejo, el cual también reacciona entrecruzadamente con el homólogo de ratón. La evaluación de la identificación de EEF1A1 para dos extractos celulares se muestra en la Figura 8.

EJEMPLO 5: el desplazamiento de movilidad relacionada con el tratamiento se observa independientemente del tipo de célula

- 10 El desplazamiento de movilidad de EEF1A1 pudo ser detectado de manera fiable en todos los tipos de células sometidas a prueba con dos inhibidores de MetAP2 distintos estructuralmente (TNP470) tal y como se muestra en la Figura 9 (se muestra: extracto celular de bEND3). Ninguna banda adicional tuvo lugar en la muestra de control incluso después de 48 h, mientras que una segunda banda (Banda 2) con intensidad aumentada se pudo ver después de 2 h (Figura 9). Los controles negativos se distinguieron de forma inequívoca de los compuestos activos (Figura 10; Tabla 1).

Tabla 1

Carril	Compuesto	Concentración [M]	Inhibición de la actividad de MetAP2 [M]	Inhibición de la proliferación de HUVEC (incorporación de BrdU) [M]
1	DMSO			
2	A-832234	1e-06	1e-08	7e-09
3	TNP470	1e-07	1.4e-08	1e-10
4	control	1e-05	1.1e-06	n.d.

EJEMPLO 6:

- 20 Las dos isoformas EEF1A1 y EEF1A2 comprenden una identidad de secuencia del 92.7% (Figura 11). Ambas isoformas son idénticas dentro de los primeros 82 aminoácidos y, por lo tanto, son sustratos de MetAP2.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Merck Patent GmbH

<120> Uso de EEF1A como biomarcador y un método para el cribado de inhibidores de MetAP2

<130> P 08/168

- 25 <150> EP08019432.7

<151> 2008-11-06

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

- 30 <211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 402 564 T3

<400> 1

Met Gly Lys Glu Lys Thr His Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val
1 5 10 15

Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Thr Gly His Leu Ile Tyr Lys Cys Gly
20 25 30

Gly Ile Asp Lys Arg Thr Ile Glu Lys Phe Glu Lys Glu Ala Ala Glu
35 40 45

Met Gly Lys Gly Ser Phe Lys Tyr Ala Trp Val Leu Asp Lys Leu Lys
50 55 60

Ala Glu Arg Glu Arg Gly Ile Thr Ile Asp Ile Ser Leu Trp Lys Phe
65 70 75 80

Glu Thr Ser Lys Tyr Tyr Val Thr Ile Ile Asp Ala Pro Gly His Arg
85 90 95

Asp Phe Ile Lys Asn Met Ile Thr Gly Thr Ser Gln Ala Asp Cys Ala
100 105 110

Val Leu Ile Val Ala Ala Gly Val Gly Glu Phe Glu Ala Gly Ile Ser
115 120 125

Lys Asn Gly Gln Thr Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Tyr Thr Leu Gly
130 135 140

Val Lys Gln Leu Ile Val Gly Val Asn Lys Met Asp Ser Thr Glu Pro
145 150 155 160

ES 2 402 564 T3

Pro Tyr Ser Gln Lys Arg Tyr Glu Glu Ile Val Lys Glu Val Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ile Lys Lys Ile Gly Tyr Asn Pro Asp Thr Val Ala Phe Val Pro
 180 185 190
 Ile Ser Gly Trp Asn Gly Asp Asn Met Leu Glu Pro Ser Ala Asn Met
 195 200 205
 Pro Trp Phe Lys Gly Trp Lys Val Thr Arg Lys Asp Gly Asn Ala Ser
 210 215 220
 Gly Thr Thr Leu Leu Glu Ala Leu Asp Cys Ile Leu Pro Pro Thr Arg
 225 230 235 240
 Pro Thr Asp Lys Pro Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile
 245 250 255
 Gly Gly Ile Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Val Leu
 260 265 270
 Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu
 275 280 285
 Val Lys Ser Val Glu Met His His Glu Ala Leu Ser Glu Ala Leu Pro
 290 295 300
 Gly Asp Asn Val Gly Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Val
 305 310 315 320
 Arg Arg Gly Asn Val Ala Gly Asp Ser Lys Asn Asp Pro Pro Met Glu
 325 330 335
 Ala Ala Gly Phe Thr Ala Gln Val Ile Ile Leu Asn His Pro Gly Gln
 340 345 350
 Ile Ser Ala Gly Tyr Ala Pro Val Leu Asp Cys His Thr Ala His Ile
 355 360 365
 Ala Cys Lys Phe Ala Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly
 370 375 380
 Lys Lys Leu Glu Asp Gly Pro Lys Phe Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ala
 385 390 395 400
 Ile Val Asp Met Val Pro Gly Lys Pro Met Cys Val Glu Ser Phe Ser
 405 410 415

Asp Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr
 420 425 430

Val Ala Val Gly Val Ile Lys Ala Val Asp Lys Lys Ala Ala Gly Ala
 435 440 445

Gly Lys Val Thr Lys Ser Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Lys
 450 455 460

<210> 2

<211> 463

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr	His	Ile	Asn	Ile	Val	Val	Ile	Gly	His	Val	1	5	10	15
Asp	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Thr	Thr	Gly	His	Leu	Ile	Tyr	Lys	Cys	Gly	20	25	30	
Gly	Ile	Asp	Lys	Arg	Thr	Ile	Glu	Lys	Phe	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	Glu	35	40	45	
Met	Gly	Lys	Gly	Ser	Phe	Lys	Tyr	Ala	Trp	Val	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	50	55	60	
Ala	Glu	Arg	Glu	Arg	Gly	Ile	Thr	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Trp	Lys	Phe	65	70	75	80
Glu	Thr	Thr	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Ile	Ile	Asp	Ala	Pro	Gly	His	Arg	85	90	95	
Asp	Phe	Ile	Lys	Asn	Met	Ile	Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Ala	Asp	Cys	Ala	100	105	110	
Val	Leu	Ile	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Glu	Phe	Glu	Ala	Gly	Ile	Ser	115	120	125	
Lys	Asn	Gly	Gln	Thr	Arg	Glu	His	Ala	Leu	Leu	Ala	Tyr	Thr	Leu	Gly	130	135	140	
Val	Lys	Gln	Leu	Ile	Val	Gly	Val	Asn	Lys	Met	Asp	Ser	Thr	Glu	Pro	145	150	155	160
Ala	Tyr	Ser	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Glu	Ile	Val	Lys	Glu	Val	Ser	Ala	165	170	175	

ES 2 402 564 T3

Tyr Ile Lys Lys Ile Gly Tyr Asn Pro Ala Thr Val Pro Phe Val Pro
 180 185 190
 Ile Ser Gly Trp His Gly Asp Asn Met Leu Glu Pro Ser Pro Asn Met
 195 200 205
 Pro Trp Phe Lys Gly Trp Lys Val Glu Arg Lys Glu Gly Asn Ala Ser
 210 215 220
 Gly Val Ser Leu Leu Glu Ala Leu Asp Thr Ile Leu Pro Pro Thr Arg
 225 230 235 240
 Pro Thr Asp Lys Pro Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile
 245 250 255
 Gly Gly Ile Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Ile Leu
 260 265 270
 Arg Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro Val Asn Ile Thr Thr Glu
 275 280 285
 Val Lys Ser Val Glu Met His His Glu Ala Leu Ser Glu Ala Leu Pro
 290 295 300
 Gly Asp Asn Val Gly Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Ile
 305 310 315 320
 Arg Arg Gly Asn Val Cys Gly Asp Ser Lys Ser Asp Pro Pro Gln Glu
 325 330 335
 Ala Ala Gln Phe Thr Ser Gln Val Ile Ile Leu Asn His Pro Gly Gln
 340 345 350
 Ile Ser Ala Gly Tyr Ser Pro Val Ile Asp Cys His Thr Ala His Ile
 355 360 365
 Ala Cys Lys Phe Ala Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly
 370 375 380
 Lys Lys Leu Glu Asp Asn Pro Lys Ser Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ala
 385 390 395 400
 Ile Val Glu Met Val Pro Gly Lys Pro Met Cys Val Glu Ser Phe Ser
 405 410 415
 Gln Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr
 420 425 430

Val Ala Val Gly Val Ile Lys Asn Val Glu Lys Lys Ser Gly Gly Ala
435 440 445

Gly Lys Val Thr Lys Ser Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gly Lys
450 455 460

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gly Lys Glu Lys Thr His Ile Asn Ile
1 5 10

<210> 4

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Acetilación

<222> (1)..(1)

15 <400> 4

Gly Lys Glu Lys Thr His Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val Asp
1 5 10 15

Ser Gly Lys

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 402 564 T3

Met Gly Lys Glu Lys Thr His Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val
1 5 10 15

Asp Ser Gly Lys
 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para el cribado de compuestos, que inhiben la actividad de la metionina aminopeptidasa 2 (MetAP2), que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2 y/o el factor de elongación de traducción eucariótico 1 alfa (EEF1A), en donde el sistema se selecciona a partir del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,
 - (b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados, y
 - (c) detectar la inhibición de MetAP2 determinando el EEF1A con el residuo de metionina N-terminal (MetEEF1A).
2. El método de acuerdo a la reivindicación 1, que comprende el paso adicional de:
 - (d) detectar la unión específica de compuestos a la proteína MetAP2.
3. El método de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa (c) comprende las etapas adicionales de:
 - (c') correlacionar una cantidad de señal, o un cambio en la señal, de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema, y
 - (c'') detectar un nivel de inhibición de MetAP2 comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema celular que no está incubado con los compuestos y/o en un sistema celular que está incubado con un compuesto estándar que tiene actividad inhibidora de MetAP2.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde adicionalmente en la etapa (c) se determina EEF1A con un residuo de glicina N-terminal acetilado (acGlyEEF1A), en la etapa (c') una cantidad de señal, o cambio en la señal, de acGlyEEF1A se correlaciona con una concentración de acGlyEEF1A en el sistema y, de manera opcional, se determina una razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A, y en la etapa (c'') la concentración de acGlyEEF1A y/o la razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A se compara con otra concentración de acGlyEEF1A y/o otra razón de MetEEF1A con respecto a acGlyEEF1A en un sistema celular que no está incubado con los compuestos y/o en un sistema celular que está incubado con un compuesto estándar que tiene actividad inhibidora de MetAP2.
5. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, preferentemente de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para el cribado de compuestos, que proporciona actividad anti proliferativa, preferentemente actividad anti angiogénica y/o antitumoral.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 para el cribado de compuestos terapéuticos para una condición o trastorno impulsado por proliferación, en donde en la etapa (a) se proporcionan mamíferos, de manera preferente mamíferos de laboratorio, cuyo MetEEF1A se determina en una muestra biológica tomada de mamíferos, en la etapa (b) los compuestos se administran a los mamíferos, y en la etapa (c) se detecta un efecto terapéutico mediante la determinación de MetEEF1A en muestras biológicas tomadas de mamíferos, en donde un aumento en MetEEF1A indica una probabilidad aumentada de que los compuestos son terapéuticos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde la etapa (c) comprende las etapas adicionales de:
 - (c') correlacionar una cantidad de señal, o un cambio en la señal, de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema, y
 - (c'') detectar un nivel de actividad anti-proliferativa comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema de células proliferativas y/o no proliferativas.
8. Un método para la monitorización de la probabilidad de respuesta a un tratamiento de enfermedades cancerígenas, que están causadas, mediadas y/o propagadas por la actividad de metAP2, en donde MetEEF1A se determina en una muestra biológica tomada de un mamífero en necesidad de dicho tratamiento con al menos un inhibidor de MetAP2, o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, y que se administró a dicho mamífero, en donde un aumento en MetEEF1A indica una probabilidad aumentada de que dicho mamífero responde al tratamiento con dicho compuesto.
9. Un método para el cribado de compuestos, que activan la actividad de MetAP2, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2, en donde el sistema se selecciona del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,

(b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados,

(c) determinar MetEEF1A,

5 (c') correlacionar una cantidad de señal, o un cambio en la señal, de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema,

(c'') detectar la actividad de MetAP2 comparando la concentración de MetEEF1A con otra concentración de MetEEF1A en un sistema celular que se incubaba con un compuesto estándar que tiene actividad activadora de MetAP2, y de manera opcional

10 (d) detectar la unión específica de compuestos a la proteína MetAP2.

10. Un método para determinar la actividad de MetAP2 que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema celular o una muestra del mismo que exprese MetAP2, en donde el sistema se selecciona del grupo de células individuales, cultivos celulares, tejidos, órganos y mamíferos no humanos,

(b) incubar al menos una parte del sistema con compuestos a ser cribados, y

15 (c) determinar la actividad de MetAP2 determinando MetEEF1A y correlacionando una cantidad de señal, o un cambio en la señal de MetEEF1A con una concentración de MetEEF1A en el sistema, en donde la actividad de MetAP2 y la concentración de MetEEF1A son inversamente proporcionales.

20 11. Uso de EEF1A1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o EEF1A2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o variantes, mutantes, partes de la secuencia de aminoácidos o al menos un 85% de secuencias homólogas que tienen la misma función, o un ácido nucleico que codifica EEF1A1 y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica EEF1A2, como biomarcador para evaluar una reducción de la actividad de MetAP2.

25 12. Un método in-vitro para predecir la probabilidad de que un paciente que sufre de una enfermedad cancerígena responda terapéuticamente al tratamiento con un fármaco anti MetAP2, comprende las etapas de (i) medir en una muestra de tejido de una biopsia de un tejido tumoral o plasma de dicho paciente el nivel de expresión del marcador MetEEF1A en base a proteínas, (ii) exponer una muestra de tejido ex-vivo de un tumor o plasma de dicho paciente a dicho fármaco anti-MetAP2, y (iii) medir en dicha muestra de tejido expuesto de la etapa (ii) el nivel de expresión de dicho biomarcador especificado en la etapa (i), junto con calcular las diferencias en los niveles de expresión en las etapas (ii) y (iii), en donde un aumento en el nivel de expresión de dicho biomarcador obtenido en esta etapa (iii) en
30 comparación a la etapa (i) indica un aumento de la probabilidad de que dicho paciente responda terapéuticamente al tratamiento con dicho fármaco anti MetAP2.

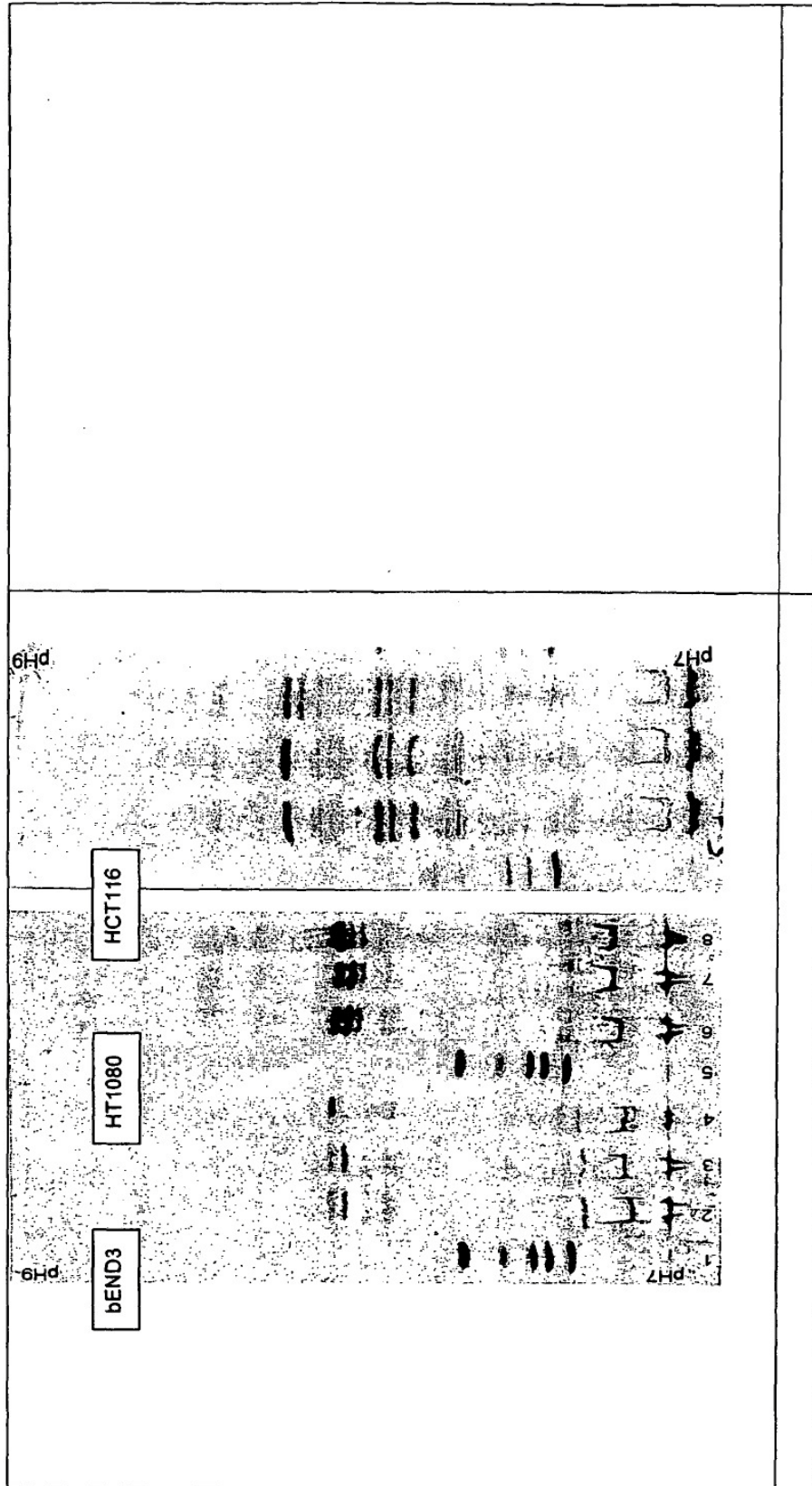


Figura 1

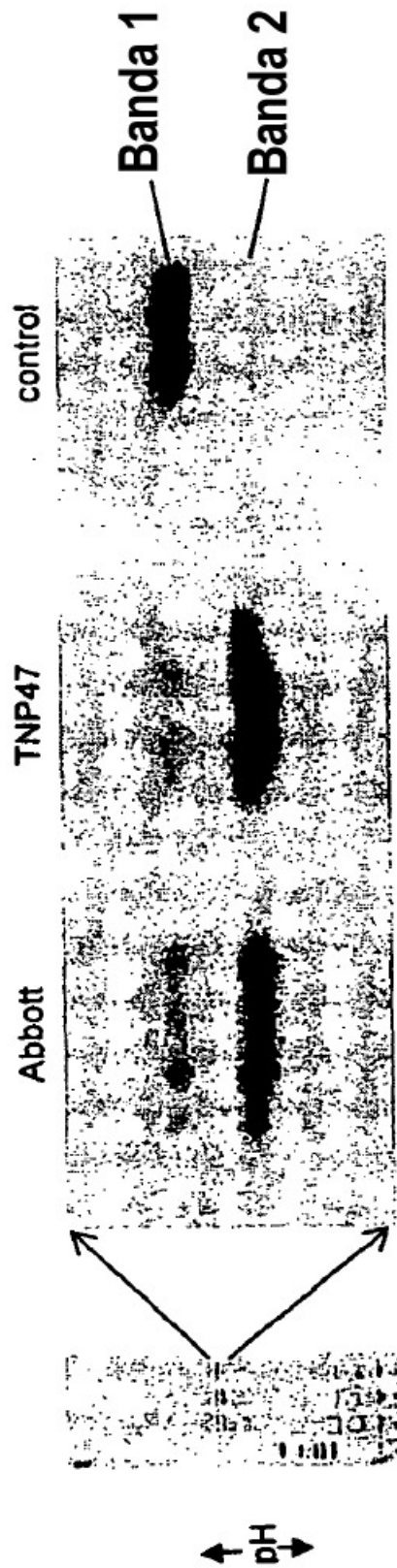


Figura 2

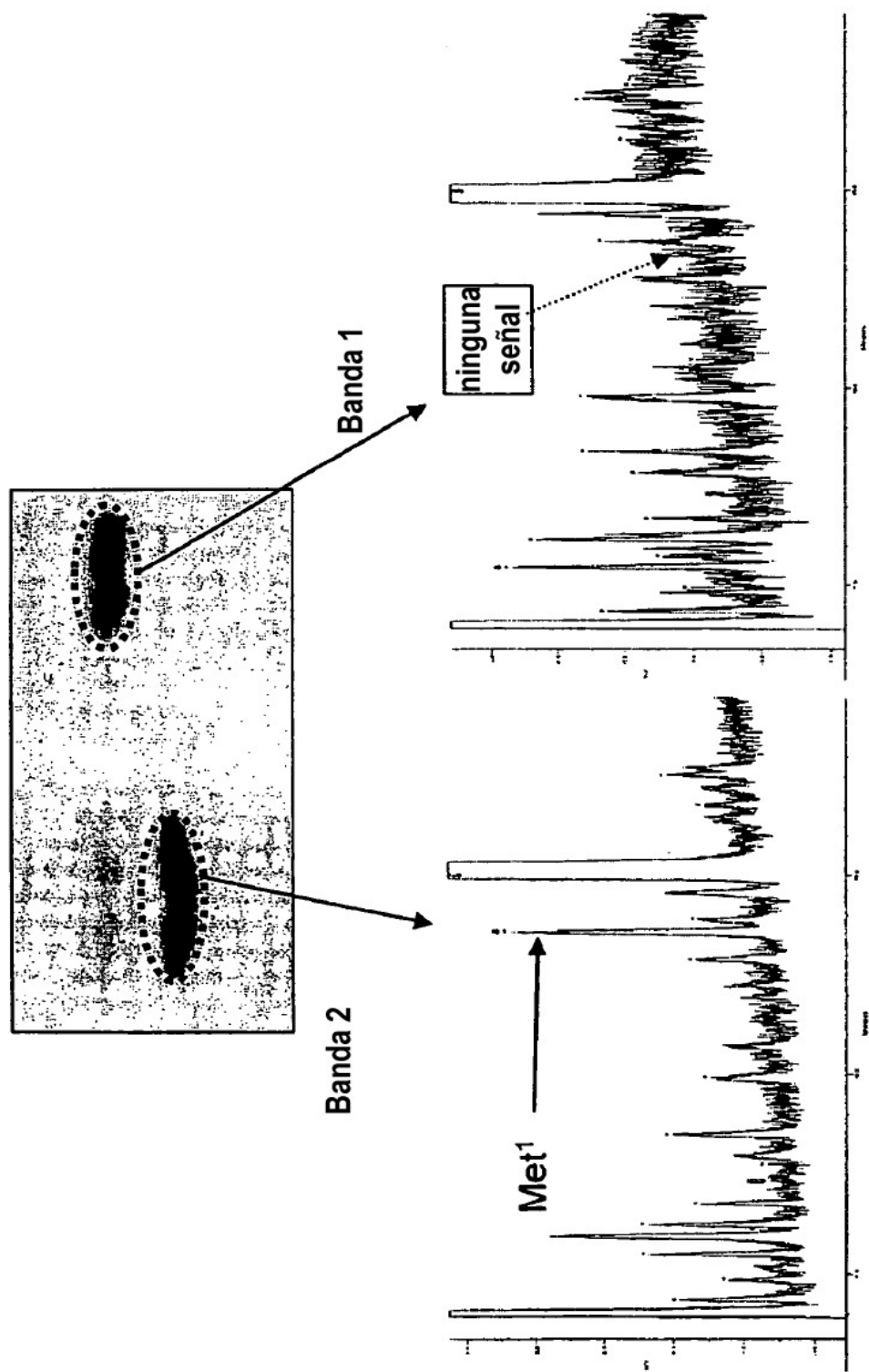


Figura 3

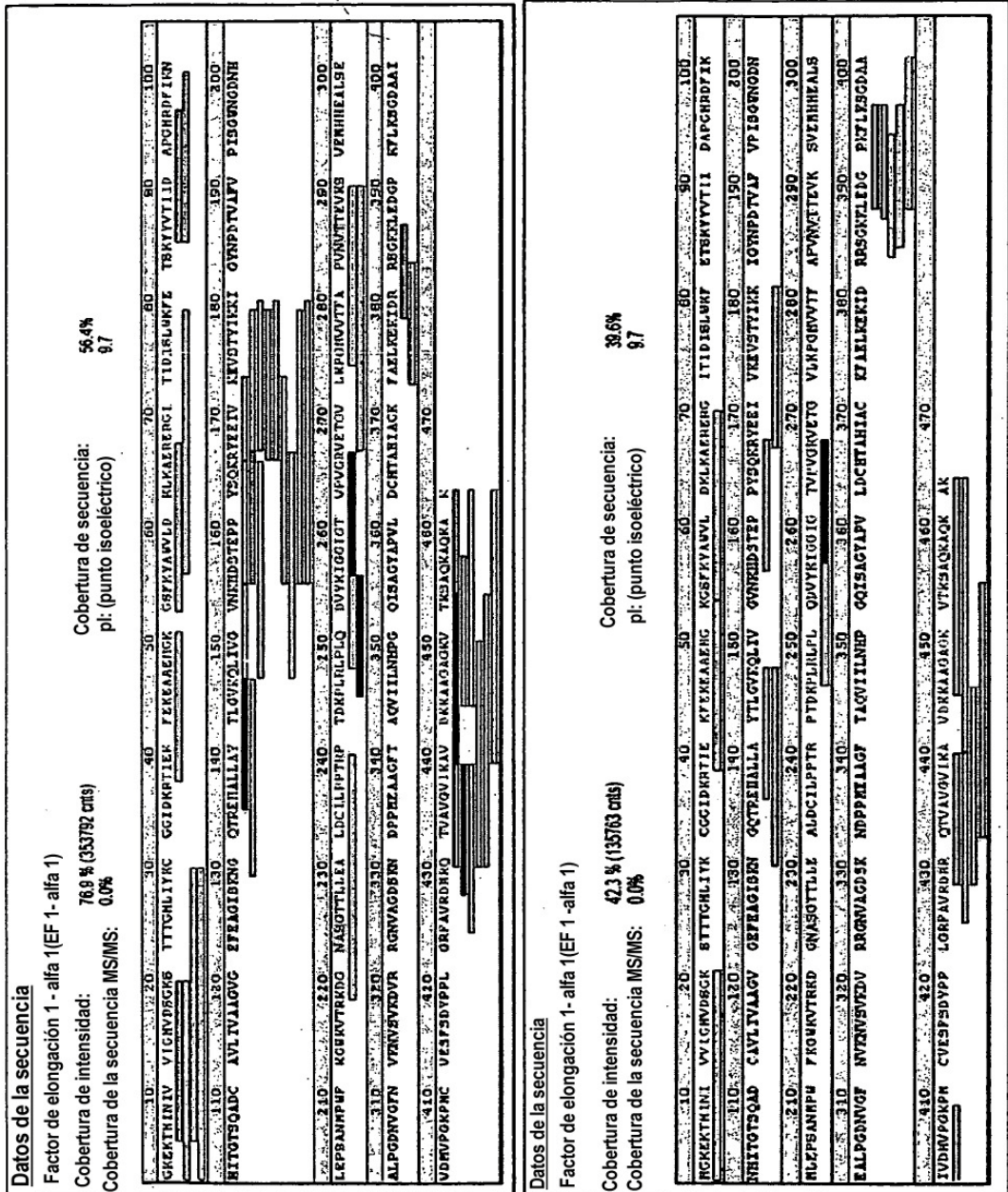


Figura 4

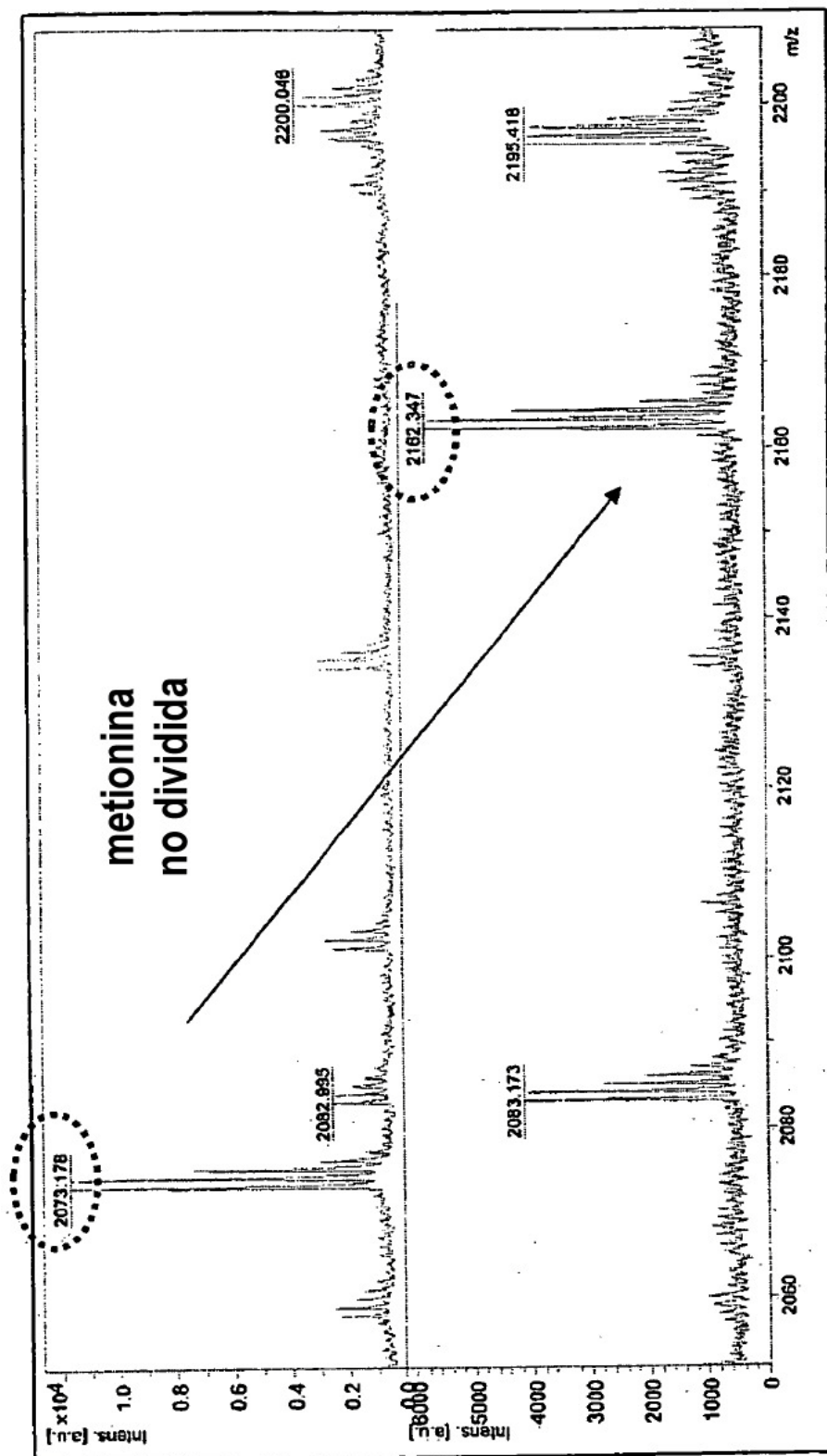


Figura 5

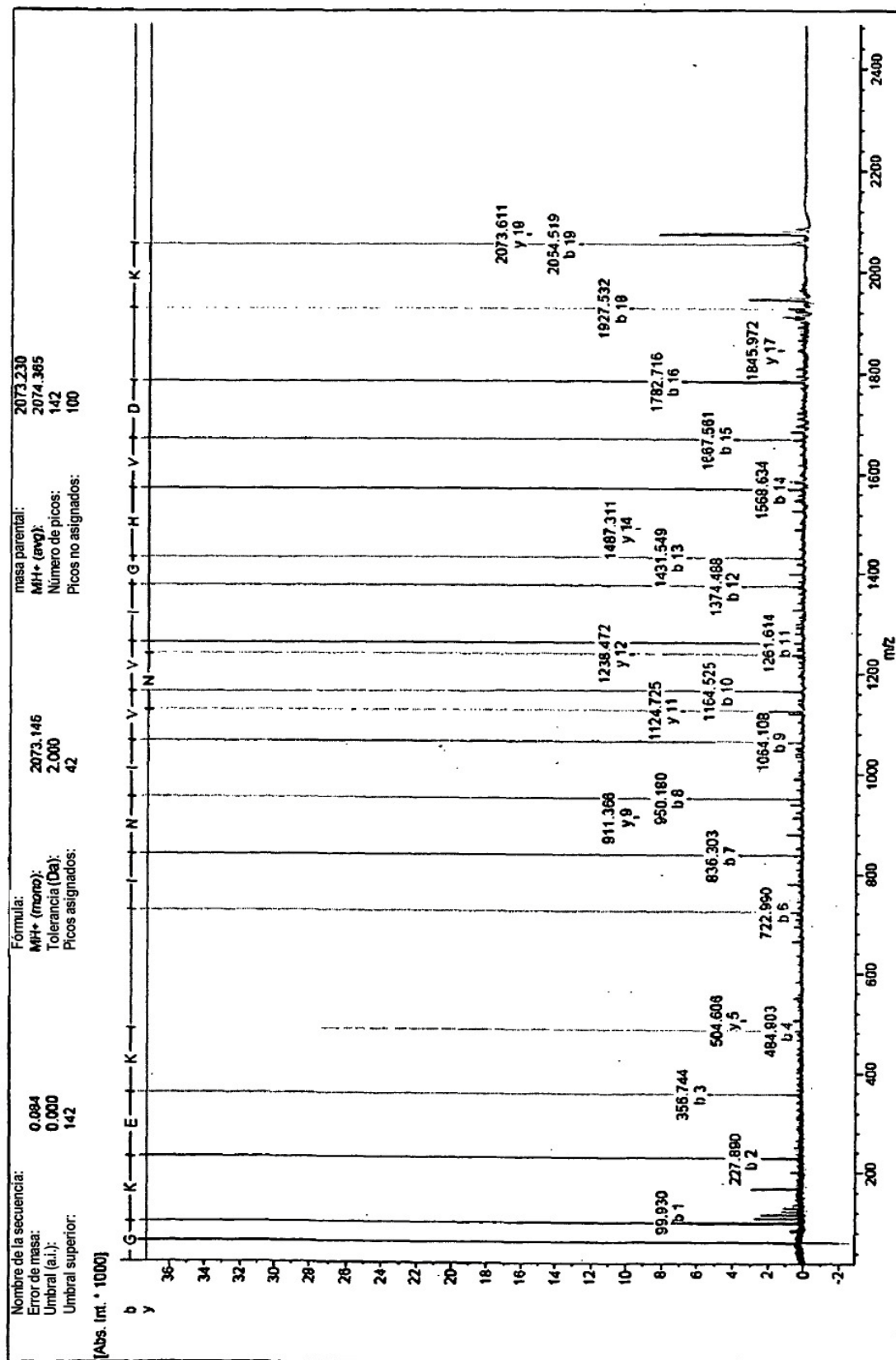
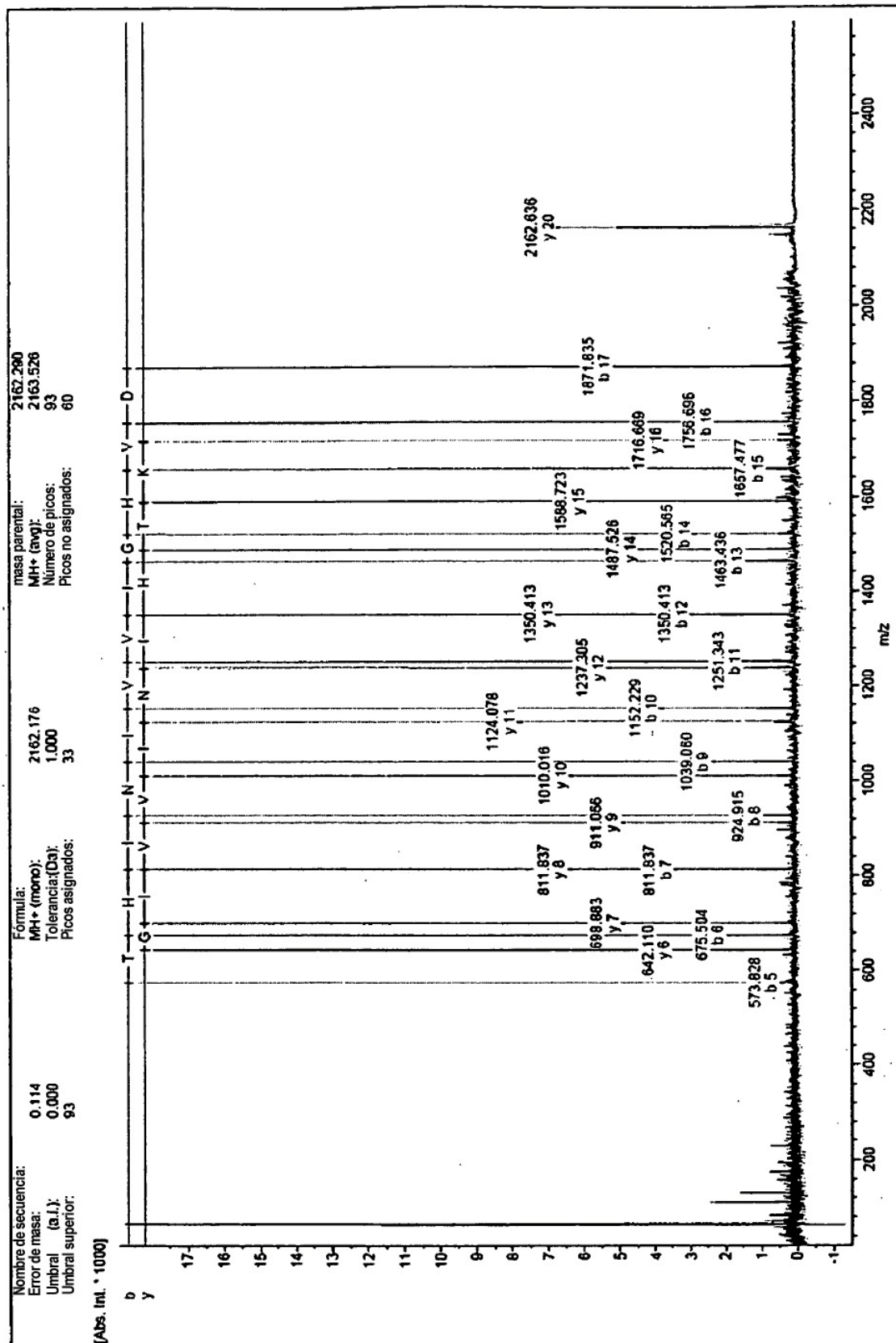


Figura 6



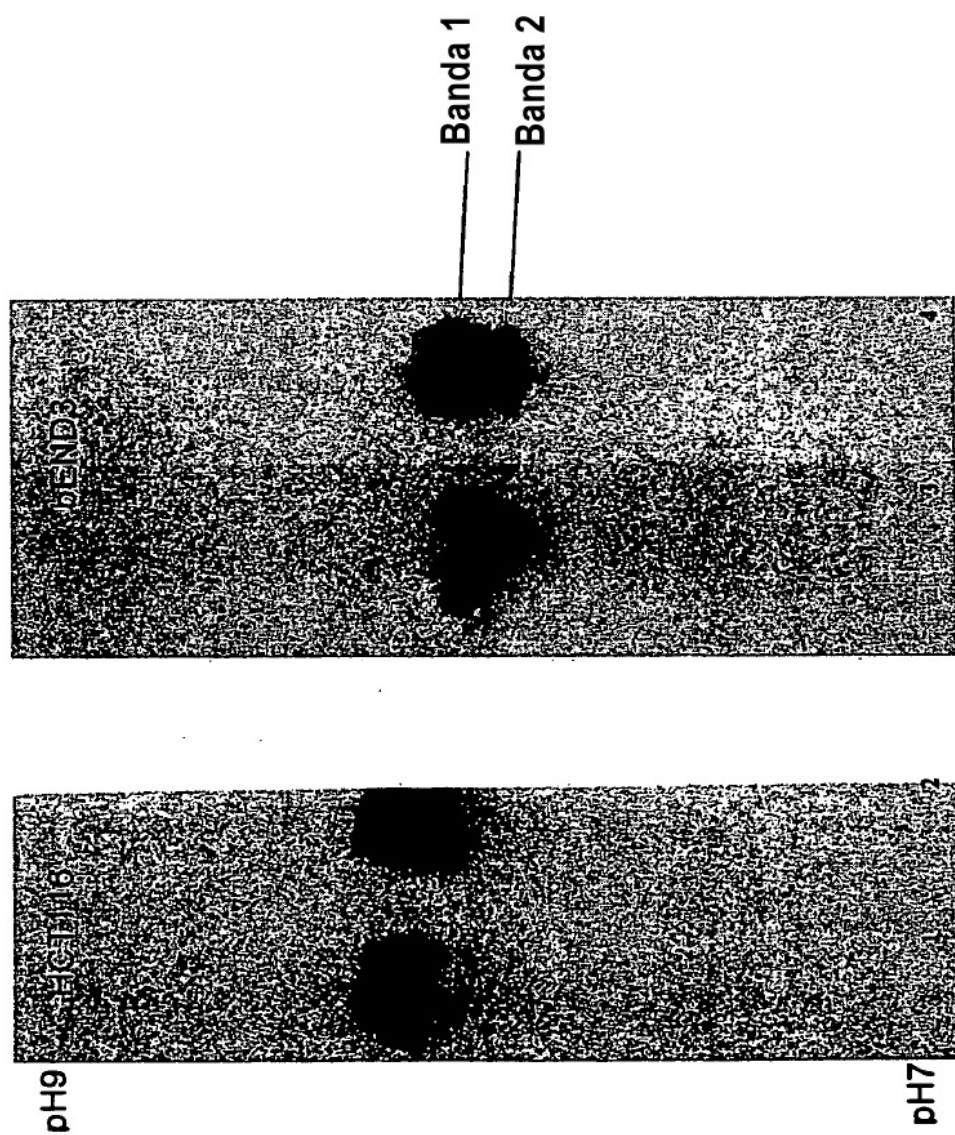


Figura 8

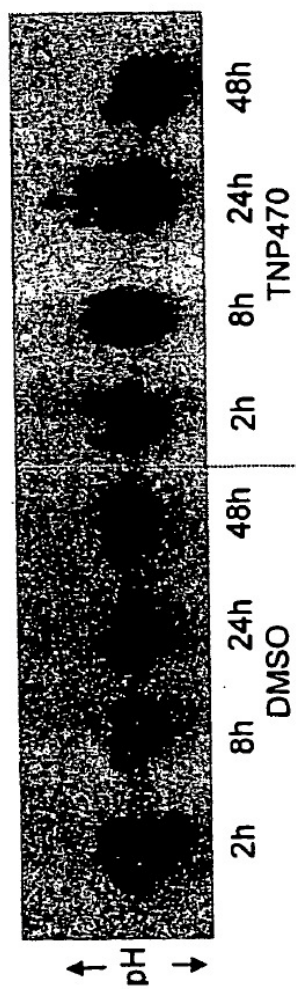


Figura 9

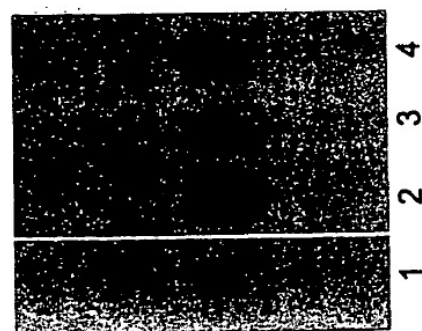


Figura 10

P68104.pro q05639.pro	10	20	30	40	50	60	70	80	80
	MGKEKTHI NI VVI GHVDSGKSTTTGHLI YKCGGI DKRTI EKFEKEAAEMGKGSFYAWL/DKLKAERERGI TI DI SLWKF								
	MGKEKTHI NI VVI GHVDSGKSTTTGHLI YKCGGI DKRTI EKFEKEAAEMGKGSFYAWL/DKLKAERERGI TI DI SLWKF								
P68104.pro q05639.pro	90	100	110	120	130	140	150	160	160
	ETSKYYVITI I DAPGHRDFI KNMI TGTQADCAVLI VAAGVGEFEAGI SKNGQTRHALLAYTLGVKQLI VGVNKMNDSTEP								
	ETSKYYI TI I DAPGHRDFI KNMI TGTQADCAVLI VAAGVGEFEAGI SKNGQTRHALLAYTLGVKQLI VGVNKMNDSTEP								
P68104.pro q05639.pro	170	180	190	200	210	220	230	240	240
	PYSQKRYEEI VKEVSTMI KKI GYNPDI VAFVPI SGWNGDNMLEPSANMPWF KGWVTRKDGNASGTTLL EALDCI LPPTR								
	AYSEKRYDEI VKEVSAI KKI GYNPATVPFVPI SGWNGDNMLEPSANMPWF KGWVERKEGNASGVSL EALDTI LPPTR								
P68104.pro q05639.pro	250	260	270	280	290	300	310	320	320
	PTDKPLRLPLQDVYKI GGI GTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPVNVITTEVKSVEMHHEAL SEAL PGDNVGFNVKNVSVKQV								
	PTDKPLRLPLQDVYKI GGI GTVPVGRVETGI RPPGMVVTFAPVNI TTEVKSVEMHHEAL SEAL PGDNVGFNVKNVSVKQI								
P68104.pro q05639.pro	330	340	350	360	370	380	390	400	400
	RRGNVAGDSKNDPPMEAGFTAQVI I LNHPGQI SAGYAPVLDCHTAHI ACKFAELKEKI DRRSGKKLEGGPKF KSGDAA								
	RRGNVCGDSKSDPPQEAQFTSQVI I LNHPGQI SAGYSPVI DCHTAHI ACKFAELKEKI DRRSGKKLEDPKSL KSGDAA								
P68104.pro q05639.pro	410	420	430	440	450	460			
	VDNVPGKPMCVESFSQYPPPLGRFAVRDMRQTVAVGVI KAMDKKAAGAGKVTKSQAQKAQA-K								
	VENVPGKPMCVESFSQYPPPLGRFAVRDMRQTVAVGVI KNVKKSGGAGKVTKSQAQKAQAQX								

Decoration 'Decoration #1': residuos de caja que coinciden exactamente con la secuencia consenso

Figura 11