

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 416**

51 Int. Cl.:

A61K 31/51

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2006** **E 10009323 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2256500**

54 Título: **Uso de inhibidores de la enzima TKTL-1**

30 Prioridad:

07.03.2005 EP 05004930

17.06.2005 EP 05013170

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2014

73 Titular/es:

COY, JOHANNES F., DR. (100.0%)

Krötengasse 10

64853 Otzberg, DE

72 Inventor/es:

COY, DR., JOHANNES F.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 480 416 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 inhibidores de la enzima TKTL-1

La invención se refiere al uso de una tiamina seleccionada del grupo que consiste en oxitiamina, benfooxitiamina (=oxibenfotiamina), piritiamina y 2-metiltiamina para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) y para el tratamiento terapéutico o el control de enfermedades asociadas con una ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) disminuida o aumentada.

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

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

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

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

Los detalles de esta aGF-mam son los siguientes:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente divulgación se basa en el objetivo de (a) proporcionar un procedimiento para una detección (y control) cualitativa y cuantitativa del grado (nivel) de uso y del flujo correcto del proceso (normal, natural) de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) en un individuo mamífero, es decir un procedimiento para controlar si este metabolismo/ruta/proceso se desarrolla realmente en las células investigadas del organismo mamífero apropiado, si se diera el caso en que grado y si se desarrolla "normal" o correcto, respectivamente o si se producen fallos o anomalías, y (b) poner a disposición un medio con el que una aGF-mam pueda verse afectada, en particular potenciada o inhibida.

Este objetivo se consigue con un procedimiento (in vitro) para la detección (y control) cualitativa y cuantitativa del grado (nivel) de uso y el flujo correcto del proceso (normal, natural) de la ruta metabólica de fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos "aGF-mam" (o proceso de fermentación del ácido láctico en mamíferos) en un individuo (paciente) mamífero, **caracterizado por que**

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

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

La detección (determinación) puede realizarse en solución o usando reactivos fijados a una fase sólida. La detección

de uno o más marcadores moleculares, tales como polipéptidos o ácidos nucleicos, puede realizarse en una sola mezcla de reacción o en dos o en mezclas de reacción individuales. Como alternativa, las reacciones de detección para diversas moléculas marcadoras pueden, por ejemplo, realizarse de manera simultánea en recipientes de reacción multipocillo. Los marcadores característicos para los productos del gen TKTL1 pueden detectarse usando reactivos que reconozcan específicamente estas moléculas. La reacción de detección para las moléculas marcadoras puede comprender una o más reacciones con agentes de detección que reconozcan las moléculas marcadoras iniciales o reconozcan las moléculas anteriores usadas para reconocer a otras moléculas.

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

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

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

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

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

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

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

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

Además dicho procedimiento puede comprender la detección de autoanticuerpos dirigidos contra polipéptidos codificados por el gen TKTL1. Los polipéptidos utilizados para los procedimientos pueden utilizarse para detectar la presencia o ausencia de dichos anticuerpos en fluidos corporales mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

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

La formación de imágenes molecular difiere de las técnicas convencionales porque esta identifica productos génicos específicos y procesos intracelulares como reacciones enzimáticas específicas. La especificidad del sustrato modificado y el modo de reacción de la enzima TKTL1 puede usarse para la detección de células o tejidos con una actividad enzimática de TKTL1 potenciada o reducida. La especificidad del sustrato modificado y el modo de reacción de la enzima TKTL1 permite la diferenciación entre la actividad enzimática de tres enzimas (de tipo) transcetolasa permitiendo por lo tanto la medición de la actividad enzimática de TKTL1 in vivo. La actividad enzimática puede detectarse, por ejemplo, por formación de imágenes por tomografía de emisión de positrones, por quimioluminiscencia o por radiografía.

La formación de imágenes molecular puede basarse en la conversión enzimática de compuestos inertes o marcados en moléculas detectables durante los procedimientos de formación de imágenes molecular por las moléculas TKTL1. En otro ejemplo el procedimiento de formación de imágenes molecular puede basarse en el uso de compuestos que llevan un marcador adecuado para la formación de imágenes molecular in vivo, tal como radioisótopos, iones metálicos, etc., específicamente uniéndose a moléculas TKTL1 in vivo.

Estos compuestos son preferentemente no tóxicos y pueden eliminarse en la circulación de organismos, tales como seres humanos, en un periodo de tiempo, que permite realizar la detección del marcador acumulado en el tejido que sobreexpresa el gen TKTL1. En casos de una formación de imágenes molecular, para cuya eliminación de la circulación no es relevante (por ejemplo debido a un fondo bajo producido por las moléculas circulantes, etc.) los compuestos para su uso deben administrarse en forma farmacéutica aceptable en composiciones que adicionalmente pueden comprender cualquiera de otras sustancias adecuadas, tales como, por ejemplo, otras sustancias útiles desde el punto de vista del diagnóstico, sustancias útiles desde el punto de vista terapéutico, sustancias transportadoras o similares.

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

La determinación en la etapa (b) del procedimiento puede realizarse a nivel de la proteína, es decir, con la proteína TKTL1 o con un fragmento de la proteína TKTL1 como diana. Preferentemente la determinación se realiza usando una molécula que se una específicamente a la proteína TKTL1.

Preferentemente dicha molécula es un anticuerpo dirigido contra TKTL1 o un fragmento de dicho anticuerpo antiTKTL1 o un peptidomimético que comprenda un epítipo de unión a antígeno o un mini-anticuerpo. Las moléculas diana adecuadas son la propia proteína TKTL1 o un fragmento de la misma o una proteína de fusión que comprenda la proteína TKTL1.

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

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

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

Además de las variantes de la proteína TKTL1 con niveles potenciados o reducidos de actividad enzimática, las proteínas de TKTL1 con localización o agregación y/o dimerización modificada dentro de la célula pueden detectarse en pacientes. Usando anticuerpos monoclonales que detecten específicamente la proteína TKTL1 (Linaris

Biologische Produkte, Wertheim) la proteína TKTL1 dentro del núcleo puede detectarse en células aisladas procedentes de fluidos corporales. Usando inmunocitoquímica puede determinarse la localización de TKTL1 dentro del núcleo y del citoplasma de células de individuos sanos y de pacientes. En un subconjunto de pacientes con Alzheimer puede detectarse una localización potenciada de TKTL1 dentro del núcleo. En pacientes con Alzheimer también existe una agregación diferente de TKTL1. La detección de esta agregación es posible usando electroforesis 2D en geles (Fig. 15). Además, mediante ELISA, usando anticuerpos contra TKTL1 y GAPDH puede detectarse una agregación con otras proteínas, por ejemplo, GAPDH.

Del mismo modo, la determinación en la etapa (b) del procedimiento puede realizarse a nivel de ácidos nucleicos, es decir, con el ácido nucleico TKTL1 o un fragmento de este como diana. El término "ácido nucleico TKTL1", como se usa en el presente contexto, comprende el gen TKTL1, los ARNm de TKTL1 y los ácidos nucleicos que codifican TKTL1.

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

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

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

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

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

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

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a sustratos para TKTL1 marcados y es uso de los mismos como agentes formadores de imágenes, por ejemplo como agentes formadores de imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET) o agentes formadores de imágenes por tomografía de resonancia magnética (MRT) para la detección y localización no invasiva de células y tejidos con una actividad enzimática de TKTL1 potenciada o reducida.

Un sustrato marcado muy adecuado para su uso como agente formador de imágenes para PET es la TKTL1 marcada con ^{18}F . La divulgación también se refiere a procedimientos para sintetizar sustratos marcados y a composiciones que comprenden dichos análogos.

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

de TKTL1, puede aprovecharse para identificar individuos que deben tratarse con tiamina o derivados de tiamina con una mejor biodisponibilidad (por ejemplo benfotiamina).

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

En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para controlar la aGF-mam en un sujeto (paciente) mamífero que necesite dicho control, donde el control comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un inhibidor o activador de la actividad o concentración de la enzima TKTL1.

Con otras palabras: la presente divulgación también se refiere al uso de un inhibidor de la actividad o concentración de la enzima TKTL1 para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición o activación de la aGF-mam, es decir, para el tratamiento terapéutico o control de enfermedades asociadas con una aGF-mam aumentada o disminuida.

Esta explicación técnica se basa en el hallazgo científico (durante el nuevo y sorprendente descubrimiento de la aGF-mam), de que una propiedad importante adicional de la enzima TKTL1 es su idoneidad como una molécula diana para un inhibidor o activador de la aGF-mam.

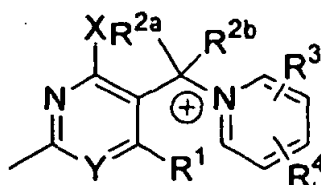
El tratamiento de trastornos asociados con sobreexpresión del gen TKTL1 puede comprender cualquier procedimiento adecuado para la reducción de la actividad del polipéptido TKTL1 en un individuo o en células de un individuo. Estos procedimientos pueden comprender una reducción de la actividad del polipéptido TKTL1 por medio de la reducción de la expresión del gen o por medio de la reducción de la actividad enzimática. Los ejemplos pueden comprender la administración de construcciones antisentido, de ribozimas, de inhibidores enzimáticos, la administración de antagonistas de cofactores de polipéptidos TKTL1, tales como, por ejemplo, compuestos antitiamina o la administración reducida de cofactores esenciales para la actividad enzimática (por ejemplo tiamina).

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

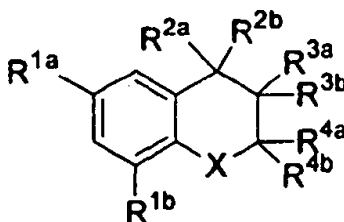
En consecuencia la presente divulgación también comprende una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un inhibidor o activador de la actividad o concentración de la enzima TKTL1 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo preferido de dicha composición farmacéutica comprende un inhibidor de TKLT1 seleccionado del grupo que consiste en oxitiamina, benfooxitiamina (=oxibenfotiamina), hidroxipiruvato, piruvato, *p*-hidrofenilpiruvato, piritiamina, amprolio, 2-metiltiamina, 2-metoxi-*p*-benzoquinona (2-MBQ) y 2,6-dimetoxi-*p*-benzoquinona (2,6-DMBQ), genisteína y flavonoles como por ejemplo quercetina, catequinas, nitrilósidos, antrocianinas; o derivados de éstos.

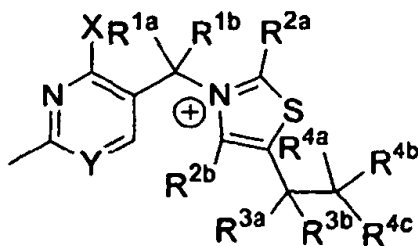
Un ejemplo preferido de dicha composición farmacéutica con efecto inhibidor TKTL1 comprende uno o más derivados de Amprolio que tienen la estructura química (fórmula estructural):



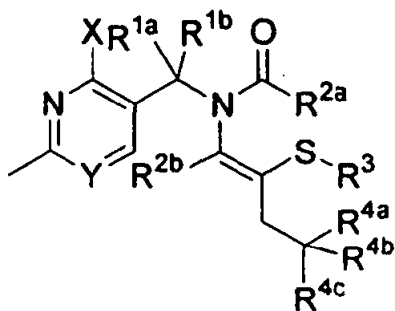
y/o al menos un Flavonol que tiene la estructura química (fórmula estructural):



Otro ejemplo preferido de una composición farmacéutica con efecto inhibidor TKTL1 comprende uno o más derivados de tiamina y/o benfotiamina que tienen la estructura química (fórmula estructural)

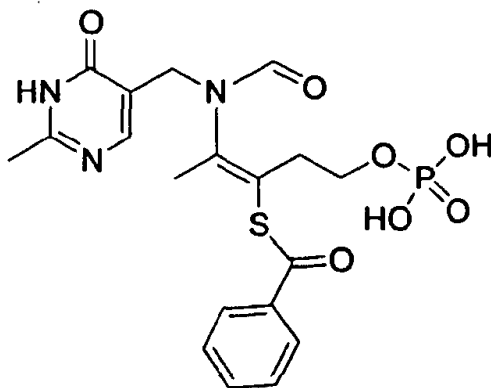


5 para derivados de tiamina y (b):



10 para derivados de benfotiamina.

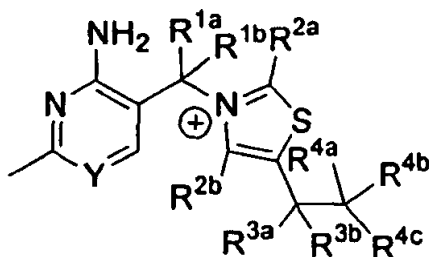
Un derivado de benfotiamina inhibidor preferido es la oxibenfotiamina (= benfooxitiamina) que tiene la estructura química (fórmula estructural):



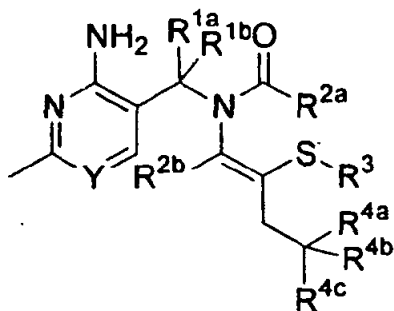
Oxibenfotiamina

20 Un ejemplo preferido de una composición farmacéutica con efecto activador TKTL1 comprende tiamina y/o benfotiamina y/o derivados de estos funcionalmente equivalentes, es decir, de activación.

Los derivados de activación de tiamina tienen preferentemente la estructura química (fórmula estructural):



Y los derivados de activación de benfotiamina tienen preferiblemente la estructura química (fórmula estructural):



5

Sustituyendo o añadiendo uno o más de los siguientes grupos pueden generarse derivados de los activadores o inhibidores indicados anteriormente:

- 10 grupos alquilo alifáticos (C_1 - C_{12}) lineales y ramificados, sustituidos con al menos un grupo seleccionado de OH, NH_2 , SH, CN, CF_3 , halógeno, $CONHR^5$, $COOR^5$, OR^5 , SR^5 , $SiOR^5$, NHR^5 , anillos alifáticos (C_3 - C_6) y anillos aromáticos (C_3 - C_6), donde R^5 se selecciona de grupos alquilo (C_1 - C_4) lineales y ramificados, grupos arilo, polímeros naturales, polímeros sintéticos y copolímeros, llevando dichos polímeros y copolímeros al menos dos grupos seleccionados de: hidroxilo, carboxilato, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, tiol y aldehído;
- 15 un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, CF_3 , OH, OCF_3 , $COOH$, R^7 , OR^7 y $OCOR^7$, donde R^7 se selecciona de grupos alquilo alifáticos (C_1 - C_4) lineales y ramificados;
- 20 grupos alquilo (C_1 - C_4) monohalogenados y polihalogenados lineales y ramificados y de grupos arilo, donde los grupos arilo están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo seleccionado de OH, NH_2 , SH, CN, CF_3 , halógeno, $COOH$, $CONHR^8$, $COOR^8$, OR^8 , SR^8 y NHR^8 , donde R^8 se selecciona de radicales alquilo (C_1 - C_{12}) lineales y ramificados; y de grupos alquilo (C_1 - C_4) lineales y ramificados y de un grupo CF_3 .

Los inhibidores o activadores de TKTL1 también pueden realizarse en forma de una o más moléculas de ácido nucleico, vectores recombinantes, polipéptidos, secuencias de ARN antisentido, ribozimas y/o anticuerpos.

- 25 Por lo tanto otra composición farmacéutica que es adecuada para la prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con una localización celular anómala de la proteína TKTL1 mutada, estado de agregación y/o estado de dimerización (en comparación con una anticoncepción de control) se **caracteriza porque** comprende una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico, un vector recombinante, un polipéptido, una secuencia de ARN antisentido, una ribozima o un anticuerpo.

- 30 Esta composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, ADN que codifica una TKTL1 funcional. El ADN puede administrarse de tal manera que permita que los polipéptidos se generen in situ. Los expertos en la materia conocen sistemas de expresión adecuados. Para la administración y/o expresión de ácidos nucleicos pueden utilizarse células transgénicas de mamífero. Los expertos en la materia conocen procedimientos apropiados.

- 35 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más polipéptidos. Los polipéptidos incorporados en las composiciones farmacéuticas pueden ser los polipéptidos TKTL1 en combinación con uno o más polipéptidos conocidos distintos, tales como, por ejemplo, enzimas, anticuerpos, factores reguladores, tales como ciclinas, quinasas o CKI dependientes de ciclina o toxinas.

40 Cuando los niveles de azúcar en sangre aumentan, algunos tipos de células clave - incluyendo las células nerviosas (neuronas) y las células que constituyen las delicadas células sanguíneas de la retina del ojo y las unidades de filtración (glomérulos) del riñón - están también repletos de glucosa. Los altos niveles de azúcar resultantes en estas

células producen un bloqueo en el metabolismo normal celular de la glucosa. Esta acumulación produce daños celulares asociados con la glucosa y un aumento en la célula de productos intermedios metabólicos de glucosa súper reactivos a la glucosa conocidos como triosofosfatos que conducen a productos finales de glucosilación avanzada (AGE). Y una vez que esto ocurre, el exceso de glucosa y triosofosfatos ataca a las proteínas, lípidos y ADN circundante en la célula.

En esta situación, una potenciación de la aGF-mam activando la TKTL1 podría ser correctiva y preventiva. Mediante la ruta aGF-man la glucosa se degrada a compuestos no tóxicos como ácidos grasos evitando por tanto que se produzcan daños por productos finales de glucosilación avanzada.

Por lo tanto, la divulgación se refiere a un procedimiento para el tratamiento de daños celulares asociados con la glucosa y con los triosofosfatos y para la prevención de daños celulares asociados con AGE en un paciente que necesite dicho tratamiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de al menos un activador de TKTL1.

Con otras palabras: por lo tanto la divulgación también se refiere al uso de al menos un activador de TKTL1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y prevención de daños celulares asociados con AGE en un paciente.

Un defecto/alteración de la ruta aGF-mam no está generalmente asociada con una enfermedad grave sino que a veces simplemente se asocia con alteraciones de la etapa física que de hecho son subjetivamente desagradables, pero no requieren un tratamiento médico. Además, la ruta aGF-mam puede controlarse no solo activando o inhibiendo la enzima TKTL1 sino también limitando el sustrato (glucosa) para esta ruta metabólica. Por lo tanto la presente divulgación también proporciona composiciones nutritivas/ complementos dietéticos que contienen un contenido bajo de glucosa/hidratos de carbono, un contenido alto de aceite/grasa y un contenido moderado de proteínas y adicionalmente comprende una cantidad eficaz de un inhibidor o activador de la actividad o concentración de la enzima TKTL1 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo preferido de dicha composición nutritiva/complemento dietético comprende un inhibidor de TKTL1 seleccionado del grupo que consiste en oxiatiamina, benfooxitiamina, hidroxipiruvato, piruvato, *p*-hidroxifenilpiruvato, piritiamina, amprolio, 2-metiltiamina, 2-metoxi-*p*-benzoquinona (2-MBQ) y 2,6-dimetoxi-*p*-benzoquinona (2,6-DMBQ), genisteína, y flavonoles, tales como, por ejemplo, quercetina, catequinas, nitrilósidos, antocianinas; o derivados de los mismos.

Otro ejemplo preferido de dicha composición nutritiva/complemento dietético comprende un activador de TKTL1, especialmente tiamina o benfotiamina o uno o más derivados de las mismas. Dichos derivados se caracterizan preferentemente por las estructuras químicas (fórmulas estructurales) mencionadas anteriormente.

La presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto para el tratamiento de una enfermedad asociada con una actividad o nivel potenciado o disminuido, una localización celular anómala de la proteína TKTL1, un estado de agregación y/o un estado de dimerización en comparación con un control, en el que dicho compuesto es un compuesto identificado mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto un polipéptido TKL1 como se define en las reivindicaciones precedentes o una célula que exprese dicho polipéptido en presencia de componentes capaces de proporcionar una señal detectable en respuesta a una actividad biológica, preferentemente una actividad transcetolasa; y
- (b) detectar la presencia o ausencia de una señal o aumento de la señal generada a partir de dicha actividad biológica, donde la ausencia, disminución o aumento de la señal es indicativa de un supuesto fármaco.

El candidato farmacológico puede ser un solo compuesto o una pluralidad de compuestos. La expresión "pluralidad de compuestos" debe entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden ser o no idénticas. Dicho compuesto o pluralidad de compuestos pueden sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o incluirse, por ejemplo, en muestras, por ejemplo, extractos celulares, por ejemplo, de plantas, animales o microorganismos. Además, dicho compuesto (o compuestos) puede ser conocido en la materia pero hasta ahora no se sabía que podía suprimir o activar los polipéptidos TKTL1. La mezcla de reacción puede ser un extracto acelular o puede comprender un cultivo celular o tisular. El experto en la materia conoce preparaciones adecuadas. La pluralidad de compuestos puede, por ejemplo, añadirse a la mezcla de reacción, al medio de cultivo, inyectarse en una célula o aplicarse de otra manera al animal transgénico. La célula o tejido que puede emplearse en el procedimiento de la invención es preferentemente una célula hospedadora, una célula de mamífero o un animal transgénico no humano de la invención descrita en las realizaciones indicadas anteriormente en este documento.

Si se identifica una muestra que contiene un compuesto o una pluralidad de compuestos, entonces es posible o aislar el compuesto de la muestra original identificado como que contiene el compuesto capaz de suprimir o activar TKTL1, o se puede subdividir adicionalmente la muestra original, por ejemplo, si consiste en una pluralidad de compuestos diferentes, para reducir el número de sustancias diferentes por muestra y repetir el procedimiento con las subdivisiones de la muestra original. Dependiendo de la complejidad de las muestras, las etapas descritas anteriormente pueden realizarse varias veces, preferentemente hasta que la muestra identificada de acuerdo con la

presente invención solo comprenda un número limitado sustancias o solo una sustancia. Preferentemente dicha muestra comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, y más preferentemente dichas sustancias son idénticas.

Los compuestos que pueden ensayarse e identificarse pueden ser péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNA o similares. Estos compuestos también pueden servir como compuestos líder para el desarrollo de compuestos análogos. Los análogos deben tener una configuración electrónica y una conformación molecular estabilizada que permita que grupos funcionales clave estén presentes en la TKTL1 en sustancialmente la misma manera que el compuesto líder. En particular, los compuestos análogos tienen propiedades electrónicas espaciales que son comparables con la región de unión, pero pueden ser moléculas más pequeñas que las del compuesto líder, teniendo frecuentemente un peso molecular por debajo de aproximadamente 2 kD y preferentemente por debajo de aproximadamente 1 kD. La identificación de compuestos análogos puede realizarse a través del uso de técnicas tales como análisis de campo autoconsistente (SCF), análisis de configuración-interacción (IC) y análisis dinámicos en modo normal. Para implementar estas técnicas, por ejemplo, Rein, Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions (Alan Liss, Nueva York, 1989), se dispone de programas informáticos.

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

Durante los experimentos resulta obvio que en diversos tejidos tumorales la aGF-mam se desarrolla con alta renovación. En estas células tumorales se detectó una sobreexpresión de la enzima TKTL1 y así mismo grandes cantidades de lactato que conducían a una degradación de la matriz. Estos hallazgos confirman los estudios de Warburg, quien detectó que los tejidos tumorales degradan la glucosa a lactato no solamente en ausencia de oxígeno sino también en presencia de oxígeno, y que existe una correlación entre el grado de degradación de glucosa aerobia fermentativa (glucólisis aerobia), producción de lactato y tumores malignos. Mediante análisis basados en transcritos y proteínas de los tres miembros de la familia de TKT pudo demostrarse, que el gen TKTL1 es el gen/proteína transcetolasa que se sobreexpresa en tumores.

Por lo tanto, la presente divulgación también comprende un método para el tratamiento de cáncer asociado con una sobreexpresión de la enzima TKTL1 en las células tumorales en un paciente que necesite dicho tratamiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de TKTL1.

Con otras palabras: Por lo tanto la divulgación también se refiere al uso de al menos un inhibidor de TKTL1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer asociado con una sobreexpresión de la enzima TKTL1 en células tumorales.

Dado que se sabe que grandes cantidades de lactato conducen a una degradación de la matriz y que esto facilita la remodelación tisular y la curación de heridas, los datos y conocimientos obtenidos durante los experimentos dan como resultado una parte adicional, concretamente un procedimiento para el tratamiento (o para influenciar en los procesos) de remodelación tisular, curación de heridas, etc en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de TKTL1 o un activador de TKTL1.

Con otras palabras: la divulgación también se refiere al uso de al menos un inhibidor de TKTL1 o activador de TKTL1 para la preparación de una composición farmacéutica para potenciar o reducir los procesos de remodelación tisular, curación de heridas, etc.

Un ejemplo de dicha composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de TKTL1 pretende aplicarse en restenosis en válvulas cardíacas para prevenir la proliferación de células endoteliales.

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

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

Debido a estos hechos la presente divulgación también comprende un procedimiento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Alzheimer, etc. inhibiendo la glucosilación mediante la activación de la aGF-man en un paciente que necesite dicho tratamiento que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de al menos un activador de la actividad enzimática

TKTL1 (por ejemplo, aplicación de tiamina o benfotiamina aplicación en los alimentos). Además, la potenciación de la actividad TKTL1 y por lo tanto de la aGF-man puede impedir el desarrollo de enfermedad de Alzheimer en individuos con una predisposición debida a TKTL1. Por tanto, la presente divulgación también comprende un procedimiento para determinar individuos con variantes de predisposición a TKTL1 para identificar individuos elegibles para una terapia TKTL1 preventiva.

En este contexto debe mencionarse que la apoptosis no deseada en células como neuronas puede reducirse o bloquearse por tratamiento de TKTL1 con compuestos de activación identificados por los procedimientos de acuerdo con la divulgación.

Para pacientes con diabetes mellitus se ha descubierto recientemente que el tratamiento de dicho pacientes con benfotiamina efectúa el bloqueo de tres rutas principales de lesión hiperglucémica e impide la retinopatía diabética. Ahora, durante los experimentos los autores de la invención han podido identificar la enzima TKTL1 como la diana de este tratamiento con benfotiamina en aquellos tejidos (células endoteliales, retina y nervios) en los que los pacientes con diabetes reciben daño celular debido a la producción de AGE (productos finales de glucosilación avanzada) o muerte celular.

La formación de AGE también está producida por un exceso de glucosa y triosofosfatos en las células. Una potenciación de la aGF-man activando la TKTL1 podría dar como resultado una degradación de glucosa y de triosofosfatos.

Debido a estos hechos la presente divulgación también comprende un procedimiento para el tratamiento de AGE en pacientes, especialmente pacientes con diabetes, que necesiten dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de al menos un activador de la actividad enzimática de TKTL1, preferentemente benfotiamina.

Durante los experimentos también se descubrió que la reducción de la actividad TKTL1 puede producir retraso en el crecimiento y reducción preferencial de tejido adiposo. Inhibiendo la TKTL1 en tejido adiposo puede tratarse la obesidad.

Enfermedades como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), fibromialgia, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable (SII) han aumentado constantemente durante los últimos 80 años. El direccionamiento de TKTL1 conduce a una disminución significativa en los niveles de autoanticuerpos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias.

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

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: (A) Cuantificación de transcritos de TKTL1 en muestras de adenocarcinoma gástrico y pulmonar y sus correspondientes tejidos normales. N – muestra normal; T – muestra tumoral; M - marcador, se muestran fragmentos de 100 pb y 200 pb.

Figura 2: (A) Modelo de expresión del gen TKTL1 humano en transferencias de Northern de ARNm con poli (A)+ de diferentes tejidos adultos humanos analizados con una sonda de ADNc para TKTL1. (B) Expresión de isoformas de la proteína TKTL1 en cinco líneas celulares tumorales derivadas de cuatro entidades tumorales diferentes. (C) Proteína TKTL1 de longitud completa expresada en *E. coli*.

Figura 3: Determinación de la actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 natural (A) y recombinante (B).

Figura 4: Expresión de la proteína TKTL1 en
A-B: tejido de cuerpo normal del paciente 1 con carcinoma gástrico;
C-F: tejido tumoral del paciente 1 con carcinoma gástrico;
G-I: tejido de antro normal del paciente 2 con carcinoma gástrico,
J-N: células de carcinoma gástrico del paciente 2,
O-P: carcinoma gástrico mal diferenciado;
Q: carcinoma de colon;
R: carcinoma de vejiga superficial;
S-T: carcinoma de vejiga invasivo mal diferenciado.
Aumento: G x50; C,H y J x100; A,B,D,E,I,K,M,O y S x200; F,L,N,P,Q,R y T x400.

Figura 5: Tinción de TKTL1 de carcinoma de vejiga no invasivo e invasivo

5	Figura 6-8:	Expresión de TKTL1 y Akt fosforilada (ph-Akt) en secciones incluidas en parafina de A-C: tejido normal, de cáncer tiroideo papilar (CTP), folicular (CTF) y no diferenciado (CTND); D: tejido normal y de cáncer pulmonar no microcítico CPNM, E: cáncer de colon; F: vejiga normal; G: carcinomas de próstata. AEC = tinción roja; tinción con colorante de contraste con hematoxilina = tinción azul, las puntas de flecha amarillas indican tinción nuclear de ph-AKT.
	Figura 9-10:	Expresión de TKTL1 en células endoteliales.
10	Figura 11-12:	Expresión de TKTL1 en células neuronales.
	Figura 13-14:	Dibujo esquemático de la ruta de la aGF-mam.
15	Figura 15:	Electroforesis bidimensional (2D) en gel de un complejo de multiproteína que contiene las isoformas de la proteína TKTL1 (flecha A), DNasaX y GATDH.
	Figura 16:	Electroforesis bidimensional (2D) en gel de isoformas de la proteína TKTL1 de alto peso molecular (flecha) identificadas por inmunotinción.
20	Figura 17:	Determinación por ELISA (A) de isoformas de la proteína TKTL1 y (B) de la actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 aislada. Valores obtenidos
25		(A)A1-A5: de leucocitos de individuos sanos,
		(A)A6-A10: de fibroblastos de individuos sanos,
30		(A)B1-B5: de suero de individuos sanos,
		(A)B6-B10: de células cerebrales de individuos sanos,
35		(A)A11-A12: sin material de sonda (nivel de fondo),
		(A)B11-B12: sin material de sonda (nivel de fondo),
40		(A)C1-C3: de leucocitos de pacientes con EA,
		(A)C4-C6: de fibroblastos de pacientes con EA,
45		(A)C7-C9: de suero de pacientes con EA,
		(A)C10-C12: de células cerebrales de pacientes con EA,
50		(A)D1-D3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)D4-D6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
55		(A)D7-D9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)D10-D12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
60		(A)E1-E3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Huntington,
		(A)E4-E6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Huntington,
65		(A)E7-E9: de suero de pacientes con enfermedad de Huntington,
		(A)E10-E12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Huntington,
		(A)F1- F3: de leucocitos de pacientes con LES,
		(A)F4-F6: de fibroblastos de pacientes con LES,
		(A)F7-F9: de suero de pacientes con LES,
		(A)F10-F12: de células renales de pacientes con LES,
		(A)G1-G3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)G4-G6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)G7-G9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)G10-G12: de células renales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(A)H1-H3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson con diabetes de tipo II,
		(A)H4-H6: de fibroblastos de pacientes con diabetes de tipo II,
		(A)H7-H9: de suero de pacientes con diabetes de tipo II,
		(A)H10-H12: de células renales de pacientes con diabetes de tipo II,
		(B)A1-A5: de leucocitos de individuos sanos,
		(B)A6-A10: de fibroblastos de individuos sanos,
		(B)B1-B5: de suero de individuos sanos,
		(B)B6-B10: de células cerebrales de individuos sanos,
		(B)A11-A12: sin material de sonda (nivel de fondo),
		(B)B11-B12: sin material de sonda (nivel de fondo),
		(B)C1-C3: de individuos sanos,
		(B)C4-C6: de células neuronales de individuos sanos,
		(B)C7-C9: de células renales de individuos sanos,
		(B)C10-C12: de células de colon de individuos sanos,
		(B)D1-D3: de leucocitos de pacientes con EA,
		(B)D4-D6: de fibroblastos de pacientes con EA,
		(B)D7-D9: de suero de pacientes con EA,
		(B)D10-D12: de células cerebrales de pacientes con EA,
		(B)E1-E3: de leucocitos de pacientes con enfermedad de Parkinson,
		(B)E4-E6: de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Parkinson,

(B)E7-E9: de suero de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (B)E10-E12: de células cerebrales de pacientes con enfermedad de Parkinson,
 (B)F1-F3: de leucocitos de pacientes con LES,
 (B)F4-F6: de fibroblastos de pacientes con LES,
 (B)F7 -F9: de suero de pacientes con LES,
 (B)F10-F12: de células renales de pacientes con LES
 (B)G4-G6: de fibroblastos de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)G7-G9: de suero de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)G10-G12: de células renales de pacientes con esclerosis múltiple,
 (B)H1-H3: de leucocitos de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)H4-H6: de fibroblastos de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)H7-H9: de suero de pacientes con diabetes de tipo II,
 (B)H10-H12: de células renales de pacientes con diabetes de tipo II.

15 Información general en relación con los ejemplos:

Origen y Cultivo de células

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

Análisis de transferencia de Northern

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

Análisis de transferencia de Western

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

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

45 La proteína TKTL1 purificada por afinidad de las líneas celulares se determinó usando procedimientos ELISA convencionales. Para el revestimiento de las placas del ensayo Elisa, se usaron tres anticuerpos (5 µg/ml) antiTKTL1 monoclonales de IgG de ratón purificados por afinidad diferentes. Como reactivo secundario se usó el anticuerpo anti-TKTL1, JFC12T10, conjugado con peroxidasa de rábano picante a 5 µg/ml. Las proteínas unidas en el complejo multiproteína se purificaron por afinidad de líneas celulares usando anticuerpos dirigidos contra TKTL1, DNasaX, ph-Akt, GAPDH. La unión a determinadas proteínas se evaluó por el procedimiento de ELISA, usando, por ejemplo, la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y GAPDH; y la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y DNasaX; y la combinación de anticuerpos contra ph-Akt y DNasaX.

Análisis 2D de complejos multiproteína

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

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

65 El modelo de expresión del gen TKTL1 humano se analizó con una sonda de ADNc para TKTL1 en transferencias de Northern de ARNm poli(A)+ de diferentes tejidos adultos humanos. En la Figura 2 (A) se muestran los resultados.

Se detectaron cuatro transcritos de 1,4, 1,9, 2,5 y 2,7 kb. Mientras que en la mayoría de los tejidos el transcrito principal tenía un tamaño de 2,5 kb, en el corazón abundaba el pequeño transcrito de 1,4 y no existían los transcritos de 2,5 y 2,7 kb. Los tamaños de los transcritos se indican en kb.

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

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

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

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

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

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

35 **Ejemplo 5: Determinación por ELISA de isoformas de TKTL1**

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 9: Ensayos para la detección de compuestos para potenciar o reducir la actividad de la enzima TKTL1

Dado que las isoformas de la proteína TKTL1 representan proteínas pluriempleadas, para identificar compuestos activos pequeños han de aplicarse diferentes ensayos. Para la detección de compuestos para potenciar o reducir la actividad enzimática de TKTL1 pueden realizarse ensayos con las isoformas recombinantes de la proteína o con las isoformas nativas de las proteínas aisladas de células humanas.

(A) Proporcionamiento de isoformas de la proteína TKTL1 recombinante

Esto puede realizarse por expresión de isoformas de la proteína TKTL1 recombinante en *E. coli*. La fase de lectura abierta de TKTL1 (MADAE...CMLLN) de la secuencia de ADNc (nº de acc. BC025382) se clonó en el vector pDEST17 (Invitrogen). La expresión bacteriana se realizó en la cepa BL21-AI de *E. coli* (Invitrogen) y la expresión se indujo con arabinosa al 0,2 % a 21 °C durante 4 h. En tampón de lisis (Tris 20 mM [pH 7,5], imidazol 5 mM, beta-mercaptoetanol 5 mM, NaCl 500 mM y Triton X-100 al 1 %) se preparó un lisado celular en bruto congelando (con hielo seco, 10 min) y descongelando (37 °C, 5 min) 3 veces. Se obtuvieron fracciones solubles de proteínas por centrifugación de lisado celular a 12.000 x g durante 30 min a 4 °C. La proteína His₆-TKTL1 se purificó con resinas Ni-NTA (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con tampón de elución que contenía imidazol 200 mM. Posteriormente, el imidazol y la sal se eliminaron por diálisis contra Tris 0,1 M (pH 7,5). La enzima purificada se conservó a -20 °C en glicerol al 40 % y ditiotreitól (DTT) al 0,1 %.

(B) Proporcionamiento de isoformas de la proteína nativa aisladas de células humanas

Las proteínas TKTL1 nativas y complejos de proteína que llevan la TKTL1, ambos extraídos de líneas celulares humanas, deben purificarse, por ejemplo, mediante purificación por afinidad. Esto puede realizarse de la siguiente manera:

10 mg del MAb JFC12T10 se acoplaron a 2 ml de carbo-link de acuerdo con las instrucciones del fabricante (carbo-link; Pierce). Las células se cultivaron en medio aséptico (ISF-1, InVivo Biotech Services GmbH). Después de la centrifugación, el sedimento de $2,2 \times 10^9$ células se resolvió en 50 ml de PBS que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche). Se realizó un lisado celular utilizando una prensa francesa, seguido de una centrifugación a 50.000 xg. El sobrenadante se filtró (0,2 µm) y la unión del sobrenadante con el material de afinidad se realizó durante una noche a 4 °C (modo lote). Después de la transferir a una columna, se realizó un procedimiento de lavado con tampón PBS 150 mM pH 7,4. Para la elución de las proteínas adheridas a columna se utilizó Glicina-HCl 100 mM pH 2,0. Se recogieron dos picos de proteína, detectados utilizando un sistema de detección basado en UV a 280 nm y se neutralizaron con Tris pH 7,4.

Con la proteína TKTL1 recombinante o nativa purificada por afinidad pueden realizarse ensayos enzimáticos.

(C) Detección de compuestos adecuados determinando la reacción transcetolasa bisustrato

(C-1) La actividad transcelotasa (bisustrato) de TKTL1 se midió con un ensayo enzimático acoplado a 25 °C. Las reacciones comenzaron con la adición de la proteína TKTL1 recombinante y nativa (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo y se determinaron espectrofotométricamente por la tasa de reducción de ADN^+ en la siguiente secuencia de reacción: actividad xilulosa-5-fosfato (X5P) y ribosa-5-fosfato (R5P) > (actividad TKTL1) > gliceraldehído-3-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato > (actividad gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa actividad [GAPDH]) > $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$, 1,3-fosfoglicerato. La actividad transcetolasa bisustrato (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo se determinó en la siguiente reacción (concentraciones finales) X5P 4 mM, R5P 4 mM, NAD^+ 500 µM, MgCl_2 2 mM, tiamina PP 200 µM, proteína TKTL1 recombinante 5 µg o proteína TKTL1 nativa 4 µg, GAPDH 3 U, tampón Tris 0,15 mol/l pH 7,4 en un volumen de reacción de 1 ml. La actividad transcetolasa unisustrato se determinó omitiendo RP5, utilizando exclusivamente X5P como sustrato. El GAPDH se obtuvo en Sigma.

(C-2) La actividad transcetolasa (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo puede medirse utilizando un procedimiento convencional ligado a enzimas en condiciones en las que las enzimas de acoplamiento no están limitadas. Las reacciones comienzan con la adición de la proteína transcetolasa a una mezcla de reacción de otro modo completa de Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7,5), ribosa 5-fosfato 10 mmol/l, xilulosa 5-fosfato 2 mmol/l, MgCl_2 1,2 mmol/l, NADH 0,1 mmol/l, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2000 U/l y triosa fosfato isomerasa. Las reacciones se realizaron a 37 °C. La oxidación de NADH, que es directamente proporcional a la actividad transcetolasa, prosiguió controlando la disminución de la absorbancia a 340 nm.

(C-3) Los sustratos (en concentraciones variables) pueden ensayarse como posibles donadores si como aceptor se utiliza eritrosa-4-fosfato (1 mM). En dicha reacción se formará fructosa-6-fosfato. Con las enzimas glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y 6-fosfoglucosa-isomerasa, la fructosa-6-fosfato se oxidará a 6-fosfofluconolactona, conduciendo a la generación de NADPH.

(C-4) Como aceptor puede utilizarse formaldehído (concentraciones variables) lo que conduce a la dihidroxiacetona. La siguiente reacción de glicerina-deshidrogenasa formará glicerina, en simultáneo con una oxidación de NADH.

5 (D) Determinación de la reacción transcetolasa unisustrato

(D-1) mediante oxidación de NADH:

10 La actividad transcetolasa (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo se mide utilizando un procedimiento convencional ligado a enzimas en condiciones en las que las enzimas de acoplamiento no están limitadas. Las reacciones comienzan con la adición de la proteína transcetolasa (a) junto con el compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo a una mezcla de reacción de otro modo completa de Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7,5), xilulosa 5 fosfato 5 mmol/l, MgCl₂ 1,2 mmol/l, fosfato 3 mmol/l, NADH 0,1 mmol/l, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 2000 U/l y triosa fosfato isomerasa. Las reacciones se realizaron a 37 °C. La oxidación de NADH, que es directamente proporcional a la actividad transcetolasa prosiguió controlando la disminución de la absorbancia a 340.

(D-2) mediante reducción de NAD:

20 La actividad transcetolasa (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo se mide utilizando un procedimiento convencional ligado a enzimas en condiciones en las que las enzimas de acoplamiento no están limitadas. Las reacciones comienzan con la adición de la proteína transcetolasa (a) junto con el compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo a una mezcla de reacción de otro modo completa de Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7,5), xilulosa 5 fosfato 5 mmol/l, fosfato 3 mmol/l, MgCl₂ 1,2 mmol/l, NAD 0,1 mmol/l, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2000 U/l. Las reacciones se realizaron a 37 °C. La reducción de NAD, que es directamente proporcional a la actividad cetolasa, prosiguió controlando el aumento a 340 nm. Asimismo, puede medirse la generación de acetil-fosfato.

30 (E) Determinación de la reacción transcetolasa con sustratos adicionales

La actividad transcetolasa (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo se mide utilizando un procedimiento convencional ligado a enzimas en condiciones en las que las enzimas de acoplamiento no están limitadas. Las reacciones comienzan con la adición de la proteína transcetolasa (a) junto con el compuesto de ensayo y (b) en ausencia del compuesto de ensayo a una mezcla de reacción de otro modo completa de Tris-Cl 100 mmol/l (pH 7,5), acetaldehído 5 mmol/l, piruvato 5 mmol/l, MgCl₂ 1,2 mmol/l. La reacción conduce a la 3-hidroxiutanona (acetoina) y CO₂. Las reacciones se realizan a 37 °C. La actividad transcetolasa se mide por cromatografía HPLC.

Otros sustratos pueden ser:

- (a) Formaldehído y piruvato que conducen a hidroxiacetona y CO₂.
- (b) Glicerinaldehído y piruvato que conducen a 1-desoxixilulosa y CO₂.

45 (F) Ensayos *in vivo* para la identificación de inhibidores TKTL1 basada en la la producción de lactato

Son líneas celulares que pueden ensayarse, por ejemplo, la línea celular de glioblastoma LN18, la línea celular de cáncer de colon HT29, la línea celular de cáncer de mama MCF7. Las líneas celulares han de cultivarse en medios que contengan glucosa 2 mg/ml (a) en presencia del compuesto de ensayo y (b) en ausencia de compuesto de ensayo. El consumo de glucosa y la producción de lactato han de determinarse durante 5 días. Cada día se analiza el contenido de glucosa y de lactato en el medio. Como un control adicional, pudo utilizarse la línea celular de glioblastoma LN229 que no muestra alto consumo de glucosa y una tasa de producción de lactato elevada.

55 **Ejemplo 10: Procedimientos de exploración para candidatos farmacológicos**

(A) Ensayos para analizar un solo compuesto

Las líneas celulares (por ejemplo, como las descritas anteriormente) deben cultivarse con y sin el compuesto a analizar. Como compuestos de ensayo sintéticos, pueden utilizarse, por ejemplo, tiamina, oxitiamina, *p*-hidroxifenilpiruvato, piritiamina, amprolio, 2-metiltiamina, benfooxitiamina, benfotiamina, 2-metoxi-*p*-benzoquinona (2-MBQ) y 2,6-dimetoxi-*p*-benzoquinona (2,6-DMBQ), genisteína y flavonoles, como por ejemplo, quercetina, catequinas, nitrilósidos y antocianinas o derivados de los mismos. Sustituyendo o añadiendo uno o más de los siguientes grupos pueden generarse derivados de los compuestos indicados anteriormente:

grupos alquilo alifáticos (C₁-C₁₂) lineales y ramificados, sustituidos con al menos un grupo seleccionado de OH, NH₂, SH, CN, CF₃, halógeno, CONHR⁵, COOR⁵, OR⁵, SR⁵, SiOR⁵, NHR⁵, anillos alifáticos (C₃-C₆) y anillos aromáticos (C₃-C₆), donde R⁵ se selecciona de grupos alquilo (C₁-C₄) lineales y ramificados, grupos arilo, polímeros naturales, polímeros sintéticos y copolímeros, llevando dichos polímeros y copolímeros al menos dos grupos seleccionados de: hidroxilo, carboxilato, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, tiol y aldehído; un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, CF₃, OH, OCF₃, COOH, R⁷, OR⁷ y OCOR⁷, donde R⁷ se selecciona de grupos alquilo alifáticos (C₁-C₄) lineales y ramificados; grupos alquilo (C₁-C₄) monohalogenados y polihalogenados lineales y ramificados y de grupos arilo, donde los grupos arilo están opcionalmente sustituidos con al menos un grupo seleccionado de OH, NH₂, SH, CN, CF₃, halógeno, COOH, CONHR⁸, COOR⁸, OR⁸, SR⁸ y NHR⁸, donde R⁸ se selecciona de radicales alquilo (C₁-C₁₂) lineales y ramificados; y de grupos alquilo (C₁-C₄) lineales y ramificados y de un grupo CF₃.

También pueden utilizarse productos naturales, o extractos o fracciones de los mismos, para identificar compuestos para activar o inhibir la actividad enzimática TKTL1, por ejemplo, extracto de germen de trigo fermentado AVEMAR o extractos de manzana. Para acelerar o inhibir la actividad enzimática TKTL1 pueden utilizarse sustratos o análogos de sustratos específicos para TKTL1. Las reacciones específicas para las isoformas de la proteína TKTL1 pueden aprovecharse para inhibir o activar las actividades enzimáticas TKTL1.

Para prevenir la obesidad pueden utilizarse compuestos que inhiben la actividad enzimática TKTL1.

Por tanto, pueden identificarse compuestos que conducirán a un consumo de glucosa reducido o a una producción de lactato reducida. Dichos compuestos son, por ejemplo, útiles para reducir la obesidad, para reducir o inhibir la espermatogénesis, la producción de lactato en esperma (conduciendo a una degradación de la matriz en el útero) pudiendo por tanto aplicarse como anticonceptivo.

Además, pueden identificarse compuestos que conducirán a un consumo de glucosa potenciado o a una producción de lactato potenciada. Dichos compuestos pueden utilizarse, por ejemplo, para acelerar la curación de heridas y la restauración ósea, para reducir y normalizar los niveles de glucosa en sangre en los pacientes con diabetes mellitus, para prevenir o reducir alteraciones patológicas en vasos grandes y pequeños en pacientes con diabetes mellitus, para reducir retinopatías o neuropatías en pacientes con diabetes mellitus y para inhibir o prevenir enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Huntington y Parkinson.

(B) Ensayos para determinar compuestos que influyen en las interacciones proteína-proteína de las isoformas de la proteína TKTL1 mutada

Las interacciones proteína-proteína desempeñan una función tanto en la regulación de la actividad enzimática como en rutas de transducción de señales que regulan funciones celulares. La cantidad de inhibidores de interacción proteína-proteína de moléculas pequeñas (SMPII) aumenta rápidamente. Las células vivas están continuamente expuestas a diversas señales procedentes de su micro- y macro-entorno. Muchas de estas señales son detectadas por receptores que están presentes en la superficie celular y por tanto se procesan y se transducen por cascadas de señalización intracelular. Dado que con frecuencia el último sitio de acción en una cascada de señalización está lejos de la superficie celular, una característica intrínseca de las rutas de señalización intracelular es la necesidad de que las proteínas se transloquen de una posición a otra dentro de la célula. Estas translocaciones, y por tanto la señalización y respuesta celular, depende críticamente de interacciones proteína a proteína que median la translocación de proteína a través del espacio intracelular.

Como un ejemplo de una ruta típica de transducción de señales que implica la translocación de proteínas, se representan las etapas de translocación de proteínas y señalización implicadas en la respuesta de la ruta de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) contra un factor de crecimiento tal como insulina. Esta ruta ejerce influencia y está influenciada por la TKTL1.

1. La insulina se une y activa a su receptor en la superficie celular. Después de la activación, el receptor recluta proteínas adaptadoras y activa a moléculas de señalización intracelular incluyendo la PI3K.

2. La PI3K activada aumenta la concentración en la membrana plasmática del lípido fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3).

3. En la membrana plasmática, la PIP3 proporciona sitios de acoplamiento para proteína quinasas que incluyen Akt1/PKBa y PDK1; la PDK1 activa a la Akt solo cuando ambas están acopladas a la membrana. Esta etapa de translocación es un requisito absoluto para la activación de la Akt.

4. Una vez activada por la PDK1 en la membrana plasmática, la Akt se libera para difundirse de nuevo hacia el interior de la célula, donde puede fosforilar sustratos tales como factores de transcripción Forkhead (FKHR, FOXO1).

5. El FKHR no fosforilado normalmente reside en el núcleo, donde modula genes implicados en la detención del ciclo celular y en la apoptosis. Sin embargo, una vez fosforilado por la Akt1, el FKHR se transloca al citoplasma, donde ya no puede modular genes diana.

Las interacciones proteína-proteína y las translocaciones están implicadas en cada una de estas etapas, particularmente para la Akt1 y el Forkhead. Por tanto, una señal iniciada por la unión de la insulina a un receptor de superficie celular modula la transcripción de genes implicados en el crecimiento y supervivencia celular mediante una cascada secuencial de eventos de translocación de proteínas. La transcendencia terapéutica de esto comienza a entenderse cuando se considera que las respuestas de señalización alteradas son a menudo características diferenciadoras clave entre células en tejidos normales y enfermos.

(C) Ensayos para inhibidores de interacción proteína-proteína de molécula pequeña

Históricamente, los péptidos grandes y los productos naturales se han considerado como las clases de compuestos primarios capaces de modular las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, cada vez existen más pruebas en la bibliografía y procedentes de iniciativas de exploración que sugieren que las moléculas pequeñas también pueden modular interacciones responsables de complejos proteína-proteína. Estos compuestos pueden actuar directamente - mediante inhibición en la interfaz proteína-proteína- o indirectamente - mediante unión a un sitio alostérico e inducción de un cambio conformacional de la proteína diana o de una molécula asociada.

El descubrimiento de fármacos de molécula pequeña tradicionales se centra principalmente en la actividad de compuestos contra dianas purificadas, tal como la unión a receptores de superficie celular o inhibición de la actividad catalítica de enzimas. Aunque estas estrategias han conducido al desarrollo de una gran cantidad de fármacos útiles, claramente tienen limitaciones. Debido al entorno de red compleja en el que se produce la señalización intracelular, es ventajoso explorar compuestos en células vivas para reproducir la ruta y el contexto de red en el que el fármaco tendrá que actuar eventualmente. Cuando se emplea como parte de una ruta de exploración estratégica, los ensayos de translocación basados en células ofrecen una oportunidad para descubrir y desarrollar clases de compuestos totalmente nuevos que actúan principalmente modulando las interacciones de las proteínas.

Ensayos basados en células que controlan el comportamiento intracelular de moléculas diana, en lugar de unirse o catalizar la actividad de proteínas purificadas, pueden ahora utilizarse en exploraciones a alto rendimiento para descubrir y perfilar los SMPPII.

Genes de transcetolasa (TKT) conocidos codifican una sola proteína con actividad enzimática, mientras que se han detectado transcritos de TKTL1 y proteínas de diferentes tamaños. Además, parte de la proteína (o proteínas) TKTL1 está presente en el núcleo de células. Por lo tanto, la relación un gen/una proteína/una función es incorrecta para el gen de TKTL1. Las transcetolasas conocidas son homodímeros de dos proteínas de longitud completa que contienen todos los restos aminoacídicos de transcetolasa invariantes típicos. Las isoformas de la proteína TKTL1 codificadas por el gen de tipo transcetolasa constituyen homo/heterodímeros de TKTL1 y heterodímeros de TKT/TKTL1 (y TKTL2/TKTL1). La expresión de isoformas de la proteína TKTL1 - incluso una isoforma enzimáticamente no activa - ejerce influencia sobre la actividad enzimática de una proteína TKT como parte de un heterodímero TKT/TKTL1. Lo mismo también es cierto para heterodímeros TKTL2/TKTL1. Un cambio molecular y una conexión de protón sincronizan los sitios activos en heterodímeros de TKT/TKTL1 y en homo-y heterodímeros de TKTL1/TKTL1. Otro tipo de interacción de proteínas que está presente como isoformas de la proteína TKTL1 forma parte de un complejo multiproteína. Las proteínas TKTL1 se unen a proteínas como GAPDH no relacionadas con la transcetolasa, DNasaX (ADN nº de acc. X90392; Nº de acc. proteína CAA62037), Akt (fosforilada), histona, histona acetilasa, proteína de unión a actina y proteína precursora amiloidea (PPA). La presencia o unión de cada miembro del complejo de multiproteína cambia. Los cambios están influenciados por la translocación de proteínas localizadas en citoplasma al núcleo. Una vez que llega al núcleo, las proteínas citosólicas anteriores ejercen funciones diferentes a la función dentro del citoplasma. Se ha detectado una translocación de la DNasaX del citoplasma en núcleo en células apoptóticas y tumorales. También se ha detectado una translocación de ph-Akt del citoplasma al núcleo en células tumorales (Fig. 6-8). Se ha detectado una translocación de GAPDH en células neuronales apoptóticas. La liberación de sitios de unión citoplásmicos o las nuevas síntesis de proteínas, que se translocan directamente al núcleo, conducen a complejos multiproteína que inducen la apoptosis. Esta apoptosis en la base de la muerte de las células, por ejemplo neuronas en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. En células tumorales la molécula suicida DNasaX está presente en el núcleo (pero no ejerce actividad DNasa), lo que conduciría a la apoptosis y muerte celular de las células tumorales. En cambio, la unión a estos complejos multiproteína conduce a la inactivación de la DNasaX en células tumorales. Por lo tanto la apoptosis se bloquea. En enfermedades neurodegenerativas la DNasaX, GAPDH y TKTL1 conducen a la apoptosis de células, células que no deben morir. La apoptosis no deseada conduce a efectos graves.

Las proteínas unidas en el complejo multiproteína se purifican por afinidad de líneas celulares utilizando anticuerpos dirigidos contra TKTL1, DNasaX, ph-Akt y GAPDH. La unión a determinadas proteínas se evaluó por la técnica de ELISA, utilizando, por ejemplo, la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y GAPDH; la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y DNasaX; la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y ph-Akt; la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y TKT; la combinación de anticuerpos contra TKTL1 y TKTL2.

(D) Exploración de alto rendimiento *in vivo* para descubrir y perfilar los SMPPII para influir en interacciones proteína-proteína de isoformas de la proteína TKTL1

- 5 Pueden identificarse SMPPII que influyan en la generación de homo/heterodímeros de TKTL1 y heterodímeros de TKT/TKTL1 y en la interacción con otras proteínas del complejo multiproteína. Pueden identificarse SMPPII que influyan en la generación de interacciones de la proteína TKTL1 con dichas otras proteínas, por ejemplo, DNasaX, GAPDH o péptido beta amiloide (A beta). Pueden identificarse SMPPII que influyan en la generación de agregados de la proteína TKTL1.
- 10 Pueden identificarse SMPPII que influyan en la interacción proteína-proteína con otras proteínas y la siguiente generación de agregados de proteína por ejemplo GAPDH o el péptido beta amiloide (A beta). Pueden identificarse SMPPII que influyan en la translocación de isoformas de la proteína TKTL1, por ejemplo, translocación del citoplasma al núcleo.
- 15 La especificidad alterada del sustrato y el modo de reacción de la enzima TKTL1 pueden utilizarse para la destrucción de células o tejidos con una actividad enzimática TKTL1 potenciada. La aplicación de un sustrato no tóxico puede aplicarse a pacientes con actividad enzimática TKTL1 potenciada. Las células con una expresión potenciada de TKTL1 contienen un producto génico (enzima TKTL1) que conduce a las células a la destrucción selectiva. Estas células, que muestran una actividad enzimática TKTL1 potenciada, convierten el sustrato no tóxico en un fármaco tóxico haciendo que las células sean sensibles a un profármaco o a un agente quimioterapéutico no tóxico, eliminando de esta manera células no deseadas. Esta estrategia de destrucción de células no deseadas puede aplicarse, por ejemplo, a células epiteliales (célula de la cabeza y cuello, esofágicas, gástricas, de colon y recto y uroteliales), administrando profármacos no tóxicos, por ejemplo, en los alimentos.
- 20
- 25 (E) Se han detectado mutaciones en el gen de TKTL1 que conducen a isoformas de la proteína TKTL1 con diferentes propiedades isoeléctricas y afinidades reducidas para la tiamina:

- Pudo realizarse un ensayo identificando mutaciones en el gen de TKTL1 mediante métodos basados en ADN. Se realizó un ensayo aislando isoformas de la proteína TKTL1 utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la proteína (o proteínas) TKTL1. El anticuerpo podía unirse a placas de microtitulación. El suero u otras muestras podían analizarse y la isoforma de la proteína TKTL1 puede aislarse de estos especímenes. Pudo realizarse un ensayo transcetolasa enzimático estandarizado que permitió la determinación de la actividad transcetolasa o valores Km para la tiamina. Utilizando este procedimiento, pueden identificarse individuos con actividades TKTL1 reducidas antes de comenzar la enfermedad, por ejemplo, diabetes mellitus, síndrome de Wernicke-Korsakoff, enfermedad de Huntington. Estos pacientes deben tratarse con un compuesto activador de TKTL1.
- 30
- 35

- Puede realizarse un ensayo *in vivo* con células para explorar pequeños compuestos que inhiben la translocación al núcleo o la agregación de la proteína TKTL1 dentro del núcleo, controlado, por ejemplo, por procedimientos inmunohistoquímicos (*in vivo*). Las células pueden analizarse para detectar la presencia de complejos de alto peso molecular que contienen TKTL1 o la presencia de complejos de proteína con solubilidad reducida. Los ensayos *in vivo* mencionados anteriormente también pueden realizarse utilizando una proteína de fusión TKTL1-GFP.
- 40

Ejemplo 11: Control de la aGF-mam mediante terapia basada en nutrición

- 45 Un ejemplo adicional se refiere a una nueva estrategia terapéutica que se basa en la expresión de TKTL1 y es simultánea al metabolismo del azúcar. Además de la inhibición de la actividad enzimática de TKTL1 por compuestos pequeños o sustratos inhibidores, la actividad enzimática TKTL1 puede también inhibirse limitando la disponibilidad del sustrato mediante la aplicación de una nutrición dirigida. La terapia o prevención dirigida basada en nutrientes consiste en un ensayo para la determinación de la actividad enzimática TKTL1 en tumores o en células/tejidos no malignos seguido de una nutrición específica.
- 50

- La nutrición básica consiste en una composición seleccionada de ácidos grasos, preferentemente en una cantidad del 55 al 65 % (p/p); una composición seleccionada de hidratos de carbono, preferentemente en una cantidad del 5 al 15 % (p/p), preferentemente, con un contenido de glucosa (o almidón) menor del 2 % (p/p), comprendiendo preferentemente principalmente fructosa, oligofructosa, galactosa, oligogalactosa; una composición seleccionada de proteínas (aminoácidos), preferentemente, en una cantidad del 10 al 25 % (p/p), preferentemente, con más del 40 % (p/p) (lisina, leucina) y preferentemente, más del 30 % (p/p) (isoleucina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina); tocotrienol y aceptores de electrones o combinaciones de los mismos:
- 55

- 60 Una realización preferida consiste en:

- a) un 62 % de una combinación de ácidos grasos (véase la Tabla 1);
 b) un 12 % de hidratos de carbono con menos de un 12 % de glucosa (o almidón), consistiendo principalmente en fructosa, oligofructosa, galactosa, oligogalactosa;
 c) un 18 % de proteínas con más del 40 % (lisina, leucina) y más del 30 % (isoleucina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina)
- 65

d) Tocotrienol (por ejemplo, gamma-tocotrienol)

e) al menos un aceptor de electrones, tal como, por ejemplo, parabenzoquinonas, benzoquinonas, hidroquinonas y derivados de las mismas.

5 La nutrición básica en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable y tiamina o derivados de tiamina (por ejemplo, benfotiamina) que son activadores de la actividad enzimática TKTL1 se aplicará para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas, diabetes, complicaciones de la diabetes, síndrome metabólico, lesiones micro y macrovasculares, envejecimiento, lesión celular retinal, inflamación de células endoteliales y lesión celular de neuronas centrales y periféricas, dado que en células normales (no malignas) como, por ejemplo, células de la retina, neuronas centrales y periféricas y células endoteliales, la actividad de TKTL1 protege de los efectos dañinos del metabolismo insuficiente del azúcar lo que conduce a la formación de AGE o de radicales.

15 Para el tratamiento del cáncer la nutrición básica diaria tiene que ajustarse, preferentemente, a una cantidad total máxima de 0,2 mg de tiamina. Esto puede realizarse por selección de la nutrición con un nivel bajo de tiamina, por tratamiento de nutrición con tiaminasa o por calentamiento/ebullición de la nutrición. La nutrición básica con un transportador farmacéuticamente aceptable y bajos niveles de tiamina o la nutrición básica con bajos niveles de tiamina complementada con análogos de tiamina inhibidores (por ejemplo, oxitiamina, oxibenfotiamina) se administra a pacientes con cáncer, si se detecta una actividad TKTL1 y/o concentración de transcrito/proteína alta en sus tumores o metástasis. Esta estrategia nutricional conduce a una inhibición de la enzima TKTL1, reduciendo de este modo el metabolismo de la glucosa e inhibiendo la proliferación tumoral.

Tabla 1: Ejemplo de una mezcla de ácidos grasos en peso (%):

	Ácido caprílico (C8)	46,6
	Ácido cáprico (C10)	28,2
25	Ácido linoleico (ω 6-C18:2)	3,6
	SDA (ω 3-C18:4)	0,2
	ETA (ω 3-C20:4)	0,3
	EPA (ω 3-C20:5)	5,7
	DPA (ω 3-C22:5)	0,9
30	DHA (ω 3-C22:6)	4,9
	Otro	9,6
	MCFA total	74,8
	PUFA n-3 total	12,0
	Otro total	13,2
35	DHA : EPA	0,86
	n-3 : n-6	3,1

MFCA = Ácidos grasos de cadena media, es decir, ácidos grasos que tienen 8-14 átomos de carbono), PUFA = Ácidos grasos poliinsaturados, es decir, ácidos grasos que tienen más de un enlace doble).

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

45 Mediante inmunohistoquímica se analizaron cortes en parafina de un espesor de 5 μ m de tejido de cáncer y normal de tiroides, pulmón y colon. Para desenmascarar el antígeno, los cortes desparafinados se calentaron en citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 1 minuto a 450 W seguido de 5 minutos a 100 W. Después de aclarar con dH₂O, se realizó la inhibición de peroxidasa endógena con una incubación de 5 minutos con H₂O₂ al 3 %. Después, los cortes se expusieron a un sistema de bloqueo con biotina (DAKO) durante 10 minutos para bloquear la avidina-biotina endógena. Después de dos lavados en tampón Tris/solución salina (TBS), los portaobjetos se incubaron con suero de cabra al 1 % durante 30 minutos para bloquear la tinción no específica. De manera sucesiva, los cortes se expusieron a anticuerpo anti-TKTL1 de ratón (clon JFC12T10; IgG2b de ratón) (25 μ g/ml) o anti-Ser473 fosfo-Akt (587F11; IgG2b de ratón; Cell Signaling Technology) durante una noche a 4 °C. Después, los portaobjetos se lavaron en TBS y se incubaron con inmunoglobulinas anti-ratón biotiniladas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se trataron con estreptavidina-peroxida (DAKO). La tinción se reveló usando sustrato 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). La tinción de los núcleos con colorante de contraste se realizó usando hematoxilina acuosa.

60 En la Figura 6, 7 y 8 se muestran los resultados de esta tinción inmunohistoquímica. Para cada tipo de cáncer, se muestra un representante de tres experimentos independientes. En tejido de cáncer tiroideo la TKTL1 y la Akt fosforilada se expresan altamente. En cáncer pulmonar no microcítico (CPNM) y en carcinomas de colon se expresan niveles elevados de TKTL1 y Akt fosforilada.

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

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

La determinación de la proteína TKTL1 se realizó usando un anticuerpo anti-TKTL1 monoclonal. El anticuerpo antiTKTL1 se reveló por tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB; tinción marrón). La tinción con colorante de contraste se realizó con hematoxilina (tinción azul).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se realizó análisis inmunohistoquímico de TKTL1 o ph-Akt en cortes de tejido tiroideo normal, de cáncer tiroideo papilar (CTP), folicular (CTF) y no diferenciado (CTND) (Fig. 6A-C) y de tejido normal y de CPNM (Fig. 7 D), de tejido de cáncer de colon (Fig. 7 E) y de tejido de cáncer de vejiga y de próstata o de tejido normal (Fig. 8F-G) con AntiTKTL1 o anti-ph-Akt. El anti-TKTL1 o anti-ph-Akt se reveló por 3-amino-9-etilcarbazol (AEC; tinción roja). La tinción con colorante de contraste se realizó con hematoxilina (tinción azul). Se realizaron controles negativos usando IgG acoplada con isotipo.

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

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

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

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

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

Para visualizar el producto de amplificación de TKTL1 de 150 pb, se cargaron 15 µl de reacción PCR en tiempo real sobre un gel de agarosa al 3 %. Las diferencias de expresión entre el tejido tumoral y el tejido normal

correspondiente se habían calculado basándose en los datos en tiempo real y se muestran como veces de inducción en la muestra de tumor con respecto a la correspondiente muestra normal. (B) Cuantificación del transcrito en tiempo real del gen de TKT, TKTL1, TKTL2 y β -actina en un adenocarcinoma pulmonar y muestra normal correspondiente. El nivel de expresión más elevado se observó para la β -actina. Dentro de la familia de genes de transcetolasa, el gen de TKT muestra el mayor nivel de expresión. El nivel de expresión de TKTL1 y TKTL2 en pulmón normal es bajo en comparación con el de TKT y β -actina. A diferencia de esto, el nivel de expresión de TKTL1 en adenocarcinoma pulmonar es 60 veces superior al correspondiente en tejido normal.

Ejemplo 18: Diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas

Se analizaron líneas celulares de fibroblastos, fibroblastos de prepucio o leucocitos de sujetos sanos y de pacientes con la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas para determinar anomalías de TKTL1 mediante ELISA, análisis de electroenfoque en gel, electroforesis 2D en gel e inmunotinción. Los experimentos mediante ELISA se realizaron por estrategias ELISA diferentes. Un tipo de ELISA representa un ELISA típico, en el que el anticuerpo de captura o de detección se dirige contra una determinada proteína. El otro tipo de ELISA usado consiste en un anticuerpo dirigido contra una proteína y un anticuerpo contra otra proteína. Un ejemplo del ELISA del tipo 1 es la combinación del anticuerpo JFC12T10 contra TKTL1 y el anticuerpo JFC10T9 contra TKTL1. JFC12T10 detecta un epítipo de la proteína TKTL1 y no reacciona en cruzado con TKT ni TKTL2. JFC10T9 detecta otro epítipo de TKTL1. La proteína TKTL1 puede detectarse y medirse usando los JFC12T10/JFC10T9 mediante ELISA. Un ejemplo del ELISA de tipo 2 es el anticuerpo JFC12T10 dirigido contra TKTL1 y el anticuerpo JFC11D8 dirigido contra DNasaX. Usando este ELISA puede determinarse la interacción de la proteína TKTL1 y DNasaX. Los dos tipos de reacciones de ELISA se realizaron con muestras de personas sanas y de pacientes. Un tipo de muestra consiste en fluidos corporales de tipo suero y se analizó directamente para determinar la presencia de proteínas e interacciones de proteínas. Otro tipo de análisis se realizó usando un anticuerpo (por ejemplo JFC12T10 o JFC11D8) acoplado a un engarce de carbono. Usando procedimientos de purificación por afinidad se aislaron complejos multiproteína de células (derivados de cultivos de células o de tejidos originales). Los complejos multiproteína se analizaron por electroenfoque o electroforesis 2D en gel seguido por inmunotinción o determinación de la actividad enzimática (por ejemplo reacción bi- o uni-sustrato de transcetolasa; ensayo de DNasa, actividad GAPDH). Usando estos ensayos, pudieron identificarse isoformas de la proteína específicamente presentes en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como AD. En pacientes con trastornos neurodegenerativos como pacientes con AD, se habían detectado variantes de TKTL1 con pH alcalino alto, reacción bi- o uni-sustrato más baja y afinidad más baja a tiamina. Adicionalmente, usando PAGE convencional, en células intactas o en extractos de células de estos pacientes en comparación con individuos sanos, se detectaron isoformas más pequeñas de la isoproteína y una mayor cantidad de proteínas más pequeñas en comparación con TKTL1 de longitud completa. Además, en individuos sanos que después (meses y años más tarde) mostraron enfermedad neurodegenerativa como AD, se había observado una reacción bi- o uni-sustrato reducida de TKTL1 o una menor afinidad de TKTL1 por la tiamina. Las variantes de TKTL1 observadas conducen a metabolismo de azúcar reducido en células. Este metabolismo reducido de azúcar conduce a la formación de AGE potenciada y a la formación de AGE que conduce a agregados de proteínas de moleculares elevados y a la muerte celular. Esta muerte celular no deseada de células necesarias para la función correcta del cerebro es una causa importante para estas enfermedades neurodegenerativas. Para identificar individuos que no tienen variantes de TKTL1 con una reacción bi- o uni-sustrato reducida o menor afinidad por tiamina, se establecieron anticuerpos contra TKTL1 que pueden usarse para aislar proteínas TKTL1 de muestras a ensayar (por ejemplo, JFC12T10). Estas muestras pueden ser fluidos corporales (por ejemplo suero) o muestras de células (por ejemplo proteínas de fibroblastos o leucocitos). Los anticuerpos contra TKTL1 acoplados a placas ELISA capturan las proteínas TKTL1 y después de retirar por lavado las proteínas TKT y TKTL2, puede determinarse enzimáticamente la reacción bi- o uni-sustrato (trans)-cetolasa en una reacción enzimática acoplada, por ejemplo, por acumulación del NADH reducido (los ensayos enzimáticos se han descrito anteriormente). De manera similar la reacción enzimática se realizó a diferentes concentraciones de tiamina. Reduciendo el nivel de tiamina en el ensayo se identificaron variantes de TKTL1 en pacientes con enfermedades neurodegenerativas con una afinidad reducida por tiamina. Usando esta estrategia de ELISA y análisis enzimáticos, pueden identificarse variantes de TKTL1 que predisponen a enfermedades neurodegenerativas en un momento antes de que se presenten los síntomas de enfermedades neurodegenerativas. Esto puede usarse para prevenir enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, aplicando derivados de tiamina más solubles como benfotiamina o una dieta con niveles reducidos o con determinados tipos de azúcares (por ejemplo glucosa). Además de la identificación de variantes de TKTL1 con una reacción bi o uni-sustrato reducida o menor afinidad por tiamina, las variantes de TKTL1 con una solubilidad reducida o variantes de TKTL1 presentes en complejos de elevado peso molecular se identificaron en pacientes con enfermedades neurodegenerativas de tipo AD. Los autores de la invención establecen anticuerpos específicos contra TKTL1 que reaccionan específicamente contra variantes de TKTL1 presentes en complejos de elevado peso molecular en el núcleo de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como AD (JFC7T4). Usando reacciones ELISA o tinciones inmunohistoquímicas, estas variantes de TKTL1 específicas de enfermedades pueden identificarse en fluidos corporales (por ejemplo suero) o en muestras de tejido (por ejemplo leucocitos, fibroblastos, biopsias). Adicionalmente en combinación con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas presentes en estos complejos multiproteína, puede realizarse ELISA para detectar la presencia de interacciones de proteínas. Dicho ELISA de tipo 2 que consiste en el anticuerpo JFC8T7 contra TKTL1 y el anticuerpo JFC7D4 contra DNasaX identifica una interacción de proteína de TKTL1 y DNasaX, específica para células que entran en apoptosis. Otro ELISA de tipo 2 que consiste en el anticuerpo

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

Ejemplo 19: Expresión de TKTL1 en células endoteliales

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una tiamina seleccionada del grupo que consiste en oxitiamina, benfooxitiamina (-oxibenfotiamina), piritiamina y 2-metiltiamina para la preparación de una composición farmacéutica para la inhibición de la ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) y para su uso en el tratamiento terapéutico o el control de enfermedades asociadas con una ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam) potenciada.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la tiamina es benfooxitiamina (-oxibenfotiamina) o un derivado funcionalmente equivalente de la misma que tiene la función de inhibir la ruta metabólica de la fermentación aerobia de la glucosa en mamíferos (aGF-mam).

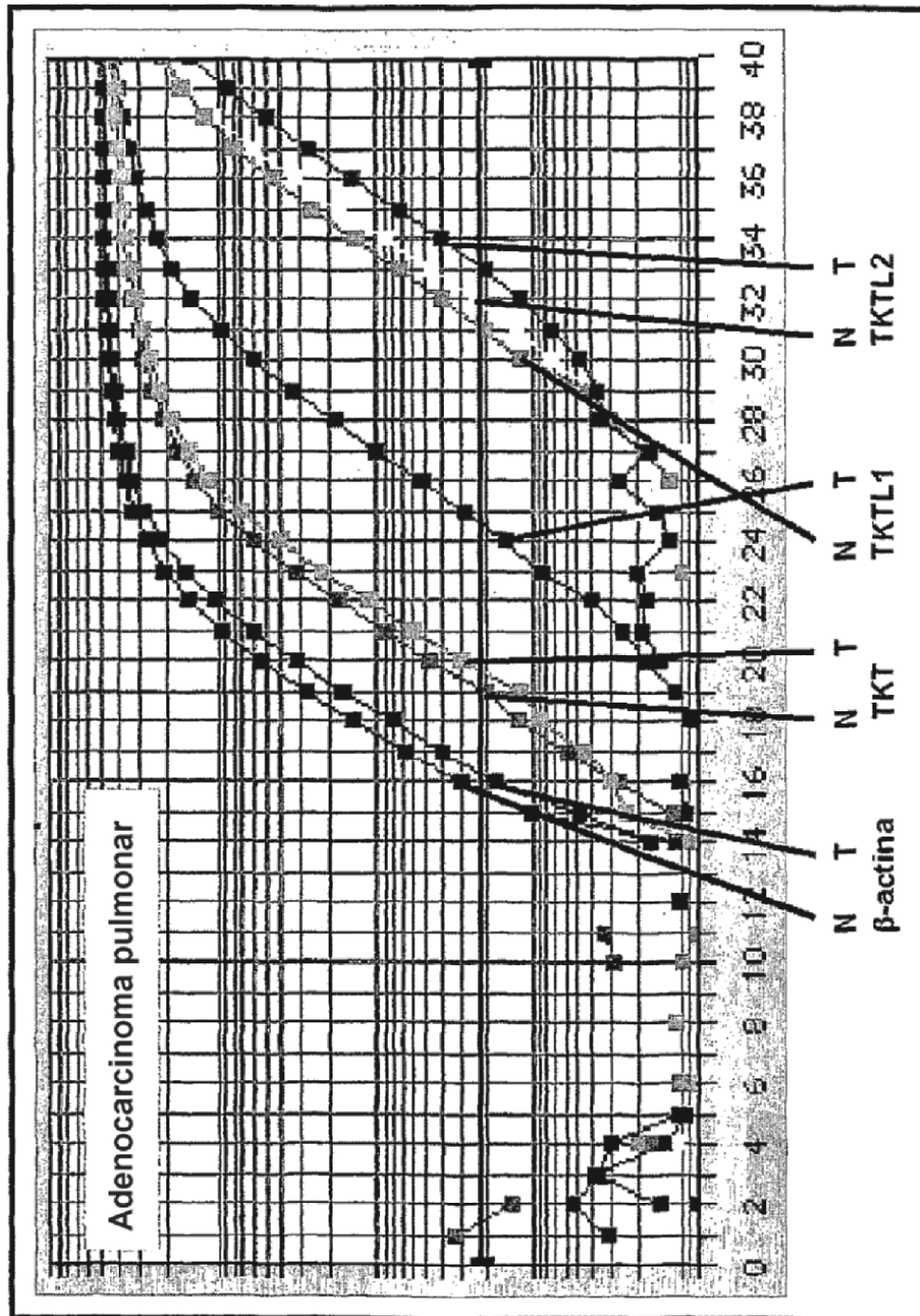


Fig. 1

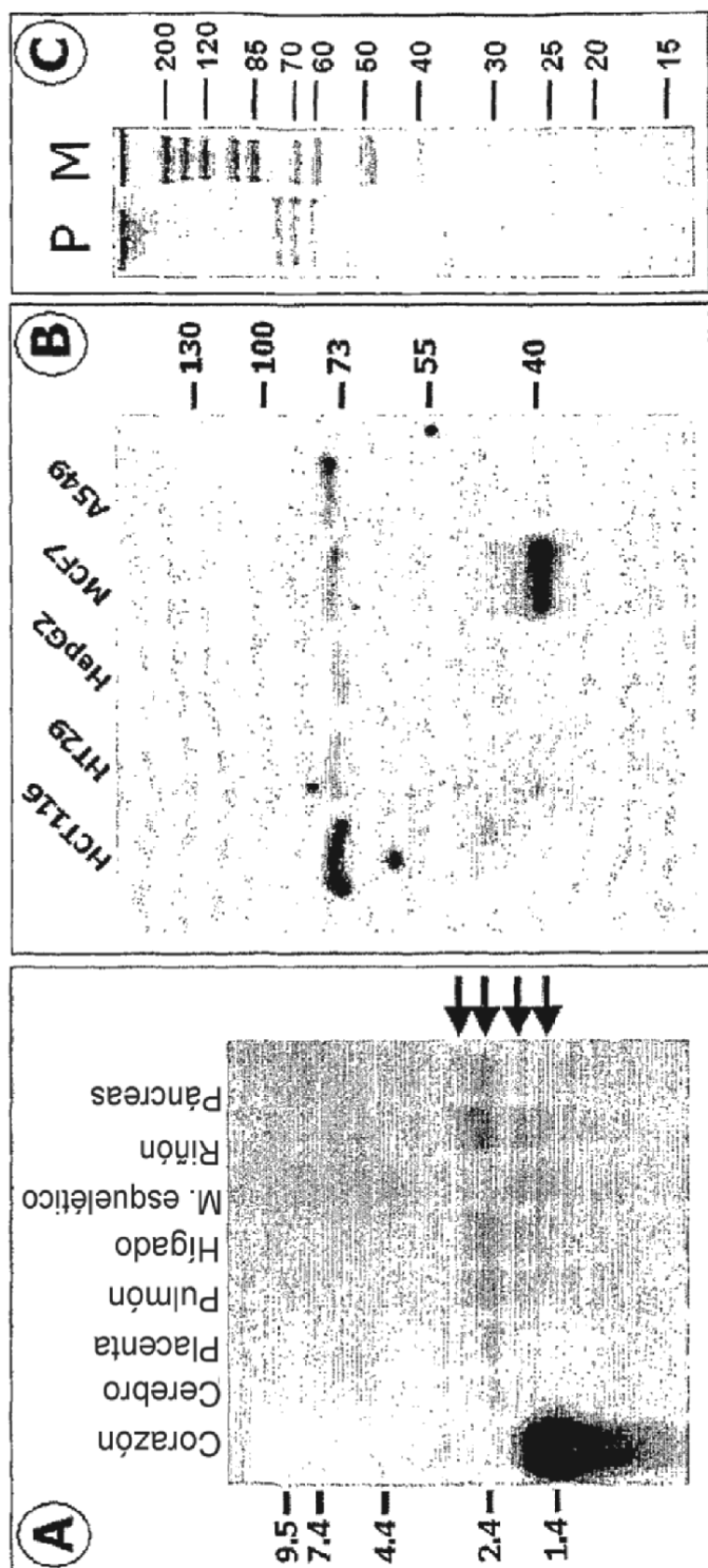


Fig. 2

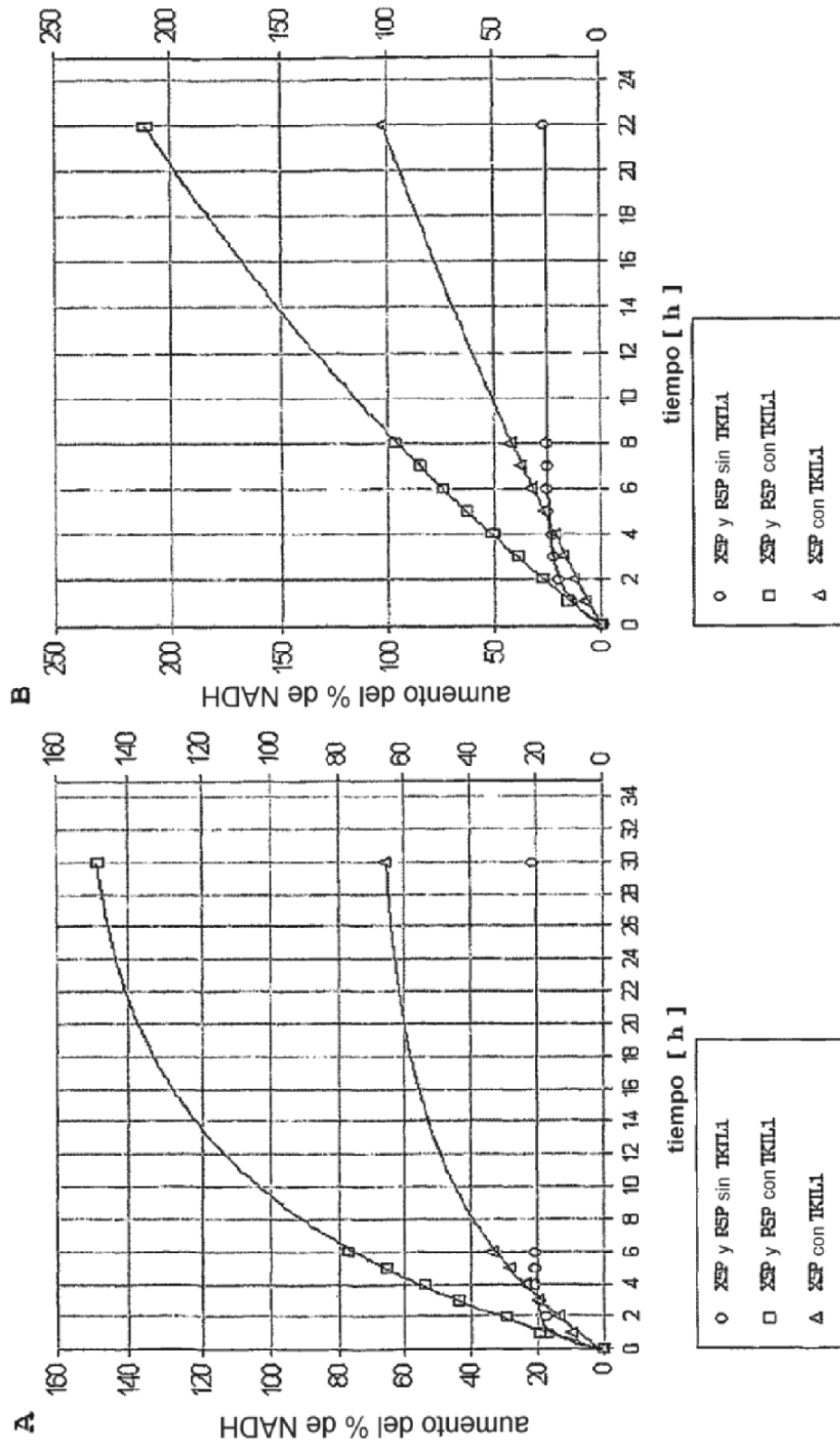


Fig. 3

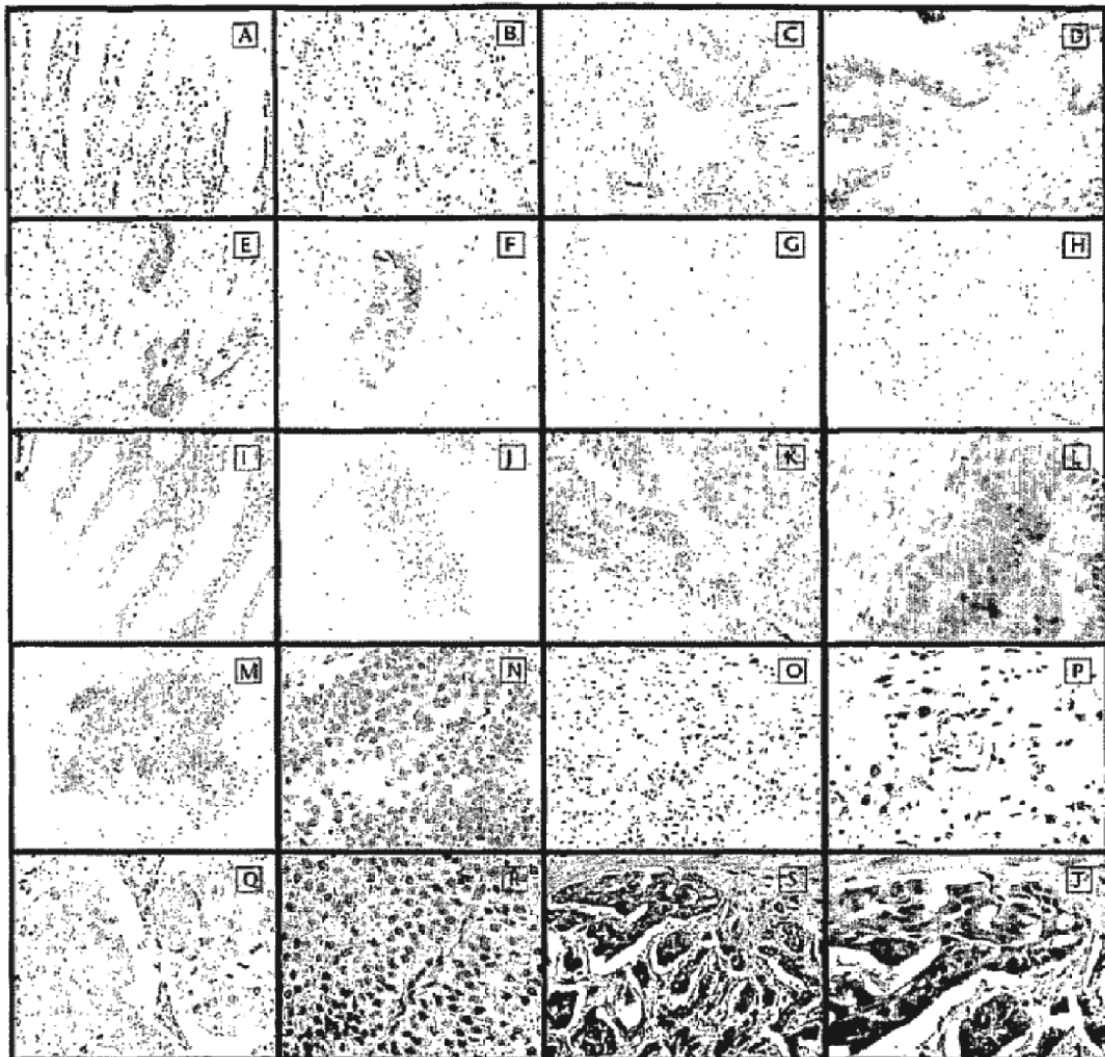


Fig.4

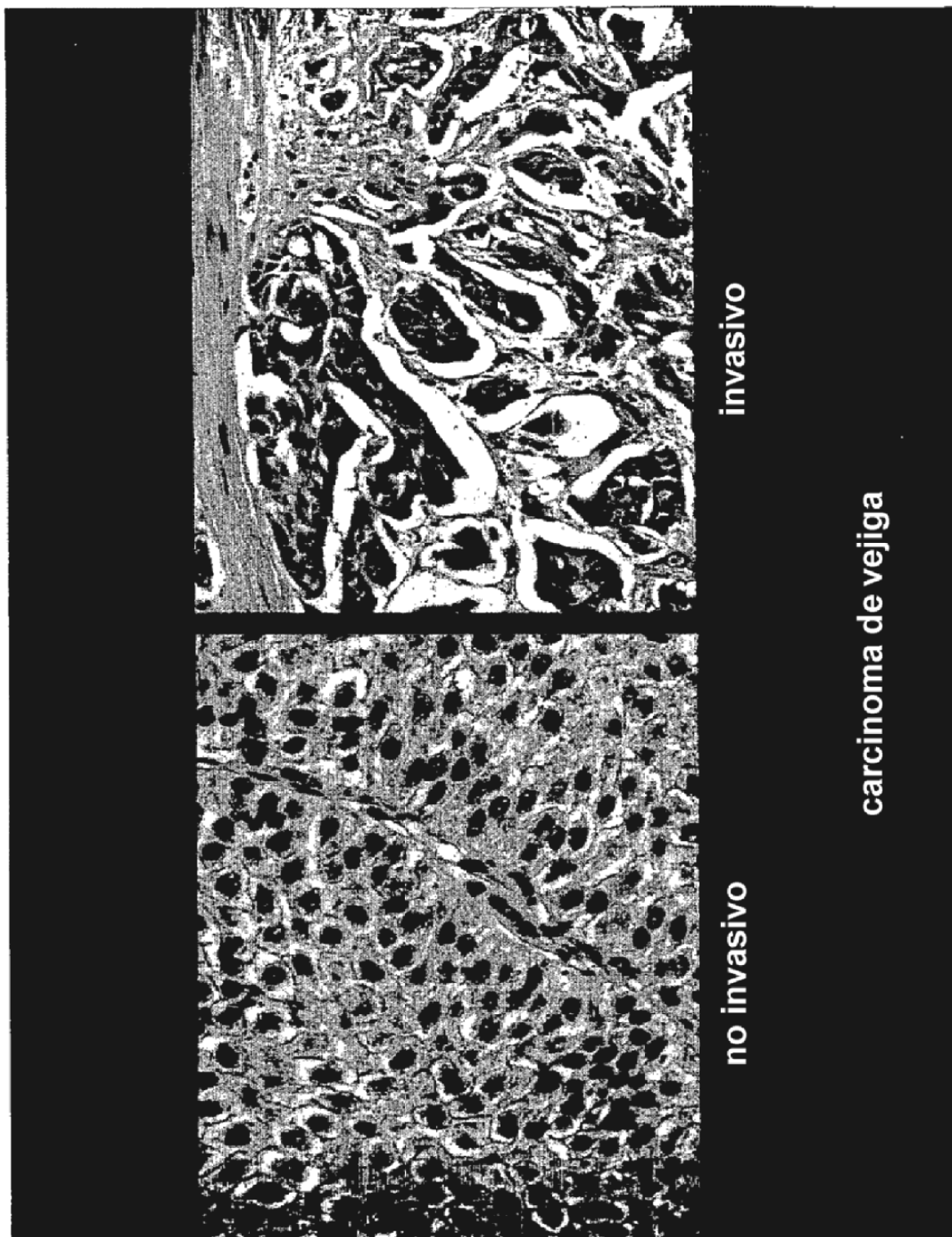


Fig. 5

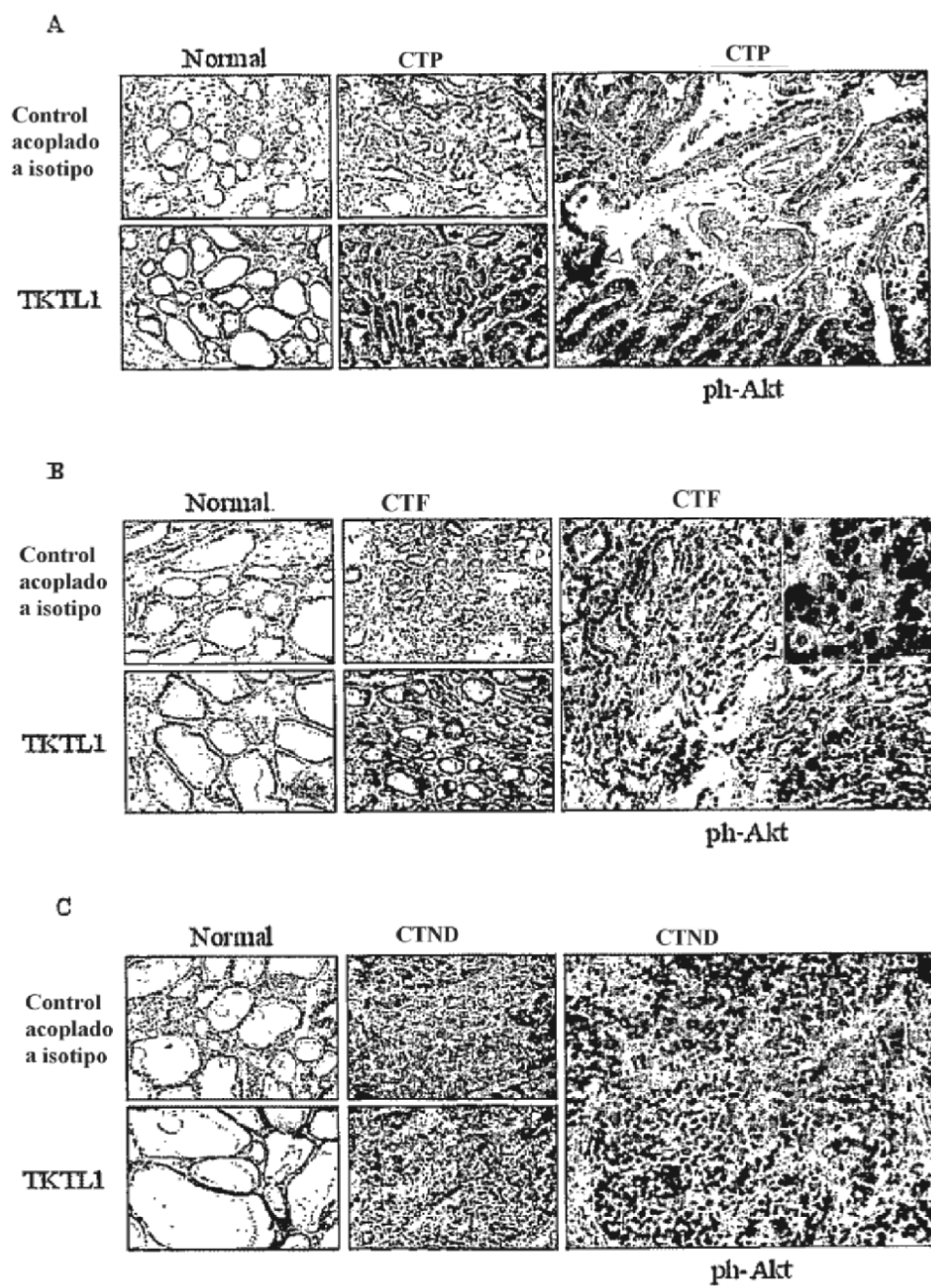


Fig.6

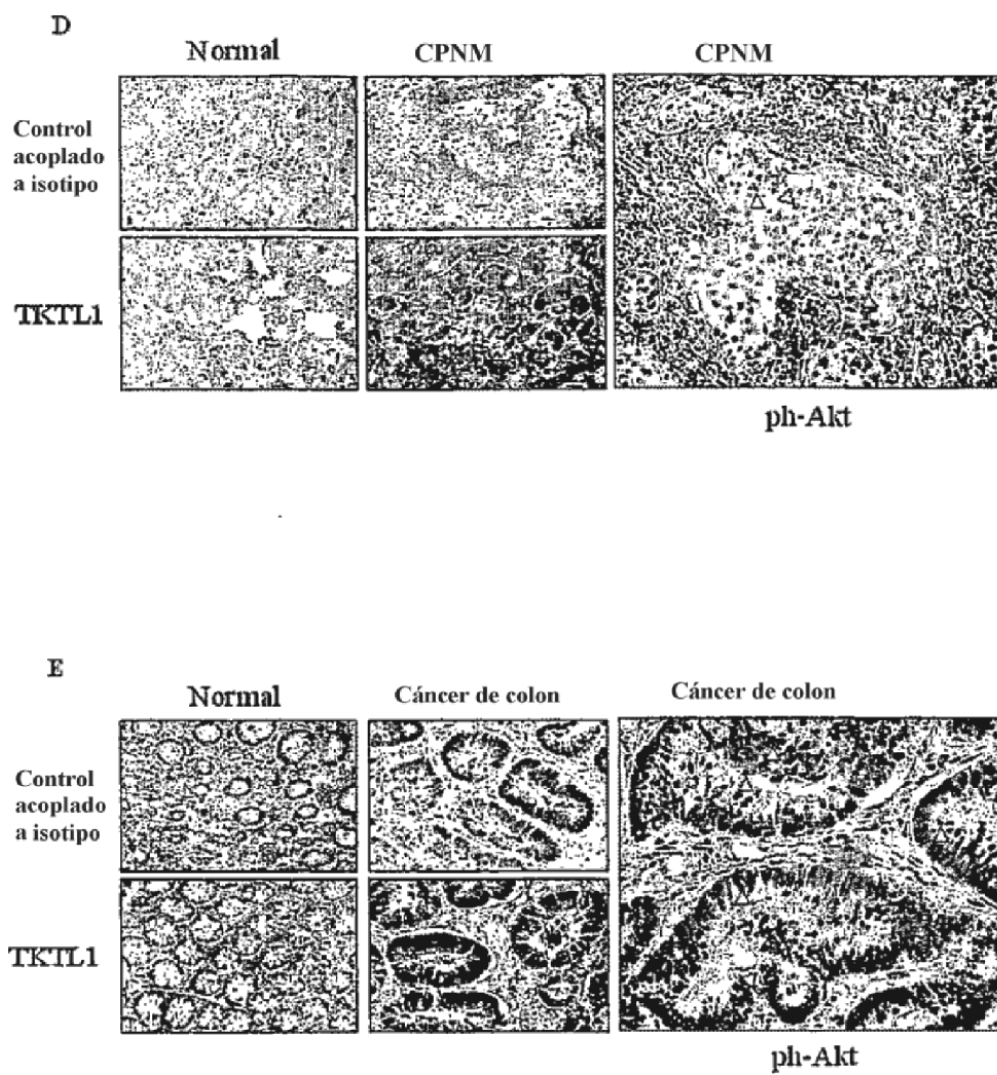


Fig.7

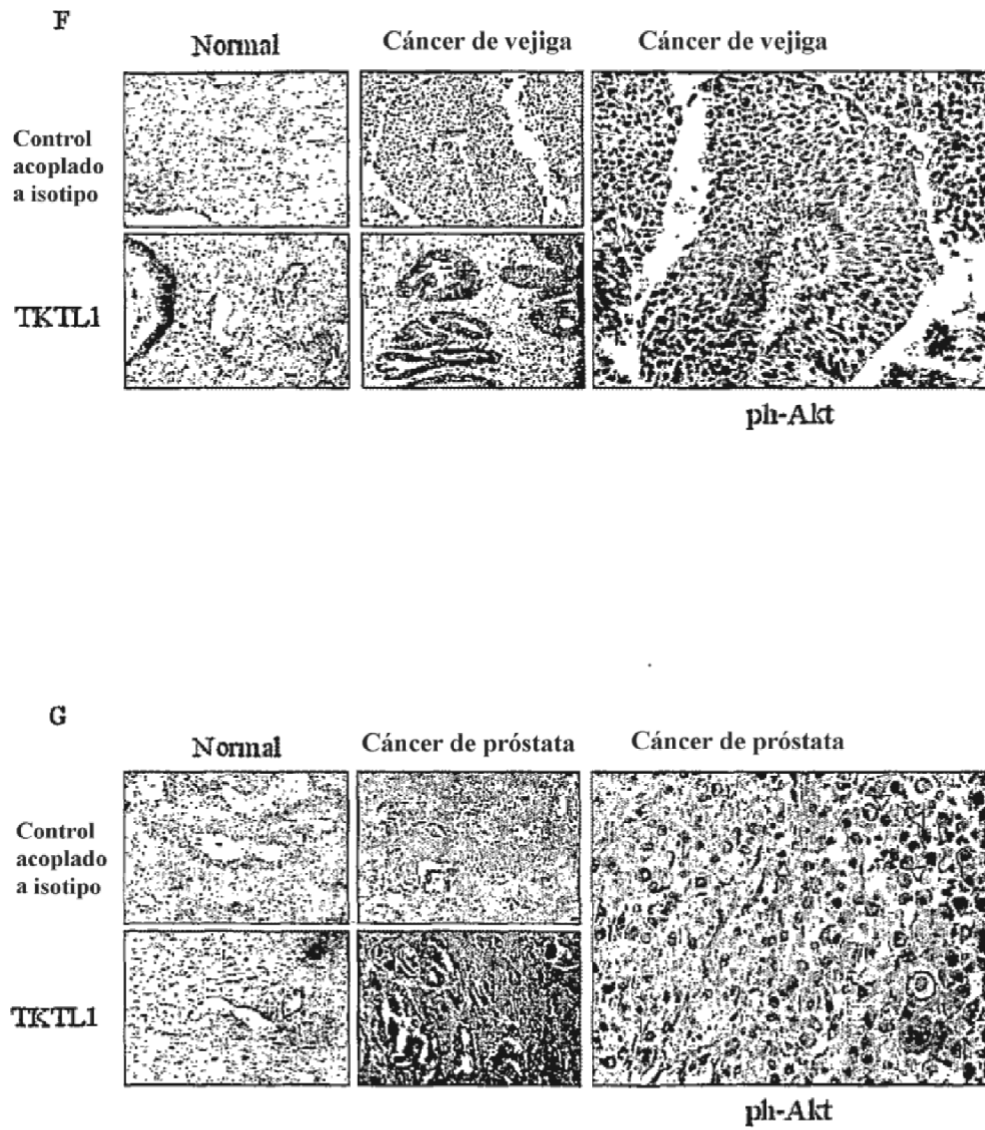
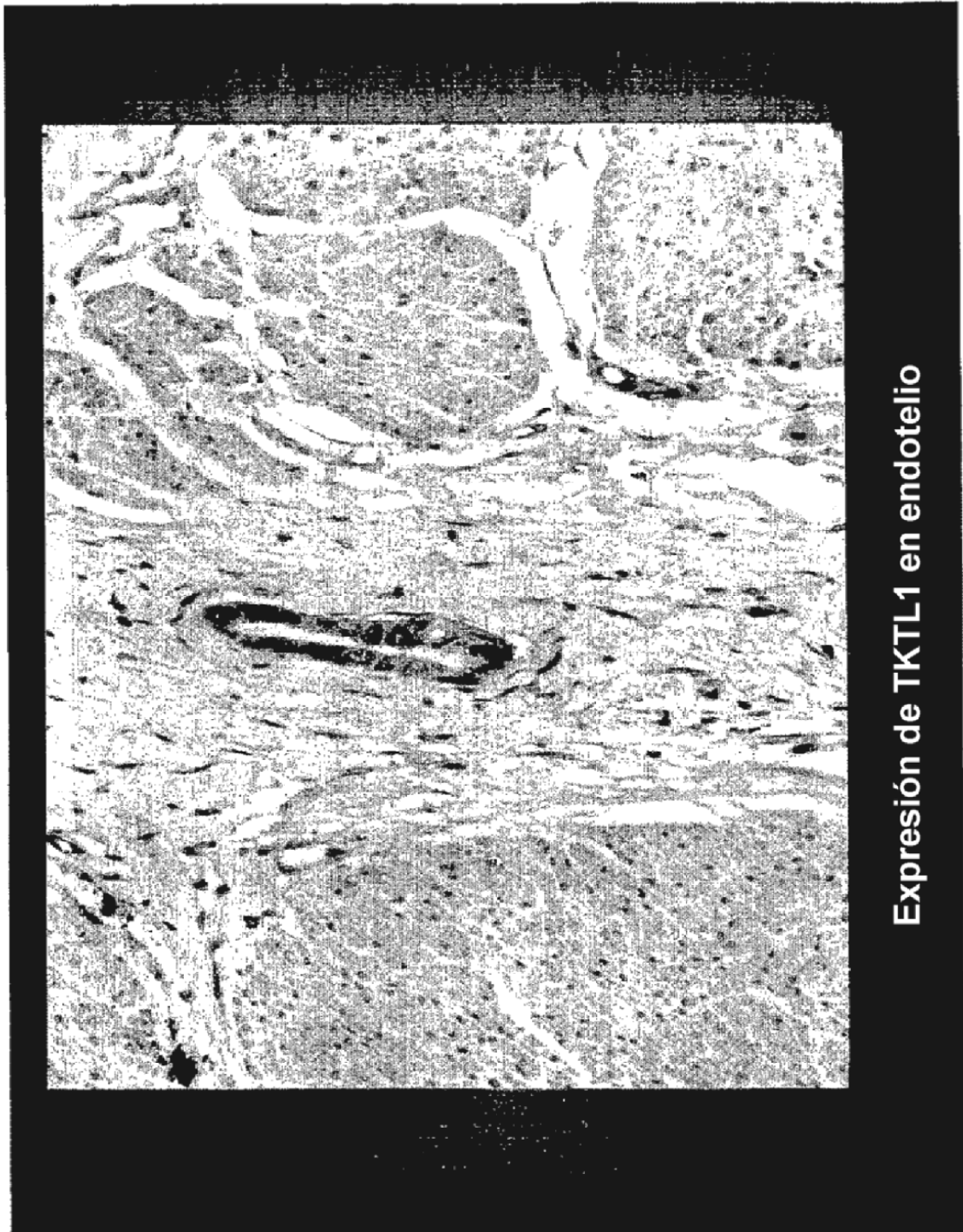


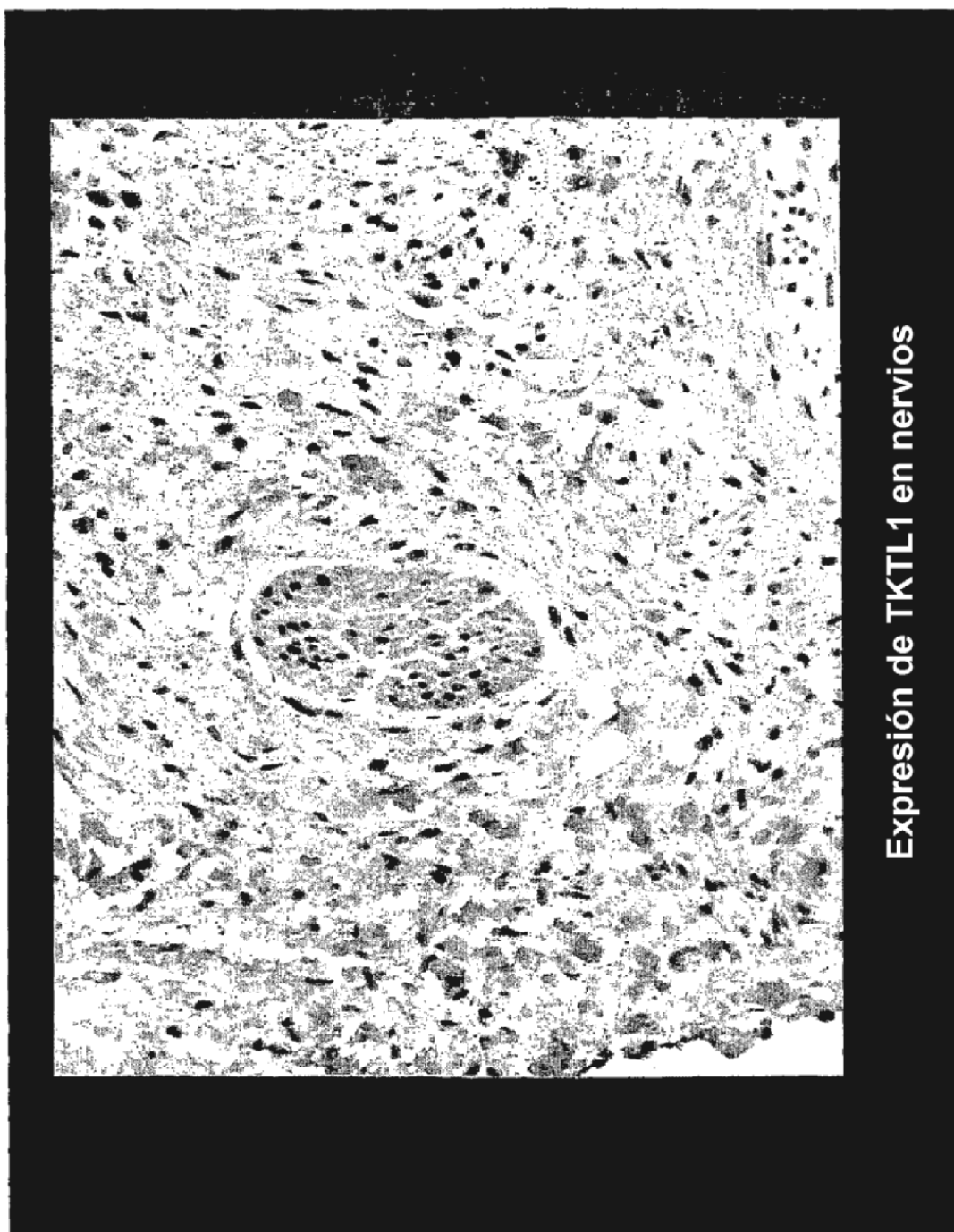
Fig.8



Expresión de TKTL1 en endotelio

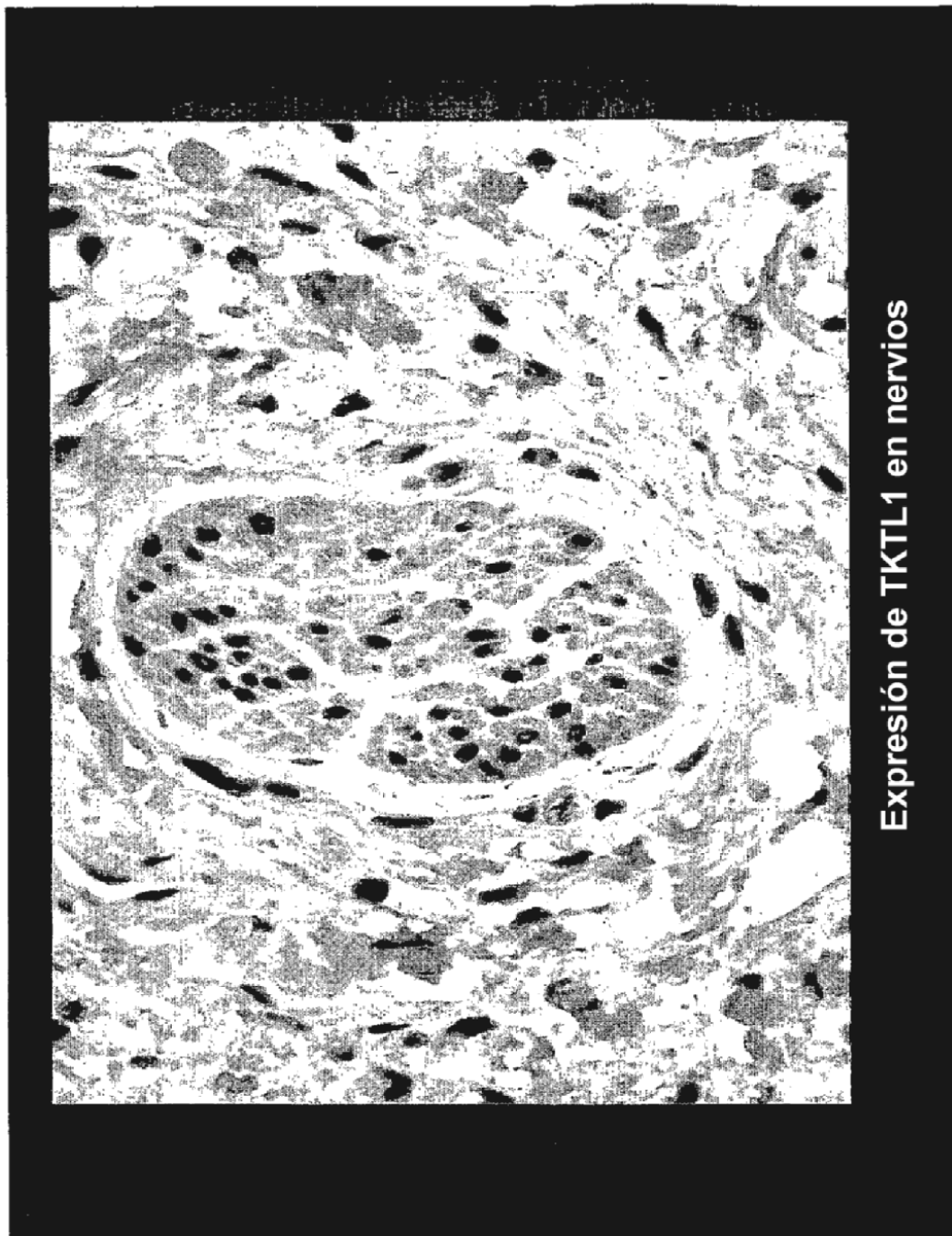
Fig. 9





Expresión de TKTL1 en nervios

Fig. 11



Expresión de TKTL1 en nervios

Fig. 12

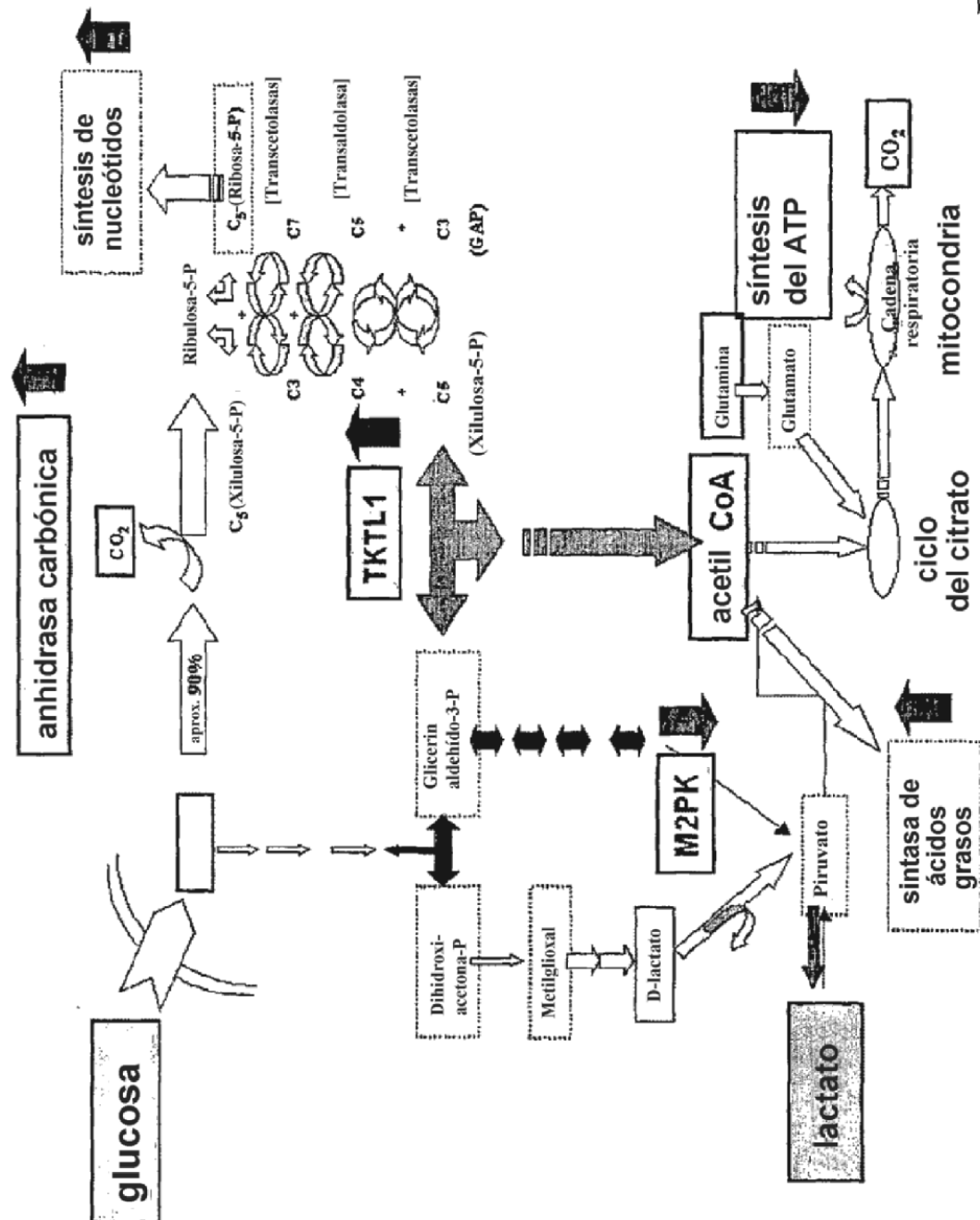


Fig. 13

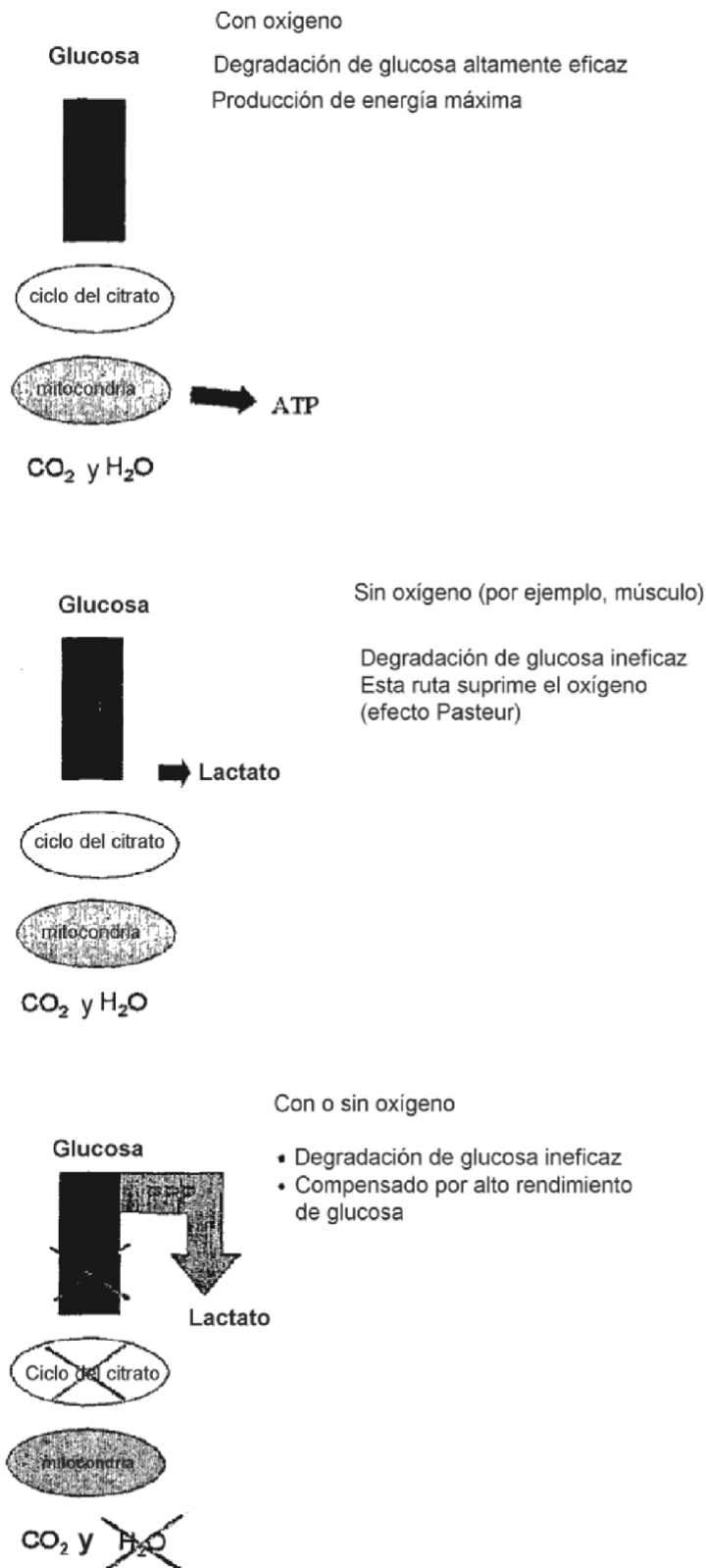
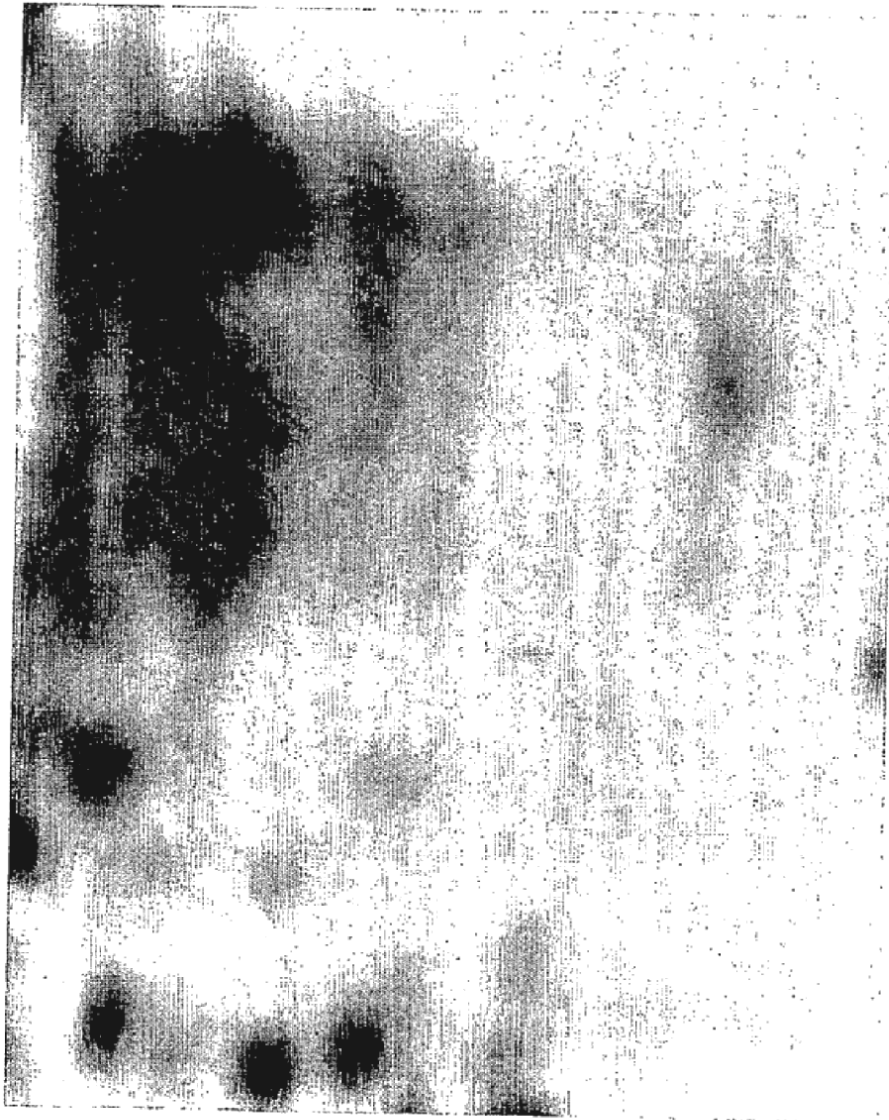


Fig. 14



Electroforesis bidimensional en gel de un complejo de multiproteína con TKTL1

Fig. 15



Isoformas de TKTL1 de alto peso molecular

Fig. 16

A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,054	0,037	0,050	0,039	0,036	0,055	0,043	0,047	0,041	0,051	0,014	0,017
B	0,043	0,036	0,039	0,044	0,054	0,048	0,039	0,037	0,043	0,056	0,017	0,015
C	0,693	0,699	0,124	0,937	0,860	0,146	0,119	0,773	0,493	0,169	0,926	0,791
D	1,189	1,005	1,703	0,790	0,839	1,047	1,389	0,420	1,533	0,258	0,303	1,539
E	1,422	1,890	0,903	1,629	1,380	1,307	0,477	1,488	1,400	1,045	1,243	1,568
F	0,911	0,576	1,380	2,158	0,701	1,045	1,344	0,289	1,206	1,638	2,010	1,454
G	1,257	1,450	0,799	1,489	1,257	1,057	1,346	0,692	0,701	1,924	1,830	1,835
H	1,530	0,803	1,322	0,519	0,506	1,503	1,256	0,493	0,620	0,913	1,772	1,134
B												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,018	1,935	1,804	1,409	2,005	1,930	1,460	2,103	1,884	1,709	0,037	0,042
B	1,480	1,993	1,635	1,993	1,920	1,488	1,703	1,939	1,794	1,504	0,036	0,039
C	1,593	1,429	1,500	1,703	1,229	1,593	1,559	1,703	1,550	1,838	1,993	1,504
D	0,273	0,493	0,300	0,188	0,320	0,228	0,219	0,302	0,320	0,250	0,183	0,248
E	0,239	0,396	0,320	0,370	0,329	0,284	0,270	0,320	0,401	0,222	0,199	0,243
F	0,410	0,399	0,370	0,323	0,385	0,299	0,378	0,322	0,399	0,461	0,295	0,348
G	0,281	0,310	0,352	0,383	0,356	0,328	0,344	0,325	0,294	0,274	0,287	0,299
H	0,193	0,190	0,218	0,301	0,317	0,170	0,194	0,253	0,199	0,207	0,242	0,322

A - Determinación por ELISA de isoformas de la proteína TKTL1

B - Actividad transcetolasa de la proteína TKTL1 aislada

Fig. 17