

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 714**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2019** **PCT/EP2019/084256**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2020** **WO20120406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2019** **E 19818035 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3894580**

54 Título: **Métodos de ensayo de FAMIN**

30 Prioridad:

10.12.2018 GB 201820095

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

24.10.2024

73 Titular/es:

CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools, Trinity Lane,
Cambridge, Cambridgeshire CB2 1TN, GB

72 Inventor/es:

KASER, ARTHUR y
CADER, ZAEEM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 983 714 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

Métodos de ensayo de FAMIN

5 **Campo**

La presente invención se refiere a ensayos para determinar la actividad de la proteína FAMIN y a métodos de cribado de compuestos que modulan la actividad de la proteína FAMIN.

10 **Antecedentes**

El gen que codifica el nexo inmunidad-metabolismo de ácidos grasos ("fatty acid metabolism-immunity nexus", FAMIN; *LACC1*, C13orf31) está fuertemente relacionado con enfermedades humanas. Las mutaciones altamente penetrantes causan artritis idiopática juvenil (AIJ), una fiebre punzante con erupción cutánea y artritis conocida como enfermedad de Still, o enfermedad inflamatoria intestinal de aparición temprana. Un polimorfismo de codificación habitual, I254V, portado por aproximadamente un tercio de la población mundial, aumenta el riesgo de enfermedad de Crohn (EC), una enfermedad inflamatoria intestinal, y la susceptibilidad a la lepra, una infección crónica de *Micobacterium leprae*.

20 FAMIN, una proteína de 430 aminoácidos, no tiene dominios con función bioquímica descrita. Sin embargo, los macrófagos deficientes en FAMIN están inmunológica y metabólicamente comprometidos, independientemente de si dependen de la glucólisis aeróbica o de la fosforilación oxidativa (1, 2).

Identificar la función bioquímica de las proteínas huérfanas, tales como FAMIN, es un desafío formidable (3, 4).

25 **Sumario**

Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que FAMIN (nexo inmunidad-metabolismo de ácidos grasos) es una enzima de rescate de purina trifuncional que muestra una combinación distintiva de actividades adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y metiltioadenosina fosforilasa. Además, se descubrió sorprendentemente que la actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN incluía una actividad adenosina fosforilasa singular que no está presente en otras purina nucleósido fosforilasas de mamíferos, y dicha actividad se ha considerado ausente en las células eucariotas. Se han desarrollado métodos de ensayo y métodos de cribado de moduladores de FAMIN basándose en estos hallazgos.

35 Un primer aspecto de la invención proporciona un método para medir la actividad de una proteína FAMIN que comprende;

proporcionar una proteína FAMIN aislada; y
determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN aislada.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un método de cribado de un compuesto que modula la actividad de una proteína FAMIN que comprende;

45 determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de una proteína FAMIN aislada en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo.

Una diferencia en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo modula la actividad de la proteína FAMIN. Una disminución en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo puede ser indicativa de que el compuesto de ensayo es un inhibidor de FAMIN. Un aumento en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo puede ser indicativa de que el compuesto de ensayo es un potenciador de FAMIN.

Un método del primer o segundo aspecto puede comprender determinar la actividad adenosina desaminasa de la proteína FAMIN. La actividad adenosina desaminasa de la proteína FAMIN se puede determinar midiendo la conversión de una molécula de adenosina en una molécula de inosina en presencia de la proteína FAMIN.

Un método del primer o segundo aspecto puede comprender determinar la actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN. La actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN se puede determinar midiendo la conversión de un nucleósido de purina en una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN; o la conversión de una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en un nucleósido de purina en presencia de la proteína FAMIN.

La actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN puede incluir la actividad adenosina fosforilasa. En algunas realizaciones preferidas, un método del primer o segundo aspecto puede comprender determinar la actividad adenosina fosforilasa de la proteína FAMIN. La actividad adenosina fosforilasa de la proteína FAMIN se puede determinar midiendo la conversión de adenosina en adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN; o la conversión de adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato en adenosina en presencia de la proteína FAMIN.

Un método del primer o segundo aspecto puede comprender determinar la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN. La actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN se puede determinar midiendo la conversión de metiltioadenosina en adenina y una molécula de S-metil-5'-tiiorribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN; o la conversión de adenina y una molécula de S-metil-5'-tiiorribosa-1-fosfato en metiltioadenosina en presencia de la proteína FAMIN.

Otros aspectos y realizaciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra que FAMIN es una enzima metabolizadora de nucleósidos de purina. La figura 1A muestra un banco metabolómico que consiste en la fase acuosa de una extracción con metanol:cloroformo (Folch) de células HepG2 48 h después de la transfección con ARNip *FAMIN*. La espectrometría de masas de alta resolución en modos de ionización por electronebulización (ESI) positiva y negativa acoplada a cromatografía de BEH-amida (HILIC) o C18-pfp resolvió aproximadamente 25 000 características individuales. Los paneles de la izquierda muestran espectros de masas totales representativos y el panel de la derecha los muestra separados por peso molecular (m/z), tiempo de retención en la cromatografía y niveles relativos. La figura 1B muestra el cambio en los niveles relativos de metabolitos en el banco después de la incubación con 10 μ g de FAMIN recombinante o control de tampón de proteínas, en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato ("phosphate-buffered saline", PBS) durante 1 h a 37 ° C. Gráfico de volcán con valor de p sin ajustar y $\log_2$ del cambio en n° de veces, los puntos grises etiquetados con letras indican compuestos cuya abundancia disminuyó significativamente (sustratos candidatos; 'A'-C') o aumentó significativamente (productos candidatos; 'D'-F') en presencia de FAMIN ($n = 3$ reacciones independientes). La figura 1C muestra cromatogramas extraídos representativos para sustratos candidatos (superior) y productos (inferior) de la figura 1B. La intensidad de los picos de cada cromatograma extraído de un valor m/z dado se normalizó al nivel máximo de 100. La figura 1D muestra espectros de masas y cromatogramas extraídos representativos del compuesto 'A' y el patrón correspondiente para adenosina. La figura 1E muestra espectros de masas y cromatogramas extraídos representativos de supuestos metabolitos catalizados por FAMIN B, D y F, y los patrones correspondientes para inosina, hipoxantina y guanina. La figura 1F muestra la abundancia (área bajo el pico cromatográfico, normalizada para el contenido total de iones) de adenosina, inosina, hipoxantina y ribosa-1-fosfato dentro del banco metabolómico incubadas con 10 μ g de FAMIN recombinante o control de tampón de proteínas (1 h, 37 °C, PBS; $n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 1G muestra los niveles de guanosina y guanina después de la incubación del extracto acuoso de células HepG2 con 10 μ g de FAMIN recombinante en 100 μ l de PBS. ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). $*p < 0,05$ y $**p < 0,01$ (prueba de la t de Student de dos colas, para datos independientes). La figura 1H muestra, en el lado izquierdo, cromatogramas extraídos representativos del compuesto 'E' catalizado por FAMIN y los patrones correspondientes para ribosa-1-fosfato, ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato. Todas las mediciones se realizaron utilizando una columna HILIC de BEH amida y un triple cuadrupolo TSQ Quantiva. El panel derecho muestra la proporción de iones hijos del seguimiento de reacción seleccionada ("selected reaction monitoring", SRM) con valores nominales de m/z de 79 y 97. La figura 1I muestra los niveles de inosina, guanosina, citidina, uridina y ATP después de la incubación de 0,1, 1,0, 10,0 o 100,0 μ g de FAMIN recombinante con el banco metabolómico completo (fase acuosa del extracto con metanol:cloroformo de células HepG2) en 100 μ l de PBS ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 1J muestra la abundancia de adenosina dentro del banco después de la incubación con 0,1, 1,0, 10,0 o 100,0 μ g de FAMIN recombinante o control de tampón de proteínas (1 h, 37 °C, PBS; $n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). $*p < 0,05$ y $**p < 0,01$ (prueba de la t de Student de dos colas, para datos independientes). Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

La figura 2 demuestra que FAMIN tiene actividades adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y S-metil-5'-tioadenosina fosforilasa. La figura 2A muestra cromatogramas extraídos representativos de adenosina (cromatograma superior) e inosina, hipoxantina, ribosa-1-fosfato (cromatograma inferior) después de la incubación de 10 μ g de FAMIN recombinante o control apropiado con adenosina 100 μ M durante 1 h a 37 °C en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La intensidad de los picos de cada cromatograma extraído por valor de m/z dado se normalizó al nivel máximo de 100. Los controles indicados incluyen tampón de reacción (PBS), tampón de elución de proteínas como se describe en los métodos, FAMIN recombinante sin sustrato o tampón de proteínas con sustrato de adenosina. La figura 2B muestra los niveles de adenosina, inosina, hipoxantina y ribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μ g de FAMIN recombinante o un control apropiado con adenosina 100 μ M según la figura 2A ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). Las figuras 2C, 2D, 2E y 2F muestran cromatogramas y espectros de masas representativos para (2C) adenina, (2D) hipoxantina, (2E) inosina y (2F) ribosa-1-fosfato. Paneles superiores: (2C-E) cromatograma de iones positivos extraído que muestra la inyección de (2C) patrón de

adenina 1 μM ; (2D) patrón de hipoxantina 5 μM ; (2E) patrón de inosina 5 μM en una columna BEH C8; (2F) cromatograma de iones negativos extraído que muestra la inyección de un patrón de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ribosa-1-fosfato en una columna HILIC de BEH amida. Todas las mediciones se realizaron con Q Exactive Orbitrap y se extrajeron a los valores de m/z valores de (2C) adenina $[\text{M}+\text{H}^+]$: 136,0617, (2D) hipoxantina $[\text{M}+\text{H}^+]$: 137,0457, (2E) inosina $[\text{M}+\text{H}^+]$: 269,0877 y (2F) ribosa-1-fosfato $[\text{M}+\text{H}^+]$: 229,0119 con una tolerancia de 2 ppm. Paneles centrales: Cromatogramas extraídos correspondientes de una muestra representativa (10 μg de FAMIN^{254I} recombinante incubados con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de solución salina tamponada con fosfato). Los picos en los tiempos de retención indicados coinciden perfectamente con los de los patrones de adenina, hipoxantina, inosina y ribosa-1-fosfato. Paneles inferiores: Espectro de masas y espectrometría de masas por transformada de Fourier ("Fourier transform mass spectrometry", FTMS) de alta resolución de la muestra de FAMIN^{254I} representativa incubada durante los picos supuestamente identificados como (2C) adenina, (2D) hipoxantina, (2E) inosina o (2F) ribosa-1-fosfato. Se buscaron los valores nominales de m/z de (2C) 136, (2D) 137, (2E) 269 y (2F) 229, respectivamente, y se fragmentaron selectivamente utilizando un voltaje de colisión de disociación por colisión de mayor energía ("higher-energy collision", HCD) de 25 eV para obtener los fragmentos que se muestran. La figura 2G muestra los niveles de inosina, hipoxantina y ribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante o colesterol oxidasa equimolar con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2H muestra cromatogramas extraídos representativos utilizando un método CSH-C18 modificado para permitir la separación y medición de la adenina después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante o un control apropiado con adenosina 10 μM . La figura 2I muestra la conversión fraccionada de adenosina en adenina frente a inosina frente a hipoxantina después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS. Se calculó a partir de los niveles absolutos de hipoxantina e inosina cuantificados utilizando patrones internos de ¹³C₂, ¹⁵N₁-hipoxantina y ¹⁵N₄-inosina, y los niveles de adenina se calcularon un patrón externo de adenina. La figura 2J muestra la detección de los niveles de [¹³C₅¹⁵N₅] adenina, [¹³C₁₀¹⁵N₄] inosina, [¹³C₅¹⁵N₄] hipoxantina y [¹³C₅] ribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μg de FAMIN^{254I} recombinante con [¹³C₁₀¹⁵N₅] adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2K muestra los niveles de adenosina en reacciones de adenina 50 μM y ribosa-1-fosfato 50 μM en 100 μl de PBS en presencia de 10 μg de FAMIN o control (1 h, 37 °C). La figura 2L muestra los niveles de adenina, inosina y ribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante o controles apropiados, incluida FAMIN recombinante desnaturalizada por calor, con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de tampón PBS o HEPES ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2M muestra reacciones enzimáticas catalizadas por FAMIN. La figura 2N muestra la especificidad de la actividad FAMIN hacia los nucleósidos de purina y pirimidina, medida como consumo de sustrato (cada uno añadido a 100 μM) después de la incubación con 10 μg de FAMIN recombinante o control de proteína en 100 μl de PBS durante 1 h a 37 °C (SAM; S-adenosilmetionina; MTA, S-metil-5'-tioadenosina; 2'-dA, 2'-desoxiadenosina; $n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2O muestra cromatogramas extraídos representativos de inosina, hipoxantina y ribosa-1-fosfato (cromatograma superior); y MTA, adenina y metiltiorribosa-1-fosfato (cromatograma inferior) para las reacciones de la figura 2N. Las figuras 2P y 2Q muestran, a la izquierda, reacciones enzimáticas catalizadas por FAMIN. A la derecha se muestran los niveles de guanina o hipoxantina y ribosa-1-fosfato en reacciones que contienen guanosina o inosina 100 μM y FAMIN recombinante o control de tampón en 100 μl después de 1 h a 37 °C ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2R muestra, en el panel superior, una reacción enzimática catalizada por FAMIN. En los paneles inferiores se muestran los niveles de adenina, 2'-desoxiinosina, hipoxantina y desoxirribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante o control de tampón con 2'-desoxiadenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2S muestra los niveles de adenina y desoxirribosa-1-fosfato después de la incubación de 10 μg de FAMIN recombinante o control de tampón con 5'-desoxiadenosina (5'dA) 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2T muestra los niveles de adenina y metiltiorribosa-1-fosfato tras la incubación de MTA 100 μM en PBS con FAMIN recombinante o control de tampón durante 1 h ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2U muestra los niveles de MTA después de la incubación de 0,1, 1,0, 10,0 o 100,0 μg de FAMIN recombinante con el banco metabólico completo (fase acuosa del extracto con metanol:cloroformo de células HepG2) en 100 μl de PBS ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 2V muestra otra reacción enzimática catalizada por FAMIN. Todos los datos del nivel de metabolitos en esta figura se miden como área bajo el pico cromatográfico, normalizados para el contenido total de iones. * $p < 0,05$ (prueba de la t de Student de dos colas, para datos independientes).

La figura 3 muestra las características enzimáticas de las dos variantes de FAMIN (FAMIN^{254I} y FAMIN^{254V}) que son habituales en seres humanos. La figura 3A muestra la cinética enzimática de Michaelis-Menten para actividades dependientes de FAMIN utilizando un intervalo de 500 nM a 100 μM de adenosina, inosina y MTA como sustrato. La actividad se mide como producción de inosina, hipoxantina y adenina después de la incubación con proteína durante 1 h a 37 °C a pH 7,4. La figura 3B muestra el consumo de adenosina y la figura 3C la producción de adenina, inosina y ribosa-1-fosfato tras la incubación de 10 μg de FAMIN^{254I} recombinante, FAMIN^{254V} o control de tampón con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de PBS. La figura 3D muestra los niveles de hipoxantina después de la incubación de 10 μg de FAMIN^{254I} recombinante o FAMIN^{254V} con adenosina 10 μM durante 1 h en 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) ($n = 3$ cada uno, media $\pm$ e.e.m.). La figura 3E muestra la conversión fraccionada de adenosina en adenina frente a inosina frente a hipoxantina después de la incubación de adenosina 10 μM con 10 μg de FAMIN^{254I} recombinante o FAMIN^{254V} durante 1 h en 100 μl de PBS. La figura 3F muestra los niveles de adenosina después de la incubación de 10 μg de FAMIN^{254I}, FAMIN^{254V} o control con adenina 50 μM y ribosa-1-fosfato 50 μM durante 1 h en 100 μl de PBS. La figura 3G muestra las

actividades EC 2.4.2.1 (purina nucleósido fosforilasa) y EC 2.4.2.28 (MTA fosforilasa) de FAMIN^{254I} y FAMIN^{254V} medidas por hipoxantina y adenina después de la incubación de proteína recombinante con inosina y metiltioadenosina (MTA) 10 µM, respectivamente, en PBS ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 3H muestra los niveles de inosina monofosfato (IMP), hipoxantina y guanina en células HEK293T 24 horas después de la transfección transitoria con plásmidos de FAMIN^{254I}, FAMIN^{254V}, FAMIN^{284R} o un vector vacío ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 3I muestra los niveles de adenosina, inosina y guanosina en células HEK293T 24 horas después de la transfección transitoria con plásmidos de FAMIN^{254I}, FAMIN^{254V}, FAMIN^{284R} o un vector vacío ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 3J muestra los niveles de IMP en células HepG2 control y silenciadas para FAMIN 24 h después de la transfección ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 3K muestra los niveles de inosina e hipoxantina en células HepG2 control y silenciadas para FAMIN 48 h después de la transfección ($n = 6$, media $\pm$ e.e.m.). $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$ (prueba de la t de Student de dos colas, para datos independientes). La figura 3L muestra los niveles de guanosina y S-metil-5'-tioadenosina en células HepG2 control y silenciadas para FAMIN 48 h después de la transfección ($n = 6$, media $\pm$ e.e.m.). $***p < 0,001$ (prueba de la t de Student de dos colas, para datos independientes).

La figura 4 muestra que FAMIN afecta los niveles de nucleobases de purina, nucleósidos, nucleótidos y cofactores en las células. La figura 4A muestra los niveles de adenina, adenosina y MTA en macrófagos M1 *Famin*^{p.254I}, *Famin*^{p.254V}, *Famin*^{p.284R} ($n = 12$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 4B muestra los niveles de inosina, hipoxantina, guanosina y guanina en macrófagos M1 *Famin*^{p.254I}, *Famin*^{p.254V}, *Famin*^{p.284R} ($n = 12$, media $\pm$ e.e.m.). La figura 4C muestra los niveles de 2'- y 5'-desoxiadenosina en macrófagos *Famin*^{p.254I}, *Famin*^{p.254V}, *Famin*^{p.284R} con o sin tratamiento con interferón- α ($n = 6$, media $\pm$ e.e.m.). $*p < 0,05$ (ANOVA; prueba de comparaciones múltiples de Tukey *a posteriori*). La figura 4D muestra los niveles de ATP, de FAD y la proporción de NAD⁺/NADH en macrófagos M1 *Famin*^{p.254I}, *Famin*^{p.254V}, *Famin*^{p.284R} ($n = 12$, media $\pm$ e.e.m.). El NAD⁺ y NADH se cuantifican cada uno como nivel relativo, de ahí la proporción relativa. La figura 4E muestra el árbol filogenético de los parálogos de FAMIN generado utilizando la base de datos HMMER utilizando la secuencia de proteína FAMIN humana como entrada de búsqueda. La figura 4F muestra las actividades EC 3.5.4.4 (adenosina desaminasa), EC 2.4.2.1 (purina nucleósido fosforilasa) y EC 2.4.2.28 (MTA fosforilasa) de FAMIN^{Δ176} y FAMIN recombinante de longitud completa expresadas en *E. coli* medidas por la producción de inosina, hipoxantina y adenina después de la incubación de proteínas con adenosina, inosina y MTA 10 µM, respectivamente, en PBS. La figura 4G muestra las actividades EC 3.5.4.4 (adenosina desaminasa) y EC 2.4.2.28 (MTA fosforilasa) de YImD (1T8H), YfiH (1Z9T) expresadas en *E. coli* medidas por la producción de inosina, adenina e hipoxantina, respectivamente, después de la incubación de adenosina o MTA 10 µM con 10 µg de proteínas recombinantes, como se indica, en PBS a 37 °C durante 1 h ($n = 3$, media $\pm$ e.e.m.).

La figura 5 muestra la modulación de la función enzimática DE FAMIN con moléculas pequeñas. La figura 5A muestra los niveles de inosina después de incubar 10 µg de FAMIN recombinante o control de tampón con adenosina 10 µM en PBS durante 1 hora a 37 °C en presencia o ausencia de pentostatina, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) y 8-aminoguanosina en las concentraciones indicadas. Las figuras 5B y 5C muestran niveles de adenina y ribosa-1-fosfato (R-1-P) en la reacción descrita en la figura 5A. La figura 5D muestra los niveles de hipoxantina después de incubar 10 µg de FAMIN recombinante o control de tampón con inosina 10 µM en PBS durante 1 h a 37 °C en presencia o ausencia de 8-aminoguanosina. La figura 5E muestra los niveles de R-1-P en la reacción descrita en la figura 5D.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Esta invención se refiere al hallazgo de que FAMIN (nexo inmunidad-metabolismo de ácidos grasos) tiene una actividad trifuncional de adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y metiltioadenosina fosforilasa. Además, se ha descubierto que la actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN incluye una actividad adenosina fosforilasa que es singular en los mamíferos. Los métodos de ensayo para determinar la actividad de la proteína FAMIN pueden comprender medir una o más de estas actividades. Los métodos de cribado de moduladores de la proteína FAMIN pueden comprender medir una o más de estas actividades en presencia y ausencia del compuesto de ensayo.

Una proteína FAMIN (nexo inmunidad-metabolismo de ácidos grasos) como se describe en el presente documento puede ser una proteína FAMIN eucariota, preferentemente una FAMIN de mamífero, tal como la FAMIN humana.

La FAMIN humana (también conocida como LACC1 o C13orf3; Gene ID: 144811) puede tener la secuencia de aminoácidos de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma y puede estar codificada por la secuencia de nucleótidos de NM_001128303.2 (SEQ ID NO: 2), NM_001350638.1, NM_001350639.1, NM_001350640.1, NM_001350641.1 o NM_001350642.1, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, una proteína FAMIN puede comprender los aminoácidos 176-430 (FAMIN^{Δ176}) de la FAMIN humana.

En algunas realizaciones, una proteína FAMIN puede comprender un residuo de Ile en una posición correspondiente a la posición 254 de la secuencia de aminoácidos de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, una proteína FAMIN puede comprender un residuo de Val en una posición correspondiente a la posición 254 de la

secuencia de aminoácidos de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1).

Una proteína FAMIN como se describe en el presente documento puede ser una proteína FAMIN procariota, preferentemente una FAMIN bacteriana. Las proteínas FAMIN bacterianas pueden incluir YImD (Uniprot P84138) de *Geobacillus stearothermophilus* y YfiH (Uniprot P33644) de *Escherichia coli* cepa K12.

Una proteína FAMIN como se describe en el presente documento puede comprender o consistir en un dominio DUF152 (Pfam02578, Cluster of Orthologous Group [COG, agrupamiento de grupos ortólogos] 1496). El dominio DUF152 de una proteína FAMIN se puede identificar usando técnicas de análisis de secuencia convencionales. Por ejemplo, el dominio DUF152 está ubicado en la porción C terminal (aminoácidos 176-430) de la FAMIN humana. El dominio DUF152 puede ser responsable de la actividad enzimática de la proteína FAMIN, y la secuencia del dominio DUF152 puede conservarse entre diferentes proteínas FAMIN.

Una variante de una proteína FAMIN o de una secuencia de nucleótidos puede compartir al menos un 50 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos de FAMIN de tipo salvaje, por ejemplo, la secuencia de FAMIN humana o FAMIN^{A176} tiene al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencia. Algunos variantes de secuencia de aminoácidos concretos pueden diferir de una secuencia de proteína FAMIN de tipo salvaje por la inserción, la adición, la sustitución o la delección de 1 aminoácido, de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más de 10 aminoácidos.

La identidad de secuencia se define habitualmente con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelerlys Inc, San Diego, EE.UU.). GAP utiliza el algoritmo Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos. En general, se usan los parámetros predeterminados, con una penalización por creación de huecos = 12 y una penalización de extensión de huecos = 4. Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, BLAST (que usa el método de Altschul *et al.* (1990), J. Mol. Biol., 215: 405-410), FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988), PNAS USA 85: 2444-2448), el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981), J. Mol Biol., 147: 195-197), el programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990), *supra*, o HMMER (SR Eddy. Current Opinion in Structural Biology, 6:361-365, 1996) que generalmente emplean los parámetros predeterminados. En concreto, se puede utilizar el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997), 25:3389-3402).

Las comparaciones de secuencias se realizan preferentemente en toda la longitud de la secuencia pertinente descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína FAMIN puede ser una proteína FAMIN aislada, por ejemplo, una proteína FAMIN recombinante.

Una proteína FAMIN aislada puede estar exenta o sustancialmente exenta de contaminantes o del material con el que está asociada naturalmente, tales como otros componentes de las células u orgánulos con los que se encuentra en su entorno natural, o el entorno en el que se prepara (por ejemplo, cultivo celular), cuando dicha preparación se realiza mediante tecnología de ADN recombinante *in vitro* o *in vivo*.

La proteína FAMIN como se describe en el presente documento puede proporcionarse usando técnicas sintéticas o recombinantes que son habituales en la técnica. Como alternativa, la proteína FAMIN endógena puede purificarse a partir de células.

Una proteína FAMIN recombinante se puede expresar en cuerpos de inclusión insolubles en un sistema de expresión procariota, tal *E. coli* y *Lactococcus lactis*. Después de la expresión, los cuerpos de inclusión pueden aislarse y solubilizarse con un desnaturalizante para generar la proteína FAMIN replegada en forma soluble. Como alternativa, se puede expresar una proteína FAMIN recombinante en un sistema de expresión eucariota. Las células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen células de mamífero, tales como células CHO y líneas celulares derivadas de CHO (células Lec), HeLa, COS, HEK293, HEK293T y HEK-EBNA, células de anfibios, tales como ovocitos de *Xenopus*, células de insecto, tales como *Tricoplusia ni*, Sf9 y Sf21 y células de levadura, tales como *Pichia pastoris*. En algunas realizaciones preferidas, la proteína FAMIN recombinante puede expresarse en una línea celular de mamífero, tal como HEK293T.

Las técnicas recombinantes para la expresión de proteínas son habituales en la técnica. La proteína FAMIN puede acoplarse a un péptido líder señal para dirigir la secreción del polipéptido de fusión desde una célula eucariota al medio de cultivo. En la técnica se conoce una diversidad de péptidos líder señal adecuados. El péptido líder señal puede ser una secuencia señal FAMIN o puede ser heteróloga a la proteína FAMIN, es decir, puede ser una secuencia señal no FAMIN. Por ejemplo, se puede emplear una señal de secreción de factor α o una secuencia señal BiP. Preferentemente, el péptido señal se elimina mediante procesamiento postraduccional después de la expresión de la proteína FAMIN.

La proteína FAMIN expresada puede aislarse y/o purificarse, después de la producción. Esto se puede lograr con

cualquier método conveniente conocido en la técnica. En la técnica se conocen bien técnicas para la purificación de polipéptidos recombinantes e incluyen, por ejemplo, HPLC, FPLC, cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, la proteína FAMIN expresada puede purificarse parcialmente antes de su uso en un método de ensayo descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína FAMIN se puede producir en forma de una proteína de fusión que comprende además un marcador de afinidad, que puede, por ejemplo, ser útil para la purificación. Un marcador de afinidad es una secuencia peptídica heteróloga que forma un miembro de una pareja de unión específica. Los polipéptidos que contienen el marcador pueden purificarse mediante la unión del otro miembro de la pareja de unión específica al polipéptido, por ejemplo, en una columna de afinidad. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede formar un epítipo que se une a una molécula de anticuerpo. Los marcadores de afinidad adecuados son bien conocidos en la técnica y se analizan en Terpe (2003), Appl. Microbiol. Biotechnol., 60: 523-533. La secuencia del marcador de afinidad se puede separar de la proteína FAMIN después de la purificación, por ejemplo, utilizando una proteasa específica de sitio.

En algunas realizaciones preferidas, la proteína FAMIN humana recombinante con un marcador de afinidad puede expresarse en células de mamíferos, tales como células HEK293T, y luego se purifican mediante cromatografía de afinidad seguida de cromatografía de escisión del marcador y exclusión por tamaño.

En otras realizaciones, la proteína FAMIN puede estar comprendida dentro de un extracto celular. La actividad adenosina fosforilasa, que es exclusiva de FAMIN en células de mamíferos, puede determinarse en el extracto celular. Otras actividades purina nucleósido fosforilasa, así como la actividad adenosina desaminasa y metiltioadenosina fosforilasa, se puede determinar en el extracto celular con respecto a un extracto celular de control y/o en presencia de inhibición selectiva de otras enzimas celulares con la actividad determinada, tal como adenosina desaminasa (ADA), metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) y purina nucleósido fosforilasa (PNP).

Se puede obtener un extracto celular de control a partir de una célula en la que se inactiva FAMIN. La FAMIN puede inactivarse en una célula de control mediante cualquier medio conveniente, tal como el silenciamiento de ARN mediante transfección de ARNi o genosupresión. En otras realizaciones, se puede obtener un extracto celular de control a partir de una célula que expresa un mutante FAMIN-I254V. La actividad adenosina fosforilasa del mutante FAMIN-I254V se inactiva selectivamente, y un extracto celular de control que comprende el mutante FAMIN-I254V puede ser útil para cribar compuestos que tengan selectividad relativa por la actividad adenosina fosforilasa.

Una, dos o las tres actividades adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y/o metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN aislada pueden determinarse. En algunas realizaciones, estas actividades podrán determinarse individualmente, por ejemplo, para cribar inhibidores selectivos de una actividad individual.

La actividad adenosina desaminasa de FAMIN convierte los nucleósidos de adenosina en nucleósidos de inosina (EC3.5.4.4). La actividad de desaminación de adenosina puede determinarse mediante:

poner en contacto la proteína FAMIN con un nucleósido de adenosina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de adenosina, nucleósido de inosina o NH_3 en la solución de reacción, tras dicho contacto.

El agotamiento del nucleósido de adenosina o la generación de NH_3 o nucleósido de inosina en la solución de reacción es indicativo de la actividad de desaminación de adenosina de la proteína FAMIN. La cantidad de disminución en la concentración de nucleósido de adenosina o aumento en la concentración de nucleósido de inosina en la solución de reacción o la cantidad de NH_3 generada puede ser indicativa de la cantidad de actividad de desaminación de adenosina en la solución de reacción. El agotamiento del nucleósido de adenosina o la generación de NH_3 o el nucleósido de inosina en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada.

Un nucleósido de adenosina puede incluir adenosina o un análogo o derivado de la misma. Un nucleósido de inosina puede incluir inosina o un análogo o derivado de la misma.

En algunas realizaciones, el nucleósido de adenosina es adenosina (PubChem CID 60961) y el nucleósido de inosina es inosina (CID 6021). En otras realizaciones, el nucleósido de adenosina es desoxiadenosina y el nucleósido de inosina es desoxiinosina. Por ejemplo, el nucleósido de adenosina puede ser 2'-desoxiadenosina (CID 13730) y el nucleósido de inosina puede ser 2'-desoxiinosina (CID 65058) o el nucleósido de adenosina puede ser 5'-desoxiadenosina (CID 439182) y el nucleósido de inosina puede ser 5'-desoxiinosina (CID 14693755).

La actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN convierte los nucleósidos de purina en nucleobases de purina y moléculas de ribosa-1-fosfato en presencia de fosfato (por ejemplo, ortofosfato PO_4^{3-}). Por ejemplo, los nucleósidos de inosina se pueden convertir en hipoxantina y α -D-ribosa-1-fosfato (EC2.4.2.1) y los nucleósidos de guanosina se pueden convertir en guanina y α -D-ribosa-1-fosfato (EC2.4.2.15) mediante la proteína FAMIN. Además, los nucleósidos de adenosina pueden ser convertidos por una proteína FAMIN en adenina y α -D-ribosa-1-fosfato

(EC2.4.2.1 KEGG R01561; adenosina: fosfato α -D-ribosiltransferasa; también conocida como adenosina fosforilasa) por la proteína FAMIN. La reacción es reversible y la actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN también puede convertir una nucleobase de purina y una molécula de ribosa-1-fosfato en un nucleósido de purina y fosfato.

- 5 La actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN se puede determinar midiendo la conversión del nucleósido de purina y el fosfato en una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato; o una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en un nucleósido de purina y fosfato en presencia de la proteína FAMIN.

En algunas realizaciones, la actividad purina nucleósido fosforilasa puede determinarse mediante:

- 10 poner en contacto la proteína FAMIN con un nucleósido de purina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de purina; o nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

- 15 La proteína FAMIN puede ponerse en contacto con el nucleósido de purina en presencia de fosfato inorgánico. Por ejemplo, la solución de reacción puede comprender solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, se puede determinar la cantidad de fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

- 20 El agotamiento del nucleósido de purina y/o fosfato o la generación de la nucleobase de purina y/o molécula de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativo de la actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN. La cantidad o velocidad de disminución en la concentración de nucleósido de purina o aumento en la concentración de nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativa de la cantidad de actividad purina nucleósido fosforilasa en la solución de reacción. El agotamiento del nucleósido de purina o la generación de la nucleobase de purina y/o la molécula de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada.

En algunas realizaciones, la actividad purina nucleósido fosforilasa puede determinarse mediante:

- 30 poner en contacto la proteína FAMIN con una nucleobase de purina y una molécula de ribosa-1-fosfato en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de purina y/o fosfato; o nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

- 35 El agotamiento de la nucleobase de purina y/o la molécula de ribosa-1-fosfato o la generación del nucleósido de purina en la solución de reacción por la proteína FAMIN es indicativo de la actividad purina nucleósido fosforilasa. La cantidad o velocidad de disminución en la concentración de nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato o aumento en la concentración de nucleósido de purina en la solución de reacción puede ser indicativo de la cantidad de actividad purina nucleósido fosforilasa en la solución de reacción. El agotamiento de la nucleobase de purina y/o la molécula de ribosa-1-fosfato o la generación del nucleósido de purina en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada.

Un nucleósido de purina puede incluir una molécula de guanosina, adenosina e inosina, o análogos o derivados de las mismas. Un nucleósido de inosina puede incluir inosina, desoxiinosina, o análogos o derivados de la misma.

- 45 En algunas realizaciones, la proteína FAMIN puede ponerse en contacto con múltiples nucleósidos de purina o nucleobases de purina diferentes, ya sea simultáneamente o en serie, y se puede determinar el agotamiento de los múltiples nucleósidos de purina o nucleobases de purina y/o la generación de múltiples productos de reacción.

- 50 En algunas realizaciones, el nucleósido de purina es una molécula de inosina. Por ejemplo, el nucleósido de purina puede ser inosina (CID 6021), la nucleobase de purina puede ser hipoxantina (CID 790) y la molécula de ribosa-1-fosfato puede ser α -D-ribosa-1-fosfato (CID 439236). Como alternativa, el nucleósido de purina puede ser desoxiinosina; la nucleobase de purina puede ser hipoxantina y la molécula de ribosa-1-fosfato puede ser 2'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato (CID 439287).

- 55 En otras realizaciones, el nucleósido de purina es guanosina (CID 6802), la nucleobase de purina es guanina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato. En otras realizaciones, el nucleósido de purina es adenosina (CID 60961), la nucleobase de purina es adenina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato.

- 60 La actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN puede convertir la adenosina en adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato (es decir, actividad adenosina fosforilasa). Por lo tanto, una proteína FAMIN puede convertir adenosina en inosina a través de su actividad adenosina desaminasa, o adenina a través de su actividad adenosina fosforilasa. La inosina puede ser convertida en hipoxantina por la proteína FAMIN, como se ha descrito anteriormente.

La actividad adenosina fosforilasa puede determinarse mediante:

- 65 poner en contacto la proteína FAMIN con adenosina en una solución de reacción; y

determinar la cantidad de adenosina o la cantidad de adenina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

La proteína FAMIN puede ponerse en contacto con la adenosina en presencia de fosfato inorgánico. Por ejemplo, la solución de reacción puede comprender solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, se puede determinar la cantidad o tasa de fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto. El agotamiento de adenosina y/o fosfato o la generación de adenina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción por la proteína FAMIN es indicativo de la actividad adenosina fosforilasa. Por ejemplo, una disminución en la concentración de adenosina o un aumento en la concentración de adenina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción puede ser indicativo de actividad.

En algunas realizaciones, el agotamiento de adenosina y/o fosfato o la generación de adenina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada. En otras realizaciones, el agotamiento de la molécula de adenina y/o ribosa-1-fosfato o la generación de adenosina y/o fosfato en la solución de reacción puede determinarse en presencia de la proteína FAMIN de tipo salvaje con respecto al mutante FAMIN-I254V, que tiene actividad adenosina fosforilasa selectivamente alterada.

En algunas realizaciones, la actividad adenosina fosforilasa puede determinarse mediante:

poner en contacto la proteína FAMIN con adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato en una solución de reacción; y determinar la cantidad de adenosina y/o fosfato; o adenina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

El agotamiento de adenina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato o la generación de adenosina y/o fosfato en la solución de reacción por la proteína FAMIN es indicativo de la actividad adenosina fosforilasa. La cantidad o velocidad de disminución en la concentración de adenina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato o aumento en la concentración de adenosina y/o fosfato en la solución de reacción puede ser indicativa de la cantidad de actividad adenosina fosforilasa en la solución de reacción.

En algunas realizaciones, el agotamiento de adenina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato o la generación de adenosina y/o fosfato en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada. En otras realizaciones, el agotamiento de la molécula de adenina y/o ribosa-1-fosfato o la generación de adenosina y/o fosfato en la solución de reacción puede determinarse en presencia de la proteína FAMIN de tipo salvaje con respecto al mutante FAMIN-I254V, que tiene actividad adenosina fosforilasa selectivamente alterada.

La actividad metiltioadenosina fosforilasa convierte los nucleósidos de metiltioadenosina en nucleobases de adenina y moléculas de S-metil-5'-tiiorribosa-1-fosfato (es decir, metiltiiorribosa-1-fosfato). Un nucleósido de metiltioadenosina puede incluir S-metil-5'-tioadenosina (es decir, 5-metiltioadenosina) y análogos o derivados de la misma. Una nucleobase de adenina puede incluir adenina y análogos o derivados de la misma. Una molécula de metiltiiorribosa-1-fosfato puede incluir S-metil-5-tio- α -D-ribosa-1-fosfato y análogos o derivados del mismo. Por ejemplo, la 5-metiltioadenosina (CID 149) se puede convertir en adenina (CID 190) y S-metil-5-tio- α -D-ribosa-1-fosfato (CID 45266677) (EC2.4.2.28). La reacción es reversible y la actividad metiltioadenosina fosforilasa también puede convertir las nucleobases de adenina y las moléculas de metiltiiorribosa-1-fosfato en nucleósidos de metiltioadenosina.

En algunas realizaciones, la actividad metiltioadenosina fosforilasa puede determinarse mediante:

poner en contacto la proteína FAMIN con un nucleósido de metiltioadenosina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de metiltioadenosina; o nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

La proteína FAMIN puede ponerse en contacto con el nucleósido de metiltioadenosina en presencia de fosfato inorgánico. Por ejemplo, la solución de reacción puede comprender solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, se puede determinar la cantidad de fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

El agotamiento del nucleósido de metiltioadenosina o la generación de la nucleobase de adenina y/o la molécula de metiltiiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción por parte de la proteína FAMIN es indicativo de la actividad metiltioadenosina fosforilasa. Por ejemplo, la cantidad de disminución en la concentración de nucleósido de metiltioadenosina o aumento en la concentración de nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativa de la cantidad de actividad metiltioadenosina fosforilasa en la solución de reacción. El agotamiento del nucleósido de metiltioadenosina o la generación de la nucleobase de adenina y/o la molécula de metiltiiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada.

Las actividades adenosina desaminasa y purina nucleósido fosforilasa de FAMIN en combinación pueden convertir los nucleósidos de adenosina en hipoxantina y una molécula de ribosa-1-fosfato.

La actividad adenosina desaminasa y purina nucleósido fosforilasa puede determinarse mediante:

- 5 poner en contacto la proteína FAMIN con un nucleósido de adenosina en una solución de reacción; y
determinar la cantidad de nucleósido de adenosina o hipoxantina y/o molécula de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

10 La proteína FAMIN puede ponerse en contacto con el nucleósido de adenosina en presencia de fosfato inorgánico (por ejemplo, ortofosfato). Por ejemplo, la solución de reacción puede comprender solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, se puede determinar la cantidad de fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto.

15 El agotamiento del nucleósido de adenosina o la generación de hipoxantina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción por la proteína FAMIN es indicativo de la actividad combinada de desaminación de adenosina y purina nucleósido fosforilasa. Por ejemplo, una disminución en la concentración de nucleósido de adenosina o un aumento en la concentración de hipoxantina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativo de la actividad combinada. El agotamiento del nucleósido de adenosina o la generación de hipoxantina y/o ribosa-1-fosfato en la solución de reacción se puede determinar en presencia, con respecto a la ausencia, de la proteína FAMIN aislada.

20 En algunas realizaciones, el nucleósido de adenosina es adenosina y la ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato. En otras realizaciones, el nucleósido de adenosina es desoxiadenosina y la ribosa-1-fosfato es desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato. Por ejemplo, el nucleósido de adenosina puede ser 2'-desoxiadenosina y la ribosa-1-fosfato puede ser 2'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato o la 5'-desoxiadenosina y la ribosa-1-fosfato pueden ser 5'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato.

25 En algunas realizaciones, la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de una proteína FAMIN aislada se puede determinar en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Una disminución de la actividad en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo es un inhibidor de FAMIN. Esto puede ser útil para cribar compuestos que inhiben FAMIN como se describe a continuación.

30 En algunas realizaciones, los reactivos en las reacciones descritas en el presente documento pueden ser moléculas aisladas. Las moléculas reactivas adecuadas pueden sintetizarse usando técnicas convencionales u obtenerse de proveedores comerciales (por ejemplo, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). En otras realizaciones, los reactivos en las reacciones descritas en el presente documento pueden estar dentro de un extracto celular, por ejemplo, un extracto en fase acuosa de metabolitos celulares (como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1A-1F). Los extractos celulares adecuados pueden estar desprovistos de proteínas y pueden incluir, por ejemplo, extractos acuosos obtenidos mediante extracción de Folch (Folch *et al.*, J. Biol. Chem., 1957, 226-497). Un extracto acuoso de reactivos puede liofilizarse y resuspenderse en solución salina tamponada con fosfato.

40 Las reacciones se pueden realizar en una solución de reacción que comprende fosfato inorgánico (P_i). Por ejemplo, se puede utilizar un tampón que contiene fosfato, tal como PBS. La solución de reacción puede estar desprovista de cofactores o reactivos distintos del fosfato inorgánico.

45 Las reacciones pueden realizarse a cualquier temperatura conveniente, por ejemplo, de 32 °C a 42 °C, tal como 37 °C.

Las reacciones pueden realizarse a cualquier pH conveniente, por ejemplo, pH 7-8, tal como pH 7,4.

50 El agotamiento de un sustrato o la generación de un producto en las reacciones de adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y/o metiltioadenosina fosforilasa descritas en el presente documento pueden determinarse mediante cualquier técnica conveniente. Las técnicas adecuadas incluyen, por ejemplo, absorbancia, espectrometría de masas acoplada a cromatografía (por ejemplo, LC-MS/MS) o RMN. En algunas realizaciones preferidas, los reactivos o la generación de productos en la solución de reacción se pueden medir mediante LC-MS/MS.

55 En algunas realizaciones, el agotamiento de un sustrato o la generación de un producto en una reacción de adenosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa y/o metiltioadenosina fosforilasa mediadas por FAMIN descritas en el presente documento se puede determinar midiendo la absorbancia. Los sustratos y productos descritos anteriormente pueden presentar diferentes espectros de absorbancia y los cambios en la absorbancia en una o más longitudes de onda seleccionadas en la solución de reacción pueden ser indicativos del agotamiento de un sustrato o la generación de un producto.

60 En algunas realizaciones, el agotamiento de un sustrato o la generación de producto en una reacción mediada por FAMIN descrita en el presente documento se puede determinar usando un análogo sustituido del sustrato o producto que muestra propiedades espectrofotométricas características, de modo que la concentración del análogo en la solución de reacción pueda medirse directamente.

En algunas realizaciones, un sustrato puede estar marcado con un marcador detectable. La conversión del sustrato en productos mediante la proteína FAMIN como se describe en el presente documento puede liberar el marcador detectable, que luego puede medirse por cualquier medio conveniente.

- 5 En algunas realizaciones, el agotamiento del sustrato o la generación de producto se puede determinar usando una reacción de detección que genera un compuesto detectable en presencia del reaccionante o producto. Por ejemplo, el agotamiento o la generación de xantina se puede determinar utilizando xantina oxidasa que genera H_2O_2 , que puede ser detectado por reactivos de detección, tales como reactivos de luminiscencia o fluorescencia. La reacción de detección puede acoplarse con la reacción mediada por FAMIN. Por ejemplo, tanto FAMIN como la xantina oxidasa
10 pueden estar presentes en la solución de reacción. Como alternativa, la reacción de detección se puede realizar después de la reacción mediada por FAMIN.

Como alternativa, el agotamiento o la generación de fosfato inorgánico se puede determinar utilizando purina nucleósido fosforilasa (PNP). Los métodos y kits de ensayo adecuados son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado (por ejemplo, EnzChek® kit de ensayo de fosfato, ThermoFisher Scientific). Por ejemplo, el fosfato inorgánico en la solución de reacción se puede determinar mediante la conversión del ribósido de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina (MESG) en ribosa 1-fosfato y el producto de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina, que se puede detectar mediante un desplazamiento espectrofotométrico en la absorbancia máxima de 330 nm (sustrato) a 360 nm (producto).
20

Los métodos para medir la actividad FAMIN como se describe en el presente documento pueden ser útiles para cribar compuestos que modulen, por ejemplo, estimular o inhibir, la actividad FAMIN.

- 25 En algunas realizaciones, el cribado se puede realizar utilizando una proteína FAMIN aislada. Por ejemplo, un método de cribado de un compuesto que module la actividad de una proteína FAMIN puede comprender:

determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de una proteína FAMIN aislada en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo.

- 30 Una diferencia en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN que se mide en presencia del compuesto de ensayo, con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo, puede ser indicativa de que el compuesto de ensayo modula la actividad de la proteína FAMIN.

- 35 Una disminución en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo es un inhibidor o antagonista de FAMIN.

- 40 Un aumento en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo es un potenciador o agonista de FAMIN.

La actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de una proteína FAMIN aislada se puede determinar como se ha descrito anteriormente.

- 45 Un aumento o disminución en uno o más de (i) la conversión de una molécula de adenosina en una molécula de inosina, (ii) la conversión de un nucleósido de purina en una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN, (iii) la conversión de una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en un nucleósido de purina, (iv) la conversión de adenosina en adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN, (v) la conversión de adenina y una molécula de ribosa-1-fosfato en adenosina, (vi) la conversión de metiltioadenosina en adenina y una molécula de S-metil-5'-tiiorribosa-1-fosfato, o (vii) la conversión de adenina y una molécula de S-metil-5'-tiiorribosa-1-fosfato en metiltioadenosina; por la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativo de que el compuesto de ensayo es un potenciador o inhibidor de FAMIN, respectivamente.
50

55 Los expertos en la técnica pueden variar el formato preciso de cualquiera de los métodos de cribado o ensayo de la presente invención utilizando habilidades y conocimientos ordinarios. El experto en la materia es muy consciente de la necesidad de emplear experimentos de control apropiados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de los compuestos anteriores también se puede determinar en un control en el que FAMIN está inactivada.

- 60 Un compuesto de ensayo puede ser una molécula aislada o puede estar comprendido en una muestra, una mezcla o un extracto, por ejemplo, una muestra biológica. Los compuestos que pueden cribarse utilizando los métodos descritos en el presente documento pueden ser compuestos químicos naturales o sintéticos utilizados en programas de cribado de fármacos. También pueden utilizarse extractos de plantas, microbios u otros organismos, que contengan varios
65 componentes caracterizados o no caracterizados.

La tecnología de los bancos combinatorios proporciona una forma eficiente de ensayar una cantidad potencialmente enorme de compuestos diferentes para determinar su capacidad para modular la actividad FAMIN. Dichos bancos y su uso son conocidos en la técnica, para todo tipo de productos naturales, moléculas pequeñas y péptidos, entre otros. En determinadas circunstancias puede preferirse el uso de bancos de péptidos.

La cantidad de compuesto de ensayo que se puede añadir a un ensayo de la invención normalmente se determinará mediante prueba y error en función del tipo de compuesto utilizado. Habitualmente, se pueden usar concentraciones de aproximadamente 0,001 nM a 1 mM o más de compuesto inhibidor putativo, por ejemplo, de 0,01 nM a 100 μ M, por ejemplo, de 0,1 a 50 μ M, tal como aproximadamente 10 μ M. Incluso un compuesto que tenga un efecto débil puede ser un compuesto líder útil para futuras investigaciones y desarrollos.

Los compuestos de ensayo adecuados para el cribado incluyen compuestos que inhiben actividades similares a la adenosina desaminasa, a la purina nucleósido fosforilasa y a la metiltioadenosina fosforilasa de FAMIN. Los compuestos de ensayo adecuados incluyen inhibidores de ADA, tales como 3'-desoxi-N-(1-oxododecil)adenosina, pentostatina (PubchemID 439693, CAS ID 53910-25-1) y EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (PubchemID 3206, CAS ID 59262-86-1) (ver, por ejemplo, Chauhan y Kumar (2015), Med. Chem. Res., 24:2259); inhibidores de PNP, tales como 8-aminoguanosina (PubchemID 96849; CAS ID 180288-69-1) (véase, por ejemplo, Bzowska *et al.* (2000), Pharmacol. Therap., 88:349); inhibidores de MTAP, tales como MT-ImmA y MT-DADMe-ImmA (MTDIA) (véase, por ejemplo, Firestone *et al.* (2017), ACS Chem. Biol., 12:464); y nucleósidos de purina.

Los compuestos de ensayo adecuados también incluyen análogos, derivados, variantes y miméticos de cualquiera de los compuestos enumerados anteriormente, por ejemplo, compuestos producidos mediante el diseño racional de fármacos para proporcionar compuestos candidatos de ensayo con una forma molecular concreta, unas características de tamaño y de carga adecuadas para modular la actividad FAMIN.

Se puede investigar más a fondo un compuesto de ensayo identificado como modulador de la actividad FAMIN. Por ejemplo, la selectividad de un compuesto por FAMIN puede determinarse mediante cribado frente a otras enzimas ADA, PNP o MTAP aisladas. Los métodos adecuados para determinar el efecto de un compuesto sobre la actividad de enzimas recombinantes son bien conocidos en la técnica.

Un compuesto de ensayo identificado como modulador de la actividad FAMIN puede aislarse y/o purificarse o, como alternativa, se puede sintetizar usando técnicas convencionales de expresión recombinante o síntesis química. Además, puede fabricarse y/o utilizarse en la preparación, es decir, la fabricación o la formulación, de una composición, tal como un medicamento, una composición farmacéutica o un fármaco. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender, por tanto, formular el compuesto de ensayo en una composición farmacéutica con un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable para la aplicación terapéutica.

Tras la identificación de un compuesto que modula la actividad FAMIN como se describe en el presente documento, un método puede comprender además modificar el compuesto para optimizar sus propiedades farmacéuticas. En la técnica son muy conocidos los métodos de optimización adecuados, por ejemplo, mediante modelado estructural.

Luego se puede llevar a cabo una optimización o modificación adicional para obtener uno o más compuestos finales para el ensayo *in vivo* o clínico.

Otros aspectos y realizaciones de la invención proporcionan los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" reemplazada por la expresión "que consiste en" y los aspectos y realizaciones descritos anteriormente con la expresión "que comprende" reemplazada por la expresión "que consiste fundamentalmente en".

Cuando se usa en el presente documento, "y/o" debe interpretarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados, con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" ha de interpretarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno de ellos se estableciera individualmente en el presente documento.

Parte experimental

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares HepG2 (ATCC HB-8065) y HEK293T (ATCC CRL-3216) se mantuvieron en DMEM completo con FBS al 10 %. La secuenciación de Sanger del gen *FAMIN* identificó la línea celular HepG2 como heterocigota en SNP rs3764147, que codifica FAMIN (p.254I/p.254V). Los experimentos de silenciamiento se llevaron a cabo mediante transfección inversa con el reactivo Lipofectamine RNAiMAX y 25 nM de ARN de interferencia pequeño (ARNip) de acuerdo con las pautas del fabricante. Las células HepG2 se silenciaron utilizando ARNip (tecnología SMART pool; Dharmacon) contra FAMIN humana (LACC1; M-015653-00). La eficacia del silenciamiento se verificó mediante qPCR y se confirmó que la expresión génica se redujo en al menos un 80 % a las 48 horas después de la transfección. Se

usó ARNip no dirigido (Dharmacon) como control negativo.

Extracción de metabolitos acuosos y lipídicos

- 5 Las células se recogieron como se indica mediante extracción directa con metanol:agua 4:1 o tripsina-EDTA (al 0,25 %). Para la extracción directa con metanol, las células se lavaron con PBS, seguido de la adición de 500 µl de metanol:agua 4:1 previamente enfriado. Se rasparon las células y la mezcla de metanol resultante se transfirió a tubos con tapa de rosca de fondo plano de 2 ml. Luego se agitaron las muestras, se sonicaron y finalmente se centrifugaron a 21 000 g durante 10 minutos para sedimentar los restos. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos de 2 ml para el secado como se describe a continuación. Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC o superior y se obtuvieron de Honeywell (Fisher Scientific). Los sedimentos celulares recolectados mediante tripsinización se lavaron con PBS y luego se sometieron a extracción utilizando el método de metanol:cloroformo descrito por Folch (5). Resumiendo, se añadió una bola de acero inoxidable (Qiagen) a cada sedimento celular lavado en hielo seco junto con 1 ml de cloroformo:metanol 2:1 helado dentro de un tubo con tapa de rosca de fondo plano de 2 ml (Starlab). Las muestras se homogeneizaron utilizando un Tissue Lyser (Qiagen) durante 10 minutos a 25 Hz para garantizar una extracción óptima y la congelación de las placas del lisado de tejido antes de la homogeneización para mantener las muestras frías durante la extracción. Se añadieron 400 µl de agua helada y las muestras se agitaron en vórtice y se sonicaron durante 5 minutos antes de la centrifugación a 21 000 g durante 5 minutos. Después de la centrifugación, las fracciones acuosa (capa superior) y orgánica (capa inferior) se separaron y se dividieron en partes alícuotas en tubos con tapa de rosca separados, ambos mantenidos en hielo seco. Se añadió 1 ml más de cloroformo:metanol 2:1 al tubo original que contenía el sedimento de proteína y se repitió la extracción como se ha descrito anteriormente. Las capas resultantes se reunieron, se secaron (como se describe a continuación) y se almacenaron a -20 °C antes de su posterior preparación y análisis.

25 *Preparación de la muestra para LC-MS*

- Se liofilizaron extractos acuosos de células o mezclas de reacción de proteínas usando un evaporador centrífugo (Labconco) y se reconstituyeron en 100 µl (para extractos celulares) y 200 µl (para mezclas de reacción de proteínas) de acetonitrilo:carbonato de amonio acuoso 0,1 M 70:30 que contenía [¹³C₁₀,¹⁵N₅] monofosfato de adenosina, trifosfato de adenosina [¹³C₁₀,¹⁵N₅], ácido succínico ¹³C₁₀ y ácido glutámico [¹³C₅,¹⁵N₅] 2 µM (todos de Sigma Aldrich excepto el ácido glutámico de Cambridge Isotope Laboratories) como patrones internos, aunque cabe señalar que, para los experimentos que utilizaron sustratos marcados, se omitieron los patrones internos para evitar la contaminación de los metabolitos. La solución resultante se agitó en vórtice y luego se sonicó durante 15 minutos, seguido de una centrifugación a 21 000 g para sedimentar cualquier material restante sin disolver. Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió con una pipeta automática a un vial de 300 µl con inserto (Fisher Scientific) y se tapó, estando listo para el análisis.

Análisis de LC-MS de metabolitos acuosos

- 40 Para el análisis no específico, se utilizó un espectrómetro de masas Orbitrap Velos Pro Elite acoplado a un sistema de cromatografía U3000 o un Orbitrap Q Exactive Plus acoplado a un sistema de cromatografía líquida de rendimiento ultraalto Vanquish Horizon. Para el análisis específico, las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolo de triple etapa Quantiva acoplado a un Vanquish Horizon (todas las combinaciones de instrumentos analíticos suministradas por Thermo Fisher Scientific).
- 45 Luego, las muestras se analizaron utilizando un enfoque de cromatografía líquida de interacción hidrófila ("hydrophilic interaction liquid chromatography", HILIC) de amida híbrida de etileno con puente ("bridged ethylene hybrid", BEH) para los metabolitos acuosos altamente polares. Para este análisis, la fase móvil fuerte (A) fue carbonato de amonio 100 mM, la fase móvil débil fue acetonitrilo (B), utilizándose agua:acetonitrilo 9:1 para el lavado de la aguja. La columna LC utilizada fue la columna de amida BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters). Se utilizó el siguiente gradiente lineal: A al 20 % en acetonitrilo durante 1,5 min, seguido de un aumento hasta A al 60 % durante 2,5 min con 1 min más de A al 60 %, después de lo cual la columna se reequilibró durante 1,9 min. Después de cada serie cromatográfica, la columna se lavó con 30 volúmenes de columna de agua:acetonitrilo 6:4, seguido de 10 volúmenes de columna adicionales de acetonitrilo:agua 95:5 para el almacenamiento. El tiempo total de la serie fue de 7 min, el caudal fue de 0,6 ml / min y el volumen de inyección fue de 5 µl. Para resolver las pentosa fosfatos para la identificación de ribosa-1-fosfato, se empleó un gradiente menos profundo: A del 30 % en acetonitrilo durante 2,0 minutos, seguido de un aumento hasta A al 50 % durante 3,0 minutos, con reequilibrio durante 1,9 minutos. Después del análisis HILIC, las muestras se secaron y reconstituyeron en el mismo volumen de acetato de amonio 10 mM antes del análisis en modo mixto ortogonal utilizando una columna ACE Excel C18-PFP (150 x 2,1 mm, 2,0 µm, Hichrom). La fase móvil A consistía en agua con ácido fórmico al 0,1 % y la fase móvil B era acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %. Para la elución en gradiente, la fase móvil B se mantuvo al 0 % durante 1,6 min. seguido de un gradiente lineal hasta B al 30 % durante 4,0 minutos, un aumento adicional al 90 % durante 1 min y un mantenimiento en B al 90 % durante 1 min, con reequilibrio durante 1,5 minutos, dando un tiempo total de la serie de 6,5 minutos. El caudal fue de 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 2 µl. El lavado de la aguja utilizado fue agua:acetonitrilo 4:1 con ácido fórmico al 0,1 %.
- 65 Ambos modos de cromatografía se utilizaron para análisis específicos y no específicos. Para los ensayos cinéticos enzimáticos se utilizó un enfoque cromatográfico adicional para permitir el análisis de todos los sustratos y productos

mediante un único ensayo. Se utilizó una columna Waters BEH C8 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm) con una fase móvil débil (A) de acetato de amonio acuoso 10 mM con amoniaco al 0,1 % y una fase móvil fuerte (B) de acetonitrilo. Para la elución en gradiente, la fase móvil B se mantuvo al 0 % durante 1,6 min, seguido de un gradiente lineal hasta B al 30 % durante 4,0 minutos, un aumento adicional al 90 % durante 1 min y un mantenimiento en B al 90 % durante 1 min, con reequilibrio durante 1,5 minutos, dando un tiempo total de la serie de 6,5 minutos. El caudal fue de 0,5 ml/min y el volumen de inyección fue de 2 µl. El lavado de la aguja utilizado fue agua:acetonitrilo 4:1.

El análisis no específico en Elite utilizó un escaneo completo FTMS de alta resolución de 60-1500 *m/z* con una resolución de 60 000 ppm donde, debido a los tiempos de equilibrio del modo positivo al modo negativo, cada modo se ejecutó de forma independiente. Los parámetros de origen utilizados para el Orbitrap fueron una temperatura del vaporizador de 400 °C y una temperatura del tubo de transferencia de iones de 300 °C, un voltaje de nebulización de iones de 3,5 kV (2,5 kV para el modo de iones negativos) y un gas de la camisa, un gas auxiliar y un gas de barrido de 55, 15 y 3 unidades arbitrarias, respectivamente, con una lente S de RF (radiofrecuencia) del 60 %. Para los análisis no específicos que emplean Q Exactive Plus, se utilizó un escaneo completo de 60-900 *m/z* a una resolución de 70 000 ppm, donde los ensayos de modo de iones positivos y negativos se ejecutaron por separado para maximizar los puntos de datos a través de un pico en la resolución elegida. Los parámetros de origen eran los mismos que los utilizados para Elite. Para el análisis de especies de CoA utilizando la metodología de espectrometría de masas original Q Exactive Orbitrap, se empleó una metodología en la que el intervalo de masas de escaneo completo se redujo a 800-1000 *m/z*, la temperatura capilar se incrementó a 350 °C y la lente S de RF al 100 %.

El análisis específico en Quantiva utilizó el seguimiento de reacción seleccionada (SRM) que emplea un conmutación rápida de polaridad con transiciones de masa y parámetros dependientes del compuesto (voltaje de energía de colisión y voltaje de lente de RF) determinados en la infusión de patrones de 1 µM a un caudal de 10 µl/min en acetonitrilo:agua 4:1 con ácido acético al 0,1 %. Los parámetros de origen utilizados fueron una temperatura del vaporizador de 440 °C y una temperatura del tubo de transferencia de iones de 362 °C, un voltaje de nebulización de iones de 3,5 kV (2,5 kV para el modo de iones negativos) y un gas de la camisa, un gas auxiliar y un gas de barrido de 54, 17 y 2 unidades arbitrarias, respectivamente.

Procesamiento de los datos de LC-MS

Los datos fueron adquiridos, procesados e integrados utilizando Xcalibur (versión 3.0, Thermo Fisher Scientific) y Compound Discoverer (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific). Para el análisis no específico, los metabolitos de interés se identificaron utilizando unos valores de *m/z* de alta resolución especificados en la base de datos METLIN (Scripps Research Institute) correspondientes a sus aductos de iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ en modos de ionización positiva o negativa, respectivamente. El tiempo de retención del compuesto y el patrón de fragmentación se validaron frente a patrones externos conocidos. Las áreas de los picos correspondientes a los niveles de metabolitos se cuantificaron manualmente y se normalizaron al patrón interno o el contenido de iones total (según correspondiera) y se presentaron como áreas relativas. Todos los datos de la muestra se procesaron utilizando Compound Discoverer (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific) para calcular con precisión el contenido total de iones para la normalización.

Para el análisis multivariante, los datos se procesaron utilizando Compound Discoverer (versión 2.1, Thermo Fisher Scientific) para determinar compuestos putativos con abundancia diferencial entre grupos de muestras. Para cada característica diferencial de MS, los picos del cromatograma se verificaron manualmente utilizando Xcalibur (versión 3.0, Thermo Fisher Scientific). Los valores precisos de *m/z* se compararon con la base de datos METLIN (Scripps Research Institute), incluidos los aductos de iones $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ para el modo positivo, y $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ para el modo negativo con una tolerancia de masa de 2 ppm. Luego se utilizó una combinación de perfil de fragmentación de MS/MS, cálculo de fórmulas moleculares basado en el patrón de isótopos y el comportamiento químico cromatográfico esperado para atribuir la identidad del metabolito. En caso de ambigüedad, y para todos los productos y sustratos de FAMIN propuestos, se utilizaron patrones externos para confirmar la identificación del metabolito. Se combinaron los datos de los modos de ionización positiva y negativa y se eliminaron las identidades de metabolitos duplicados. Los datos se normalizaron al contenido total de iones y al cambio en n.º de veces representado gráficamente como gráficos de volcán. Los niveles de metabolitos entre los grupos se compararon utilizando una prueba de la *t* de Student de dos colas, para datos independientes.

Reactivos

Se usaron los siguientes reactivos: M-CSF (Peprotech, 300-25), LPS (de *E. coli* K12, InvivoGen, tlr1-pek1ps), IFN-α de ratón recombinante (BIO-RAD, PMP29Z), IFN-γ murino (Peprotech, 315-05), adenosina (Sigma Aldrich, A9251), inosina (Sigma Aldrich, I4125), hipoxantina (Sigma Aldrich, H9377), metiltioadenosina (Sigma Aldrich, D5011), S-adenosilmetionina (Sigma Aldrich, A7007), S-adenosilhomocisteína (Sigma Aldrich, A9384), citidina (Sigma Aldrich, C122106), uridina (Sigma Aldrich, U3750), xantosina (Sigma Aldrich, X0750), 2'-desoxiadenosina (Sigma Aldrich, D7400), 5'-desoxiadenosina (Sigma Aldrich, D1771), colesterol oxidasa (Sigma Aldrich, C8649), ¹³C₁₀, ¹⁵N₅-adenosina (Cambridge Isotope Laboratories), ¹⁵N₅-adenina (Cambridge Isotope Laboratories) para experimentos de rastreo isotópico; todos los patrones para la validación de la identificación de compuestos por espectrometría de masas se adquirieron a través de Sigma Aldrich.

Plásmidos

Se utilizó un vector pESG-IBA105 (IBA Life Sciences 5-4505-001) para la expresión en mamíferos de FAMIN^{254I}, permitiendo la expresión de una proteína recombinante que contiene un marcador Strep gemelo en el extremo N bajo los elementos potenciadores y promotores de CMV. La secuencia del ADN de *FAMIN* humana se amplificó con ADN polimerasa Phusion (NEB M0530) de un clon IMAGE (MHS1010-7508636) usando un cebador directo que contiene una secuencia líder con un sitio de localización *Esp3I*, seguido de la secuencia de escisión de TEV y un cebador inverso que contenía un sitio de localización *Esp3I*. El producto de PCR purificado se digirió con *Esp3I* (NEB R0734) y se verificó en gel de agarosa al 1 %. Luego, el amplicón purificado en gel se clonó en pESG-IBA105 digerido con *Esp3I* con ADN ligasa T4 (NEB M0202). El plásmido ligado se verificó mediante secuenciación de Sanger, con una construcción final que consiste, desde los extremos 5' a 3', en una secuencia Kozak justo cadena arriba del codón de inicio del marcador Strep gemelo, seguido de un conector corto y una secuencia de motivo de escisión de TEV y la secuencia *FAMIN* humana. Se adaptó un protocolo similar para las construcciones de YfiH y YlmD, utilizando el vector plasmídico pPSG-IBA105 (IBA Life Sciences 5-4305-001) que permite la expresión de una proteína recombinante que contiene un marcador Strep gemelo en el extremo N-terminal bajo el promotor constitutivo T7. Las secuencias de ADN de *yfiH* y *ylmD* fueron sintetizadas a medida por Origene y se optimizaron los codones para la expresión procariota, con sitios diana de *Esp3I* que flanquean la secuencia y el motivo de escisión de TEV inmediatamente cadena arriba del gen. A continuación, las secuencias de *yfiH* y *ylmD* digeridas con *Esp3I* se clonaron en pPSG-IBA105 digerido con *Esp3I* con ADN ligasa T4 (NEB). Posteriormente se realizó una mutagénesis dirigida a sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Q5 (NEB E0554), siguiendo las instrucciones del fabricante, para generar FAMIN^{254V} para la expresión en procariotas como en mamíferos. Todas las construcciones generadas fueron verificadas mediante secuenciación de Sanger.

Expresión y purificación de la proteína

Se transfectaron células HEK293T con un complejo de PEI-ADN que contenía plásmidos para la expresión en mamíferos de FAMIN marcada con Strep. Después de 48 a 72 horas, las células transfectadas se recogieron y se resuspendieron en un tampón de suspensión previamente enfriado sin detergente (NaCl 100 mM, HEPES 20 mM, TCEP 5 mM y glicerol al 10 %, pH 8,0) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini sin EDTA (Sigma 11836170001). Después de la sonicación y aclaramiento por centrifugación a 30 000 rpm, los lisados se cargaron en una columna Streptactin XT Superflow (IBA Life Sciences 2-4012-001) preequilibrada con 2 volúmenes de columna de tampón de lisis. Luego se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampones de lavado y la proteína marcada con Strep se eluyó de la columna con 6 volúmenes de columna de biotina 50 mM. Luego, la proteína recombinante purificada se incubó con proteasa TEV marcada con 6xHis en el extremo N-terminal (proteasa Sigma TEV) en una proporción de 10:1, según lo determinado mediante cuantificación con A280 utilizando el espectrofotómetro NanoDrop. La mezcla se incubó durante la noche a 4 °C. Luego se eliminó la proteasa TEV haciendo pasar la mezcla a través de una columna Ni-NTA Superflow de 1 ml (IBA Life Sciences 2-3206-025), después de preequilibrar la columna con el tampón de proteínas. La proteasa TEV se une a la columna, y la proteína recombinante se recogió en la corriente. Se recogió la corriente que constituye la proteína recombinante sin marcador. Luego se concentró con un filtro de columna de 10 kDa (Amicon) y se purificó aún más mediante exclusión por tamaño usando una columna de aumento AKTA Superdex 200 (10/300) (GE Life Sciences), seguido de un lavado abundante. Las fracciones eluidas correspondientes a picos positivos en el cromatograma se confirmaron con Coomassie SDS-PAGE.

Para la expresión procariota, se transformaron T7 Express lysY/lq Alta competencia *E. coli* (NEB C3013) con plásmidos que contenían la secuencia de ADN de la proteína recombinante. Se inocularon colonias frescas (menos de 2 semanas después del cultivo en placas) en un caldo LB suplementado con glucosa al 0,5 % y se cultivaron a 30 °C en una incubadora con agitación. Al alcanzar la DO600 de 0,4-0,7, se indujo la expresión de proteínas con 0,3 mM de IPTG. Después de 4 a 6 horas, el cultivo bacteriano se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis hipotónico previamente enfriado (NaCl 20 mM, HEPES 20 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0) suplementado con inhibidores de proteasa. Después de la sonicación, los lisados se aclararon mediante centrifugación a 30 000 rpm durante 15 minutos y se trataron con 5 µg/ml de ADNasa I (Sigma) y 10 µg/ml de ARNasa A (Sigma) durante 15 minutos en hielo. Las etapas posteriores de purificación de proteínas fueron similares a las empleadas anteriormente en el sistema de expresión en mamíferos.

Ensayos enzimáticos

Se investigó la supuesta función enzimática de FAMIN recombinante human marcada con Strep frente a extractos acuosos del metabolito de HepG2 (secado, extraído con Folch de 5 x 10⁶ células) o sustratos de nucleósidos en las concentraciones indicadas y se detectan usando HPLC-MS como se ha descrito anteriormente. A menos que se indique lo contrario en las leyendas de las figuras, para todos los ensayos se utilizó la proteína expresada en células HEK293T. La mezcla de reacción (volumen final de 100 µl) consistió en 10 µg de proteína recombinante y sustrato de nucleósidos 10 µM en PBS de Dulbecco (Thermo Fisher), pH 7,4, a menos que se indique lo contrario. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego se inactivaron con x5 volúmenes de metanol helado. Las muestras se centrifugaron a 21 000 g durante 5 minutos, se transfirieron a tubos nuevos y luego se secaron antes del análisis como se ha descrito anteriormente.

Ratones

Se utilizaron ratones de 6 a 10 semanas de edad para todos los experimentos y se agruparon en función de la edad y sexo para los experimentos individuales. Los ratones *Famin*^{+/+}, *Famin*^{-/-}, *Famin*^{p.254I}, *Famin*^{p.254V} y *Famin*^{p.284R} han sido descritos previamente (1). Los ratones fueron criados y mantenidos en condiciones específicas sin patógenos en las instalaciones de los Servicios Biomédicos Centrales, Universidad de Cambridge. Todos los procedimientos realizados se realizaron de acuerdo con la ética local y la aprobación del Ministerio del Interior del Reino Unido.

Aislamiento de macrófagos derivados de médula ósea murina

Se prepararon macrófagos derivados de la médula ósea ("bone marrow derived macrophages", BMDM) lavando fémures y tibias de ratón con PBS. Las células se filtraron a través de un colador de células de 70 µm y se resuspendieron en medio RPMI-1640 completo (que contenía 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, tampón HEPES 1 mM y FBS al 10 %). Para generar los BMDM, las células se cultivaron durante 6 días en medio completo que contenía 100 ng/ml de M-CSF y se intercambiaron el medio después de 3 días. Se recolectaron los macrófagos, se sembraron y se polarizaron durante 24 h hacia M1Φ con IFN-γ (50 ng/ml) más LPS (20 ng/ml). Como se ha indicado, se añadió IFNα recombinante a BMDM indiferenciados a 500 UI/ml durante 16 h antes de la extracción directa con metanol.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos usando GraphPad prism 6,0 o, como se describe en los métodos de análisis LC-MS, Compound Discoverer (Thermo Scientific). Salvo que se especifique lo contrario, la significación estadística se calculó según corresponda utilizando la prueba de la *t* de Student de dos colas para datos independientes como se describe en las leyendas de las figuras. Los datos se representan como la media y el error estándar de la media (E.E.M.). Se consideró significativo un valor *p* de <0,05.

Resultados

Los inventores plantearon la hipótesis de que FAMIN es una enzima e idearon un cribado imparcial de la actividad frente a un extenso banco de metabolitos sin supuestos *a priori* sobre la función putativa. Optimizaron una estrategia para la producción a gran escala de FAMIN humana recombinante altamente purificada a partir de células HEK293T transfectadas transitoriamente, utilizando la purificación por afinidad con un marcador Strep, la cromatografía de exclusión por tamaño y escisión de marcadores mediada por la proteasa TEV. La proteína FAMIN resultante presentó propiedades estables en solución coherentes con el plegamiento correcto y la ausencia de agregación. Para generar un banco metabólico adecuado de sustratos y cofactores potenciales, se ensayó una diversidad de líneas celulares para determinar la funcionalidad FAMIN. La línea celular de carcinoma hepatocelular humano HepG2 sufrió detención del crecimiento después de la transfección con ARNip *FAMIN*, lo cual se hizo evidente después de 72 h. Las células HepG2 también mostraron glucólisis reducida y fosforilación oxidativa 48 h después de la transfección con ARNip *FAMIN*, similar a lo observado en macrófagos (1). Esto indicó que FAMIN está activa y desempeña un papel no redundante en las células HepG2, y, por lo tanto, podría esperarse razonablemente que contenga todos los cofactores y sustratos necesarios para la función FAMIN.

Se adoptó una metodología de espectrometría de masas y cromatografía líquida ortogonal de alta sensibilidad y alta resolución (LC-MS) cuantitativa a medida para capturar y resolver con precisión una amplia gama de metabolitos químicamente muy diversos en extractos acuosos de células HepG2 silenciadas para *FAMIN*. Se identificaron más de 25 000 características de LC-MS distintivas en extractos liofilizados en las diferentes modalidades de cromatografía y modos de ionización (figura 1A) y se planteó la hipótesis de que una o más de ellas podrían corresponder a sustratos de FAMIN. Se incubaron 10 µg de FAMIN humana recombinante, o un volumen equivalente de control de tampón de proteínas, con el banco de metabolitos resuspendido en un volumen de reacción final de 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, durante 1 h a 37 °C. Después de inactivar la reacción, las muestras se volvieron a extraer y solo 3 y 4 compuestos dentro del banco disminuyeron y aumentaron de modo significativo, respectivamente, en la reacción con FAMIN, en comparación con la reacción simulada (figura 1B, 1C).

A continuación, se intentó dilucidar las identidades de estos sustratos y productos candidatos. Se realizaron búsquedas en la base de datos METLIN, con los valores de *m/z* {A: 268,104, B: 269,089, C: 284,099 en ESI positivo} de las 3 características de LC-MS dentro del banco cribado cuyos niveles se redujeron en presencia de FAMIN recombinante (figura 1B, 1C). Curiosamente, los tres supuestos sustratos, A-C, coincidían exactamente con nucleósidos de purina y no se pudieron hacer concordar con ningún otro compuesto. La determinación de la fórmula molecular, utilizando la masa precisa y respaldada por la distribución de masa isotópica, también indicó que los compuestos A-C eran nucleósidos de purina. Sin embargo, los valores de *m/z* y las fórmulas moleculares por sí solas no podían discriminar su identidad. El compuesto A, con la fórmula C₁₀H₁₃N₅O₄, podría corresponder a adenosina o desoxiguanosina. Al comparar las características cromatográficas de los metabolitos candidatos A-C con los patrones de nucleósidos, se demostró que los tiempos de retención coincidían exactamente con la adenosina, la guanosina y la inosina (figura 1D, 1E), lo que sugiere que FAMIN era una enzima que cataboliza los principales nucleósidos de purina celulares (figura 1F, G). De acuerdo con esto, los valores de *m/z* de las características de LC-MS, D-F (figura 1B, 1C), cuyos niveles

aumentaron tras la reacción con FAMIN recombinante {137,046, 152,057 en ESI positivo y 229,012 en ESI negativo} coincidieron con las nucleobases de purina hipoxantina, guanina y una pentosa-fosfato, respectivamente (figura 1F, 1G). La otra característica de LC-MS, G, con un valor de m/z {153,041 en ESI positivo} que también se incrementó en el cribado correspondió a la nucleobase de purina xantina, aunque sus niveles absolutos eran extremadamente bajos.

La cromatografía modificada permitió una separación fiel de los compuestos isoméricos de pentosa-fosfato e identificó el compuesto E como ribosa-1-fosfato (figura 1H). La FAMIN no afectó a ningún otro nucleósido o nucleótido, por ejemplo, ATP, ni a metabolitos de pirimidina, tales como citidina o uridina, que también estaban presentes en el banco metabolómico de los inventores (figura 1I). Además, el consumo de adenosina, inosina y guanosina aumentó con la cantidad de FAMIN recombinante presente en la reacción (figura 1I, 1J). En conjunto, esto sugirió que FAMIN puede ser una enzima que actúa sobre los nucleósidos de purina para generar nucleobases de purina y ribosa-1-fosfato.

Para validar inequívocamente los resultados desde el cribado del banco, se examinó la actividad enzimática en un sistema totalmente reduccionista utilizando un sustrato puro, ensayado con FAMIN recombinante en PBS a pH 7,4 y 37 °C. La FAMIN consumió adenosina y generó inosina, hipoxantina y ribosa-1-fosfato, lo que fue confirmado por patrones auténticos (figura 2A, B, C, D, E, F). No se observó degradación espontánea de adenosina ni formación de productos en ausencia de FAMIN o adenosina (figura 2A, B), ni cantidades equimolares de una enzima no relacionada, la colesterol oxidasa, generaron inosina, hipoxantina o ribosa-1-fosfato (figura 2G). Dado que los métodos de los inventores de LC ortogonal (HILIC y C18-PFP) no resolvieron bien la adenosina y la adenina, y la adenosina sufre una fragmentación de la fuente a adenina, se incluyeron más métodos de cromatografía para separar con fidelidad estos dos metabolitos. Esto demostró que FAMIN también convertía la adenosina en adenina (figura 2H). La cuantificación indicó que aproximadamente el 85 % de la adenosina consumida fue convertida por FAMIN en adenina y aproximadamente el 15 % en inosina (figura 2I). Las actividades catalizadas por FAMIN se confirmaron además mediante el seguimiento de isótopos estables derivados de [$^{15}\text{N}_5$, $^{13}\text{C}_{10}$] adenosina para producir los productos de reacción (figura 2J). La incubación de FAMIN recombinante con adenina y ribosa-1-fosfato produjo adenosina, lo que demuestra que la reacción también puede funcionar a la inversa, corroborando así también las identidades de los productos de la reacción directa enzimática (figura 2K). La FAMIN no produjo ningún otro producto detectable a partir de la adenosina, y la desnaturalización por calor dejó la proteína completamente inactiva (figura 2L). De acuerdo con que FAMIN utiliza el ortofosfato inorgánico (P_i) presente en PBS para generar ribosa-1-fosfato, la reacción enzimática avanzó solo hasta inosina, sin producir adenina ni ribosa-1-fosfato cuando se realizó en tampón HEPES en lugar de PBS (figura 2L). Se concluyó que FAMIN presenta dos actividades enzimáticas distintas como adenosina desaminasa (EC 3.5.4.4) y purina nucleósido fosforilasa (EC 2.4.2.1), y que las reacciones pueden realizarse de forma independiente entre sí (figura 2M).

A continuación, se investigó el espectro de actividad de FAMIN con sustratos de purina puros. La FAMIN metabolizó inosina y guanosina puras, también identificadas en el cribado del banco, en ribosa-1-fosfato y sus respectivas nucleobases, hipoxantina y guanina (figura 2N, 2O, 2P, 2Q), lo que es coherente con la actividad purina nucleósido fosforilasa. No se detectó actividad hacia la pirimidina citidina (figura 2N). La FAMIN también metabolizó la 2'-desoxiadenosina, produciendo adenina, 2'-desoxiinosina, hipoxantina y 2'-desoxirribosa-1-fosfato (figura 2N, 2R). La 5'-desoxiadenosina, un subproducto de radicales de las enzimas de S-adenosilmetionina (SAM) (7), también fue un sustrato de FAMIN (figura 2S). La FAMIN metabolizó aún más la S-metil-5'-tioadenosina (MTA), aunque no SAM (figura 2N). La MTA no se convirtió en S-metil-5'-tioinosina e hipoxantina como se podría predecir a partir de la actividad secuencial de adenosina desaminasa y purina nucleósido fosforilasa, sino en adenina y S-metil-5'-tiirribosa-1-fosfato (figura 2O, 2T). Al revisar datos del cribado del banco, en efecto se observó una reducción del 50 % de MTA en comparación con el valor inicial cuando estaban presentes 100 μg de FAMIN en el volumen de reacción de 100 μl (figura 2U). De ahí que se sume una tercera actividad de FAMIN como S-metil-5'-tioadenosina fosforilasa, CE 2.4.2.28 (figura 2V).

La K_m aparente de la adenosina para la actividad desaminasa de FAMIN fue de 11 μM , mientras que sus actividades fosforilasa mostraron unos valores de K_m para la adenosina, la inosina y la MTA de 36 μM , 41 μM y 1 μM , respectivamente (figura 3A). A continuación se abordó cómo la sustitución I254V, asociada con el riesgo de EC y lepra, afecta a la actividad de FAMIN. Se compararon la FAMIN^{254I} recombinante y la "variante de riesgo" FAMIN^{254V} con respecto a su actividad metabolizante de adenosina. En comparación con FAMIN^{254I}, el consumo de adenosina se redujo aproximadamente a la mitad con FAMIN^{254V} (figura 3B). La conversión a adenina fue 10 veces menor con FAMIN^{254V} en comparación con FAMIN^{254I} (figura 3C). En cambio, la producción de inosina e hipoxantina por FAMIN^{254V} era ligeramente superior y similar, respectivamente, en comparación con FAMIN^{254I} (figura 3C, 3D). La generación de ribosa-1-fosfato se redujo en aproximadamente 10 veces con FAMIN^{254V} en comparación con FAMIN^{254I} (figura 3C), lo que corresponde por lo tanto a la reducción en la conversión a adenina. De ese modo, FAMIN^{254V} se diferencia notablemente de FAMIN^{254I} en cómo metaboliza la adenosina, convirtiéndose sólo aproximadamente el 20 %, en lugar del 85 %, de la adenosina consumida en adenina, en lugar de desviarse a la inosina y de allí a hipoxantina (figura 3E). De acuerdo con la reacción directa, FAMIN^{254V} generó 10 veces menos adenosina a partir de adenina y ribosa-1-fosfato en comparación con FAMIN^{254I} (figura 3F). La FAMIN^{254V} también presentó actividades fosforilasa reducidas hacia inosina y MTA, ya que la generación de hipoxantina a partir de inosina fue aproximadamente un 50 % menor, y la de adenina de MTA aproximadamente un 25 % menos en comparación con FAMIN^{254I} (figura 3G). Resumiendo, entre las funciones enzimáticas de FAMIN, su actividad adenosina fosforilasa fue la más atenuada en la variante FAMIN^{254V}, mientras que la actividad adenosina desaminasa parece intacta.

Luego se estudió si FAMIN afecta los niveles celulares de los metabolitos de purina. La transfección transitoria del ADNc de FAMIN en células HEK293T da como resultado una expresión de proteínas igualmente alta de FAMIN^{254I} y FAMIN^{254V} y sólo una baja expresión de FAMIN^{284R} (1). Veinticuatro horas después de la transfección con el plásmido de FAMIN^{254I}, los niveles celulares de hipoxantina aumentaron en un 50 % (figura 3H). La hipoxantina aumentó modestamente con FAMIN^{254V} y permaneció inalterada en FAMIN^{284R} en comparación con los transfectantes de control (figura 3H). Los niveles de guanina celular estaban elevados en células HEK293T transfectadas con FAMIN^{254I} (figura 3H), mientras que los niveles totales de nucleósidos de purina no se vieron afectados por la expresión de ninguno de los plásmidos de FAMIN (figura 3I). Por otra parte, la transfección con FAMIN^{254I} o FAMIN^{254V} duplicó los niveles celulares de inosina monofosfato (IMP) (figura 3H). La IMP está en el punto en que se juntan el rescate de purinas y la síntesis *de novo* y el intermedio obligatorio de ambos (8). A la inversa del aumento tras la sobreexpresión, los niveles de IMP celular se redujeron a la mitad en células HepG2 24 h después de la transfección con ARNip *FAMIN* (figura 3J), que fue uno de los pocos cambios en los niveles de metabolitos observados tan temprano. Un silenciamiento agudo de *FAMIN* en las células HepG2 también redujo los niveles de hipoxantina, al mismo tiempo que se aumentaron los niveles de inosina, guanosina y MTA (figura 3K, 3L). Esto demostró que FAMIN refuerza la generación de nucleobases para el rescate de nucleótidos de purina y confirmó que las actividades establecidas con proteína recombinante pura son fisiológicamente importantes.

Luego se recurrió a macrófagos derivados de médula ósea (BM, "bone marrow") murinos terminalmente diferenciados, que, a diferencia de las células HepG2 en proliferación, solo emplean el rescate de nucleótidos de purina, sin apenas síntesis *de novo*. La edición génica de variantes polimórficas de *FAMIN* humana en el genoma murino habían establecido que, en comparación con FAMIN^{254I} (*Famin*^{p.254I}), la actividad FAMIN reducida (*Famin*^{p.254V}) o ausente (*Famin*^{p.284R} o *Famin*^{-/-}) en los macrófagos provoca un deterioro progresivo en la producción de especies reactivas de oxígeno ("reactive oxygen species", ROS), actividad bactericida, activación del inflammasoma y secreción de citocinas. Esto estuvo relacionado con la disminución de la lipogénesis *de novo*, la fosforilación oxidativa, la glucólisis aeróbica y los niveles de adenosina trifosfato (ATP) (1). Por lo tanto, fue interesante observar que los niveles celulares de adenosina, adenina y MTA fueron más bajos en *Famin*^{p.284R}, intermedio en *Famin*^{p.254V}, y más altos en macrófagos derivados de la médula ósea activados clásicamente con *Famin*^{p.254I} (figura 4A). En cambio, los niveles celulares de inosina, hipoxantina, guanosina y guanina fueron comparables entre genotipos (figura 4B). Los niveles de 5'-desoxiadenosina, inducida por interferón- α (9), no fueron significativamente diferentes entre los genotipos de *Famin*, mientras que los niveles de 2'-desoxiadenosina fueron mayores en *Famin*^{p.254I} y *Famin*^{p.254V} en comparación con células *Famin*^{p.284R} (figura 4C). Aunque los niveles totales de metabolitos celulares pueden subestimar procesos altamente compartimentados, tales como los que se producen cuando FAMIN se localiza en la superficie citoplasmática de los peroxisomas (1, 10), estos datos demostraron que FAMIN estimula el metabolismo del adenilo en macrófagos.

Se ha considerado que las células eucariotas carecen de una actividad que convierta fosforolíticamente la adenosina o la 2'-desoxiadenosina en adenina y ribosa-fosfato (11-13). La FAMIN añade dicha actividad y además combina, en una sola actividad, actividades enzimáticas que son fundamentales y no redundantes para el rescate de nucleótidos de purina. Se pensaba que estaban codificados por genes individuales que se expresan de forma ubicua: adenosina desaminasa (*ADA*; la *ADA2* secretada se expresa a partir de un gen distinto), purina nucleósido fosforilasa (*PNP*) y S-metil-5'-tiadenosina fosforilasa (*MTAP*) (14, 15). La K_m aparente notificada de estas enzimas para sus sustratos primarios está dentro de la misma gama que FAMIN, de hecho, las de FAMIN son ligeramente inferiores (16-18). Los principales nucleósidos de purina, adenosina, inosina y guanosina, y sus nucleobases, adenina, hipoxantina y guanina, no son precursores ni intermedios de la síntesis *de novo* de purina, pero son generados por las reacciones que suministran el rescate de nucleótidos de purina (8). El rescate de nucleótidos de purina avanza desde las nucleobases a través de la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT) y la adenina fosforribosil transferasa (APRT), y la adenosina es el único nucleósido que además puede rescatarse directamente a través de la adenosina quinasa (ADK). 8). Los inventores demostraron que la trifuncionalidad de FAMIN expande el metabolismo central de las purinas y agrega una capa completamente nueva de interconectividad. Esto se asocia con un aumento gradual del ATP celular total, FAD y la proporción relativa de NAD/NADH por pérdida de función de *Famin*^{p.284R} a través de los genotipos hipomórficos de *Famin*^{p.254V} a *Famin*^{p.254I} (figura 4D).

Por último, se investigó si la trifuncionalidad de FAMIN en el metabolismo de las purinas se conserva evolutivamente. La porción C-terminal de FAMIN presenta homología estructural con las proteínas del agrupamiento de grupos ortólogos (COG) 1496 que contienen el motivo Pfam, el dominio de función desconocida ("adenosina desaminasa", DUF) 152, con parálogos ampliamente distribuidos entre especies (figura 4E). Un *E. coli* expresó una proteína de fusión de la proteína de unión a maltosa ("maltose binding protein", MBP) de FAMIN truncada, que contiene únicamente el dominio de homología DUF152 (FAMIN¹⁷⁶, aminoácidos 176-430), y presentó las tres actividades enzimáticas, lo que es similar a FAMIN de longitud completa marcado con MBP (figura 4F). Esto demostró que la región de homología DUF152 contiene toda la actividad enzimática. De acuerdo con esto, las proteínas bacterianas de COG1496 marcadas con Strep expresadas recombinantemente YlmD (Uniprot P84138; de *Geobacillus stearothermophilus*) y YfiH (Uniprot P33644; de *Escherichia coli*, cepa K12) metabolizan la adenosina a inosina y adenina, la MTA a adenina, y la inosina a hipoxantina (figura 4G). Las estructuras de YlmD (código de registro 1T8H del Protein Data Bank [PDB]) e YfiH (PDB 1Z9T) y otras proteínas bacterianas de COG1496 contienen al menos una coordinación de iones Zn²⁺, al igual que las citosina y citidina desaminasas (24). FAMIN, YlmD e YfiH contienen una tríada conservada de cisteína-histidina-histidina, que, en la estructura de YfiH, coordina un ion cinc. De manera

notable, los sitios activos de las purina y pirimidina amidohidrolasas, incluida la citosina desaminasa, ADA y ureasa, contienen un ion cinc (25-27), que a menudo está coordinado por una combinación de cadenas laterales de histidina y cisteína. Sin embargo, los plegamientos globales de estas enzimas son diferentes de YImD e YfiH. En cuanto al contexto en el genoma, *yfiH* está flanqueado en *E. coli* y *S. flexneri* por *clpB* y *rluD*, que codifican una subunidad de adenosina trifosfatasa de una chaperona y una pseudouridina sintasa ribosómica, respectivamente (24). Los inventores concluyeron que FAMIN es, de hecho, un prototipo de una nueva clase de enzimas metabolizadoras de nucleósidos de purina "todo en uno" trifuncionales que se han conservado desde las bacterias hasta el ser humano.

Anteriormente, se creía que MTAP era la única vía de generación de adenina y del metabolismo de MTA (8, 28), y ADA y ADK las únicas vías de conversión de adenosina (8, 19). Asociada con los peroxisomas, FAMIN puede actuar sobre un conjunto de nucleósidos de purina que son parcial o completamente distintos a los nucleósidos sobre los que actúan ADA, PNP y MTAP. Las mutaciones en *ADA* y *PNP* causar inmunodeficiencia combinada grave ("severe combined immunodeficiency", SCID) (29-31). *MTAP* está delecionado con frecuencia en los cánceres, lo que explica su metabolismo alterado de la metionina (32-35). La disminución o pérdida completa de la función FAMIN, en cambio, se presenta con enfermedades autoinflamatorias. Si bien la expresión de FAMIN es mayor en los macrófagos, está presente en varios otros tipos de células, pero no en los linfocitos T y B que se ven afectados en la SCID. Por lo tanto, FAMIN puede remodelar los conceptos del metabolismo de las purinas en el organismo, además de los de la función inmunitaria.

Resumiendo, FAMIN añade una nueva y sorprendente capa al metabolismo central del adenilo, un antiguo circuito metabólico altamente interconectado y delicadamente sintonizado que tiene a la adenosina y a la adenina en su centro y suministra grupos adenilo para cofactores que están involucrados de manera crucial en todos los procesos metabólicos.

Aplicando los métodos descritos en el presente documento, se identificaron la pentostatina (PubchemID 439693, CAS ID 53910-25-1) y la eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA; Pubchem ID 3206, CAS ID 59262-86-1) como inhibidores de FAMIN (figura 5A). De manera específica, la pentostatina y la EHNA inhibieron la actividad adenosina desaminasa de FAMIN (figura 5A), dejando intacta la actividad adenosina fosforilasa de FAMIN (figura 5B, C). La 8-aminoguanosina (PubchemID 96849, CAS ID 3868-32-4) inhibió la actividad purina nucleósido fosforilasa de FAMIN, como lo demuestra la generación reducida de hipoxantina y ribosa-1-fosfato (R-1-P) a partir de inosina (figura 5D, E). De forma importante, la 8-aminoguanosina no afectó a la actividad adenosina fosforilasa de FAMIN, como lo demuestra la generación no alterada de adenina y R-1-P a partir de adenosina (figura 5C, D). Esto demuestra que las actividades individuales de FAMIN pueden abordarse selectivamente con moduladores de moléculas pequeñas.

Referencias

1. M. Z. Cader *et al.*, Nat. Immunol., 17, 1046 (2016).
2. L. A. O'Neill, E. J. Pearce, J. Exp. Med., 213, 15 (2016).
3. G. A. Prosser, G. Larrouy-Maumus, L. P. de Carvalho, EMBO reports, 15, 657 (2014).
4. S. Zhao *et al.*, Nature, 502, 698 (2013).
5. J. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).
6. V. Gorshkov *et al.*, J. Basic Microbiol., 57, 998 (2017).
7. B.J. Landgraf, E. L. McCarthy, S. J. Booker, Annu. Rev. Biochem., 85, 485 (2016).
8. M. Camici, S. Allegrini, M. G. Tozzi, FEBS J., (2018).
9. A. S. Gizzi *et al.*, Nature, 558, 610 (2018).
10. G. Assadi *et al.*, PloS one, 11, e0168276 (2016).
11. M. Friedkin, H. M. Kalckar, en The Enzymes, P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, eds. (Academic Press, Nueva York, 1961), vol. 5, pág. 245.
12. T. P. Zimmerman, N. B. Gersten, A. F. Ross, R. P. Miech, Can. J. Biochem., 49, 1050 (1971).
13. J. T. Maynes *et al.*, Biochem. J., 344, pt. 2, 585 (1999).
14. A. W. Murray, Annu. Rev. Biochem., 40, 811 (1971).
15. H. Ashihara, C. Stasolla, T. Fujimura, A. Crozier, Phytochemistry, 147, 89 (2018).
16. E. R. Lindley, R. L. Pisoni, Biochem. J., 290 (pt. 2), 457 (1993).
17. A. Bzowska, E. Kulikowska, D. Shugar, Pharmacol. Ther., 88, 349 (2000).
18. F. Della Ragione *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 223, 514 (1996).

19. D. Boison, *Pharmacol. Rev.*, 65, 906 (2013).
20. M. Camici, M. Garcia-Gil, M. G. Tozzi, *International journal of molecular sciences*, 19, (2018).
21. A. Belouqui *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281, 22933 (2006).
22. A. I. Cañas, S. Camarero, *Biotechnol., Adv.*, 28, 694 (2010).
23. V. Perna, J. W. Agger, J. Holck, A. S. Meyer, *Scientific reports*, 8, 8114 (2018).
24. Y. Kim *et al.*, *Proteins*, 63, 1097 (2006).
25. L. Holm, C. Sander, *Proteins*, 28, 72 (1997).
26. D. K. Wilson, F. B. Rudolph, F. A. Quijcho, *Science*, 252, 1278 (1991).
27. E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, *Science*, 268, 998 (1995).
28. E. Albers, *IUBMB life*, 61, 1132 (2009).
29. K. L. Bradford, F. A. Moretti, D. A. Carbonaro-Sarracino, H. B. Gaspar, D. B. Kohn, *J. Clin. Immunol.*, 37, 626 (2017).
30. E. R. Giblett, A. J. Ammann, D. W. Wara, R. Sandman, L. K. Diamond, *Lancet*, 1, 1010 (1975).
31. E. R. Giblett, J. E. Anderson, F. Cohen, B. Pollara, H. J. Meuwissen, *Lancet*, 2, 1067 (1972).
32. G. V. Kryukov *et al.*, *Science*, 351, 1214 (2016).
33. K. J. Mavrikis *et al.*, *Science*, 351, 1208 (2016).
34. T. Nobori *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6203 (1996).
35. Z. H. Chen, H. Zhang, T. M. Savarese, *Cancer Res.*, 56, 1083 (1996).

Secuencias

```

1 maeavlidl f glklnsqknc hqtlkltna vqyhhaakak flcimccsni syerdgeqdn
61 ceietsngls alleefeivs cpsmaatlyt ikqkideknl ssikvivprh rktlmkafid
121 qlftdvynfe fedlqvtrfg glfkqsiein vitaqelrgi qneietflrs lpalrgklti
181 itsslipdif ihgfttrtgg isyiptlssf nlfssskrrd pkvvvqenlr rlanaagfnv
241 ekfyrikthh sndiwimgrk epdsydgitt nqrgvtiaal gadcipivfa dpvkkacgva
301 hagwkgttl g vamativnami aeygcsledi vvvlgpsvvp ccftlpresa eafhnlhpac
361 vqlfdspnnc idirkatril leqggilpqn iqdqndlnl ctschpdkff shvrdglnfg
421 tqigfisike

```

SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de FAMIN de *Homo sapiens* (NP_001121775.1)

ES 2 983 714 T3

1 agacctgcag ctcttgccgc cctgcgccgc ctcccagggc ccgtcgttcc gcgcacctat
 61 cectctctcaa ggggccctta gctgcctcct cgcgacctt tocggactcg gectgcccac
 121 tcctgcccgc taacccgcct ggctcccggg cgagagccct cgcgcggctc tggttcctgt
 181 tcctctaacg ccgcgggggc tgcgggatgc cgaactccgc gaccgcccag acccggaact
 241 gctgaggcag cagcgggctc gcggcgcttg gctcatcccg ggattcccca gctctcgcgc
 301 tgggcccgcg gcgttcgcac caagcacgcc aggcggccct ggcctacctc cctccgcct
 361 cccggcagct ggcacgaggg aacctggcgc tcagggtttcc cctgggatcc tgggacggta
 421 tcaggcgggg aatctgtgcg gccgcggcga ggtgatttat ttggcataaa agtattcttt
 481 caaggatggc agaagctgtt ttgattgate tttttggtt gaaattgaac tctcaaaaaa
 541 actgccatca gacattactg aagactttga atgctgtcca ataccaccat gctgccagg
 601 ccaagtttct ctgtataatg tgttgagta acatcagcta tgaaagggat ggagaacaag
 661 ataattgtga aatagaaaca agcaatggat tatcagctct cttggaagaa tttgagattg
 721 ttagctgtcc cagcatggct gccactttgt ataccattaa acagaaaatt gatgaaaaaa
 781 atctgagcag cattaaggta attgtaccca ggcacaggaa gacattaatg aaagctttta
 841 ttgatcaact cttoactgat gtttacaatt ttgaatttga agatttgcaa gtgactttta
 901 ggggagggct ttttaaacag tcattgaaa taaacgtaat cacagctcaa gaactaagag
 961 gaattcagaa tgaaatagaa acatttttga gaagtctgcc agcactgaga ggaaaattaa
 1021 ctattatcac ttcttctttg atcccagata ttttcataca tggatttact acaagaacag
 1081 gtgggatata ttatatacca actcttagct cattcaatct cttcagtagt tccaaacgga
 1141 gagatcccaa ggtagtggtt caagaaaatc tgcgtagggt ggcgaaatgt gcaggattta
 1201 atgtggagaa attttaccga ataaagactc atcattccaa tgacatctgg attatgggaa
 1261 gaaaggagcc tgactcttat gatggaataa ccacaaatca gagaggagtc acaatagcag
 1321 ctcttggtgc agactgtata ccgatagttt ttgcagatcc agtcaaaaaa gcatgtgggg
 1381 ttgctcacgc tgggttgaaa ggtactttgt tgggtgttgc tatggctaca gtgaatgcta
 1441 tgatagcaga atatggctgc agtttggaag acattgttgt tgtacttgga ccttcagtag
 1501 gaccttgctg ttttactctt ccaagggaat cagcagaggc atttcataat cttcatcctg
 1561 catgtgtaca actatttgat tcaccaaatc cctgtatcga catccgtaaa gccacaagga
 1621 ttcttctaga acagggagga attcttccac agaataattca ggaccagaac caagatctca
 1681 acctctgtac atcttgccat cctgacaagt ttttctccca tgtccgagat ggccttaatt
 1741 ttggtacaca gattggcttc atatcaatta aagaatgaga tacttgactg gatttttgta
 1801 taactgcttc ctgcctcctt ccaaactgac tgcaagagag aaatttagct gtttgattta
 1861 cttaaaacca aatggattac aatggataat tcatcttttg ggtatatttt tactattatt
 1921 caaagccaaa tgattttcat ttaattgtaa taataactga caaaaatcag tatgtttag

ES 2 983 714 T3

```

1981 ctaatatggt ttatgcatga gaattattct taaagtttgt tctccctggt tattacacag
2041 atcaggaata gatttggttca gttcagtatt tattggatac cctctattgg tcaggcattg
2101 tgttaagcat atgtgaatca aatgaacac aactttttcc tttgagtctg atacagtga
2161 ggagataaac acttctacaa cttaaattta attttaatag cagtagaaga gaacataagg
2221 aatagagggt aattttaccc agaagcagga tagagaaaat attacagaga aaatcacata
2281 tcacatgggc tcgaaagatg tagaggtttt tgacaaatga agaacaacca taacaggtag
2341 agggaaacacc atgaaccagg gcatgaaact gaaagtgcac aacatattct agagagagaa
2401 ggggtgtggc atgagttagg gctggaaaaa caggttgga acagataagt aagggtctca
2461 aatgcaatgt caaagagctt gcagtttatt ttccaggcaa tgagtaggca gccaaaaaaa
2521 aaaaagtaag gatgtttttt ttttttttcc catggcatca tatttaagag gatggattta
2581 aattgtgtga gaccaaagca tagagactag ataagaggcg atcaaaatat ttcaaaaaga
2641 aataatgaag atccaatgaa ggaagtggaa attaaaatag ggaagagagt agatggatta
2701 gagagacatt taagagatgg aatcaataga tctgttact agataatgga agtaagaggt
2761 gaggaagagt ggaaaagtca ttaatgactc taagatttct gcttggctgc ttaccaagat
2821 tggcaacaaa gggagggaga aggtttggaa aaagagagaa ggataatgag tttgacttta
2881 catagaatga agggcatcca gatagaaatc tttggttaat aattagaaat atagacctag
2941 aaattaggag gaaacctgag acagagacaa atatttcaaa gcttacaata cagagatgat
3001 acctgattct attggagcag gtttgatcat ctaggcagaa attaggatga gaaaaaagga
3061 gatccaataa tacaacctta tagtcacaga agtaagaaaa aaagggtagt tgttttgaag
3121 aagccaggat aggtgtggaa agtactcaaa aagaaatctt cagggataaa ataaagtgat
3181 aatttaaaag aaatcaatgg attaaacata ttgaaactgt tctataggca gtggtcattg
3241 agtcagcttt cagtgcatta ggaagaagat gcataggtgt caactcttt ctgacagcat
3301 ttactagaga agagaaaaag ctggggacta catcttcaag gaagggactt tttttggatg
3361 agcagttttg agtgtgtttg tcagttaaag agaggaatta ggttagtttt catttgggaa
3421 aaattgtata tatatttaat gtaagttatc acattgcac ttaaaaatat tcttatttaa
3481 tacatatatt tctacatgt atatgtggtg gcatgatagc aaataacatt tgtttggtat
3541 ttccaaagga ctttcatgta cattgcctca ttttacctt acagctactc tgaatacac
3601 aggcattatc ctttttattc agctgagaaa actgagcttc attgaggtgg aggtcaaaaa
3661 tcacaaaatt tgtgatgaat taagatttga acatatgttt tgtgactcca gttttccttt
3721 cagattttta aattaattaa agggatcttc attatacttt tattgttaac tttttgttaa
3781 cataatttat tcatacatc agtgaaaatt ttgttgaggt actgggacag gttaaaaaat
3841 acagttgtag cctcaggat atttaatatc cagtgaaaag tgacagtcag taaaccaaca
3901 atctcaatac tttgatatat gttgtgaggt tgtgataacc gattcttgtt tagtttaatt
3961 ctatatctcc cttagaccag tgttaaatth aaataaaaaca cctcattttt tccaattcag
4021 ggaaggcact aaacataaag cataggatag aaatgttgaa ctcatccaaa atattatttt
4081 gtttaatgaa aatgatgaag attaaggaat acttccatgt attgagtaag gttgataatt
4141 ttctaattct tcaactgtga ttattttgtt tgaagttggt aaatttgag tatcctgcag
4201 acacattttg ctttatgtac tacaacattc tacaacccaa taaaaattat tttgattatc
4261 tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

SEQ ID NO: 2 Secuencia codificante de FAMIN de *Homo sapiens* (NM_001128303.1)

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la actividad de una proteína FAMIN que comprende:

5 proporcionar una proteína FAMIN aislada; y
determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN,
opcionalmente en donde la actividad purina nucleósido fosforilasa es una actividad adenosina fosforilasa.

10 2. Un método de cribado para detectar un compuesto que module la actividad de una proteína FAMIN que comprende:

determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de una proteína FAMIN aislada en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo, en donde una diferencia en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo modula la actividad de la proteína FAMIN,
15 opcionalmente en donde la actividad purina nucleósido fosforilasa es una actividad adenosina fosforilasa.

20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde:

una disminución en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo es un inhibidor de FAMIN; o
25 un aumento en la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y/o la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN en presencia, con respecto a la ausencia, del compuesto de ensayo es indicativa de que el compuesto de ensayo es un potenciador de FAMIN.

30 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la actividad adenosina desaminasa de la proteína FAMIN se determina midiendo la conversión de una molécula de adenosina en una molécula de inosina en presencia de la proteína FAMIN,

opcionalmente en donde:
el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN aislada con un nucleósido de adenosina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de adenosina o nucleósido de inosina en la solución de reacción después de dicho contacto;
35 en donde una disminución en la concentración del nucleósido de adenosina o un aumento en la concentración del nucleósido de inosina en la solución de reacción es indicativo de la actividad de adenosina desaminasa.

40 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:

la molécula de adenosina es adenosina y la molécula de inosina es inosina;
la molécula de adenosina es desoxiadenosina y la molécula de inosina es desoxiinosina,
la molécula de adenosina es 2'-desoxiadenosina y la molécula de inosina es 2'-desoxiinosina; o
45 la molécula de adenosina es 5'-desoxiadenosina y la molécula de inosina es 5'-desoxiinosina.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN se determina midiendo la conversión de un nucleósido de purina en una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN.

50 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN aislada con un nucleósido de purina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de purina; o nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto, opcionalmente en donde la solución de reacción comprende fosfato inorgánico;
55 en donde una disminución en la concentración de nucleósido de purina o un aumento en la concentración de nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativo de la actividad purina nucleósido fosforilasa.

60 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la actividad purina nucleósido fosforilasa de la proteína FAMIN se determina midiendo la conversión de una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en un nucleósido de purina en presencia de la proteína FAMIN;

opcionalmente, en donde el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN aislada con una nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de purina; o nucleobase de purina y/o moléculas de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto, en donde una disminución en la concentración de nucleobase y una molécula de ribosa-1-fosfato o un aumento en
65

la concentración de nucleósido de purina en la solución de reacción es indicativo de la actividad purina nucleósido fosforilasa.

9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde:

el nucleósido de purina es guanosina, la nucleobase de purina es guanina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato;
 el nucleósido de purina es adenosina, la nucleobase de purina es adenina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato;
 el nucleósido de purina es 2'-desoxiadenosina, la nucleobase de purina es adenina y la molécula de ribosa-1-fosfato es 2'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato;
 en donde el nucleósido de purina es 5'-desoxiadenosina, la nucleobase de purina es adenina y la molécula de ribosa-1-fosfato es 5'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato o
 el nucleósido de purina es una molécula de inosina, opcionalmente en donde la molécula de inosina es inosina, la nucleobase de purina es hipoxantina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato o la molécula de inosina es desoxiinosina; la nucleobase de purina es hipoxantina y la molécula de ribosa-1-fosfato es 2'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN se determina midiendo la conversión de metiltioadenosina en adenina y una molécula de metiltiorribosa-1-fosfato en presencia de la proteína FAMIN,

opcionalmente, en donde el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN aislada con un nucleósido de metiltioadenosina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de metiltioadenosina; o nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto, opcionalmente en donde la solución de reacción comprende fosfato inorgánico, en donde una disminución en la concentración de nucleósido de metiltioadenosina o un aumento en la concentración de nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativo de la actividad metiltioadenosina fosforilasa.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN se determina midiendo la conversión de una nucleobase de adenina y una molécula de metiltioadenosina-1-fosfato en un nucleósido de metiltioadenosina en presencia de la proteína FAMIN,

opcionalmente, en donde el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN aislada con una nucleobase de adenina y una molécula de metiltiorribosa-1-fosfato en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de metiltioadenosina; o nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiorribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto, en donde una disminución en la concentración de nucleobase de adenina y/o molécula de metiltiorribosa-1-fosfato o un aumento en la concentración de nucleósido de metiltioadenosina en la solución de reacción es indicativo de la actividad metiltioadenosina fosforilasa, opcionalmente, en donde el nucleósido de metiltioadenosina es 5-metiltioadenosina y la molécula de metiltiorribosa-1-fosfato es S-metil-5-tio- α -D-ribosa-1-fosfato.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende determinar la actividad adenosina desaminasa y la actividad purina nucleósido fosforilasa de la molécula FAMIN;

opcionalmente en donde el método comprende poner en contacto la proteína FAMIN con un nucleósido de adenosina en una solución de reacción; y determinar la cantidad de nucleósido de adenosina o hipoxantina y/o molécula de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción después de dicho contacto, opcionalmente en donde la solución de reacción comprende fosfato inorgánico, en donde una disminución en la concentración de nucleósido de adenosina o un aumento en la concentración de hipoxantina y/o molécula de ribosa-1-fosfato en la solución de reacción es indicativo de la actividad adenosina desaminasa y purina nucleósido fosforilasa.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que:

el nucleósido de adenosina es adenosina y la molécula de ribosa-1-fosfato es α -D-ribosa-1-fosfato;
 el nucleósido de adenosina es 2'-desoxiadenosina y la ribosa-1-fosfato es 2'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato; o
 el nucleósido de adenosina es 5'-desoxiadenosina y la ribosa-1-fosfato es 5'-desoxi- α -D-ribosa-1-fosfato.

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

determinar la actividad adenosina desaminasa, la actividad purina nucleósido fosforilasa y la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN; o
 determinar la actividad adenosina desaminasa y la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN; o

determinar la actividad purina nucleósido fosforilasa y la actividad metiltioadenosina fosforilasa de la proteína FAMIN.

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la proteína FAMIN es FAMIN humana y opcionalmente comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad con la secuencia de aminoácidos 176-430 de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1);
- (b) un residuo de Ile en una posición correspondiente a la posición 254 de la secuencia de aminoácidos de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1); o
- (c) un residuo de Val en una posición correspondiente a la posición 254 de la secuencia de aminoácidos de NP_001121775.1 (SEQ ID NO: 1).

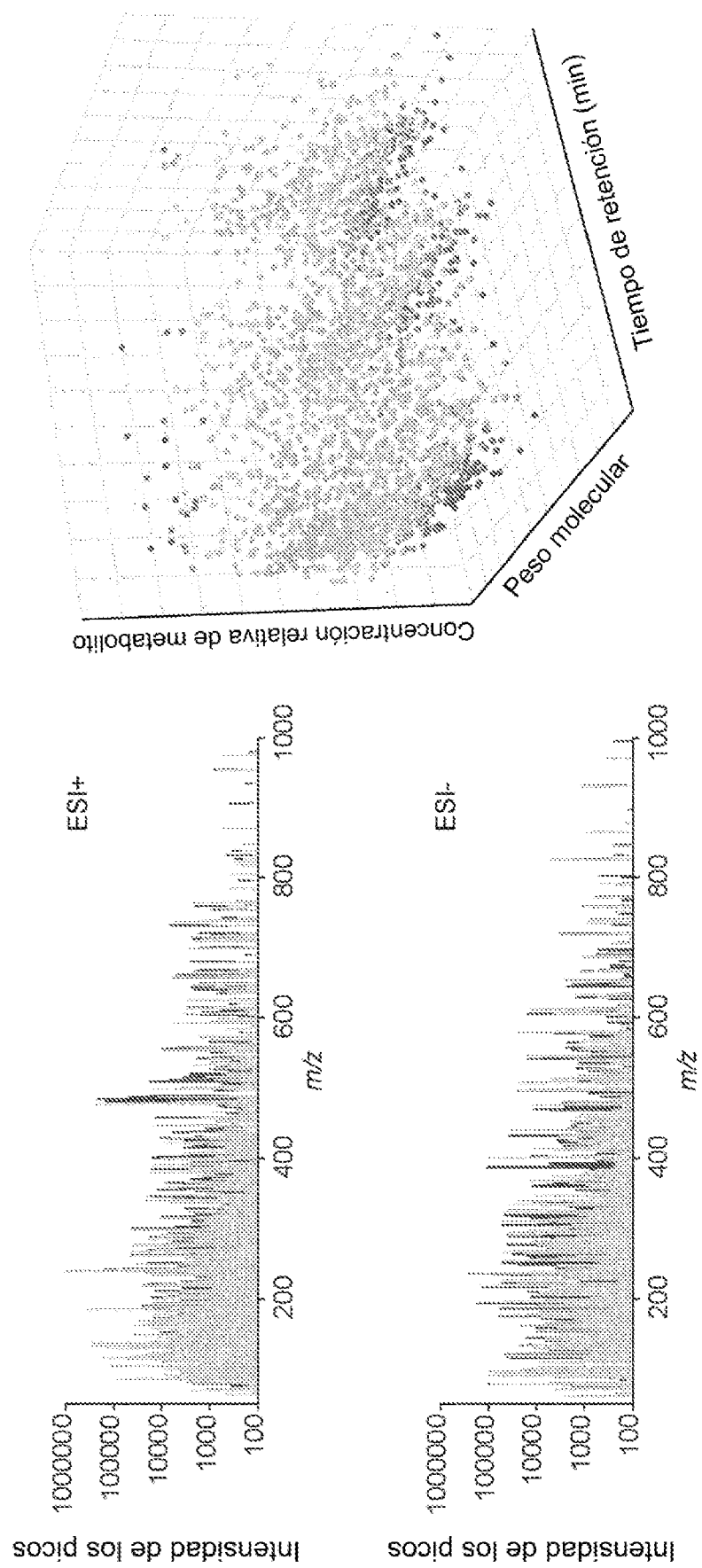


FIGURA 1A

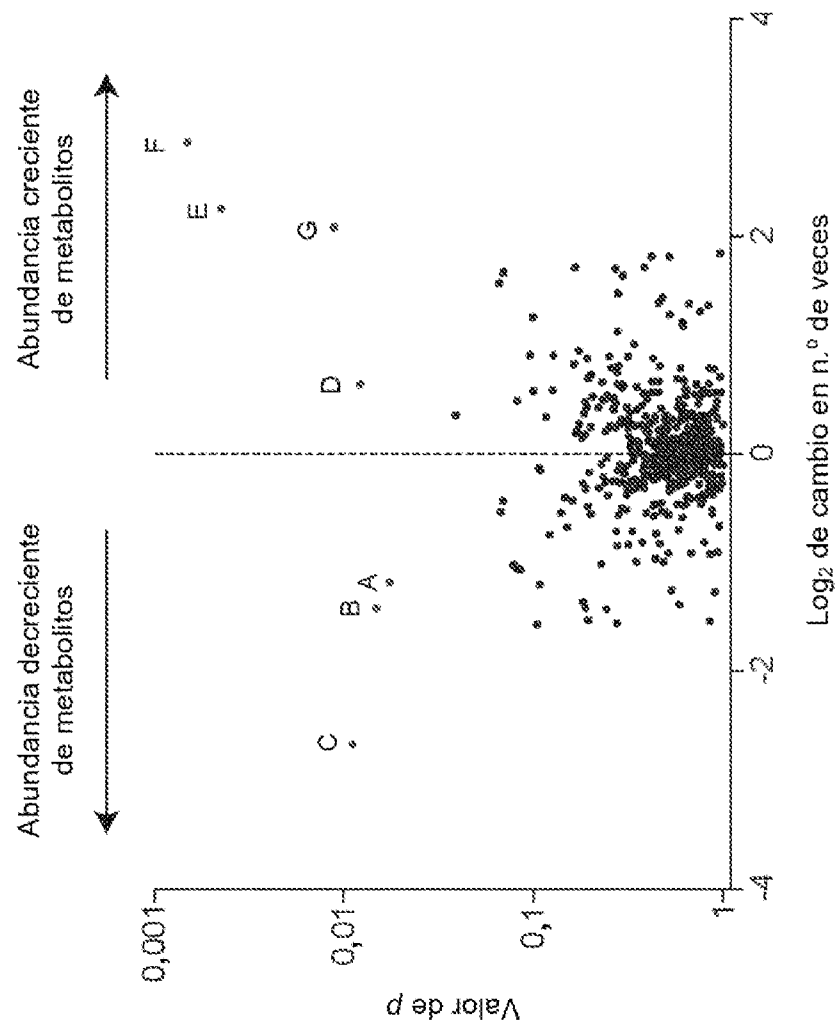


FIGURA 1B

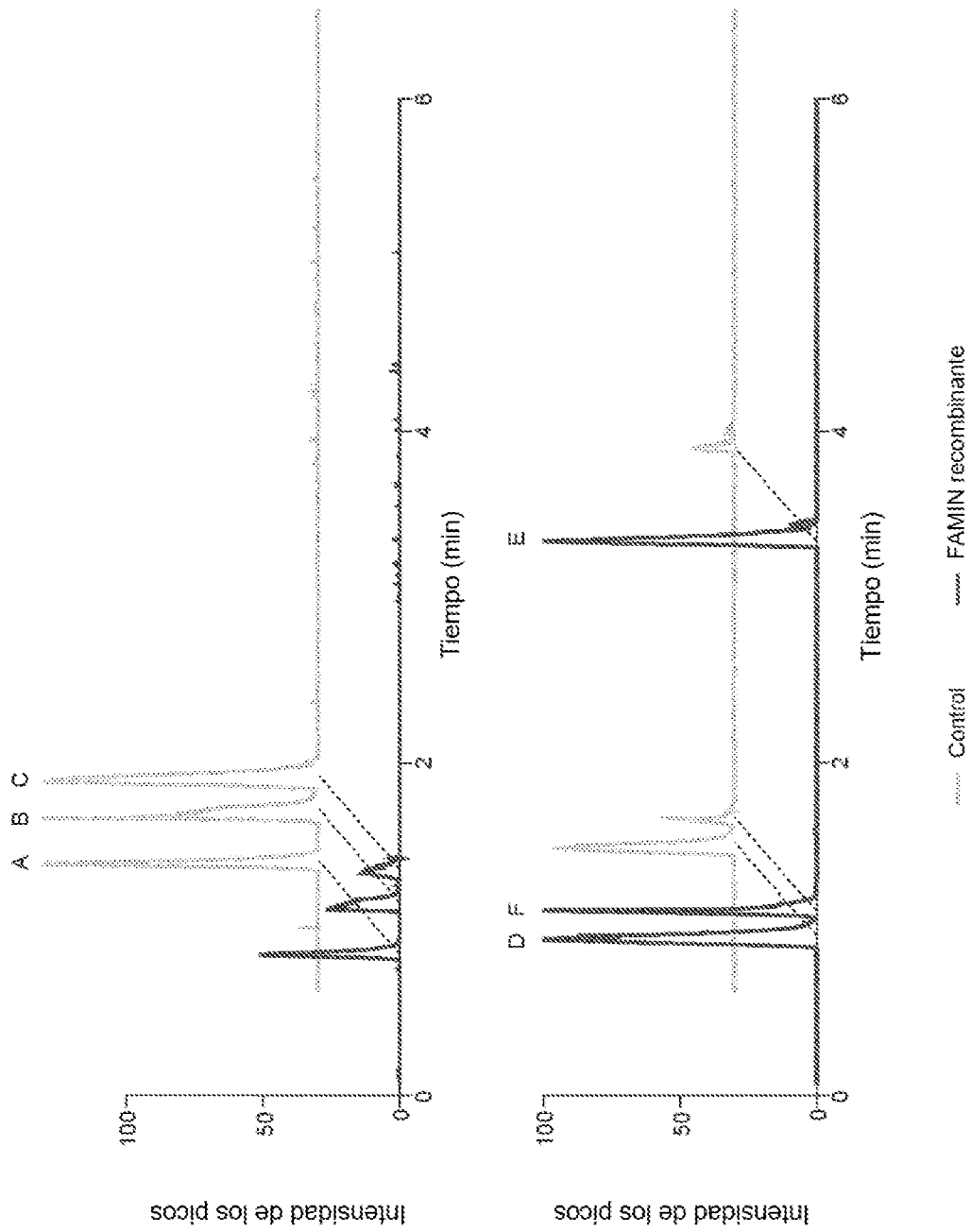


FIGURA 1C

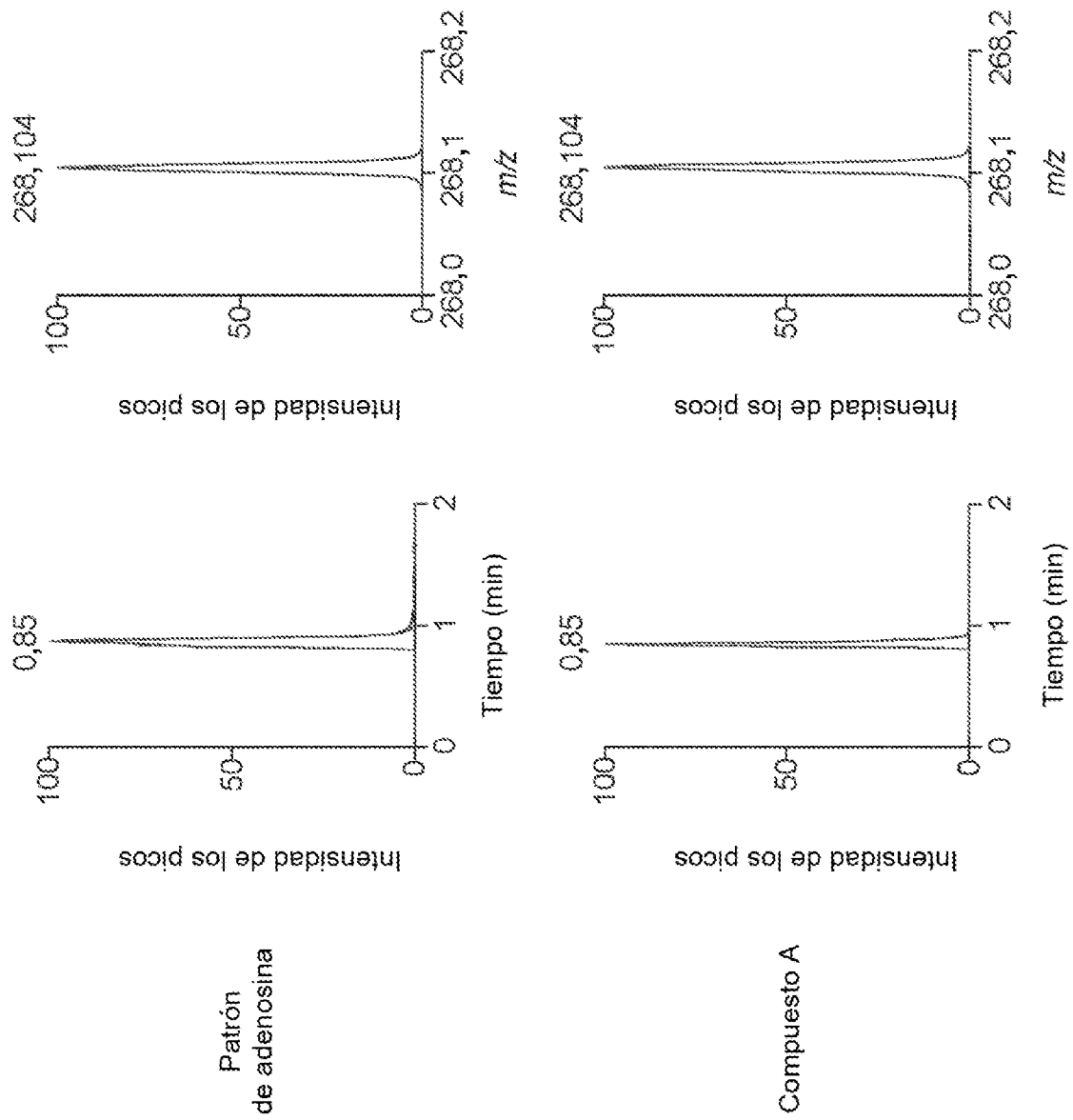


FIGURA 1D

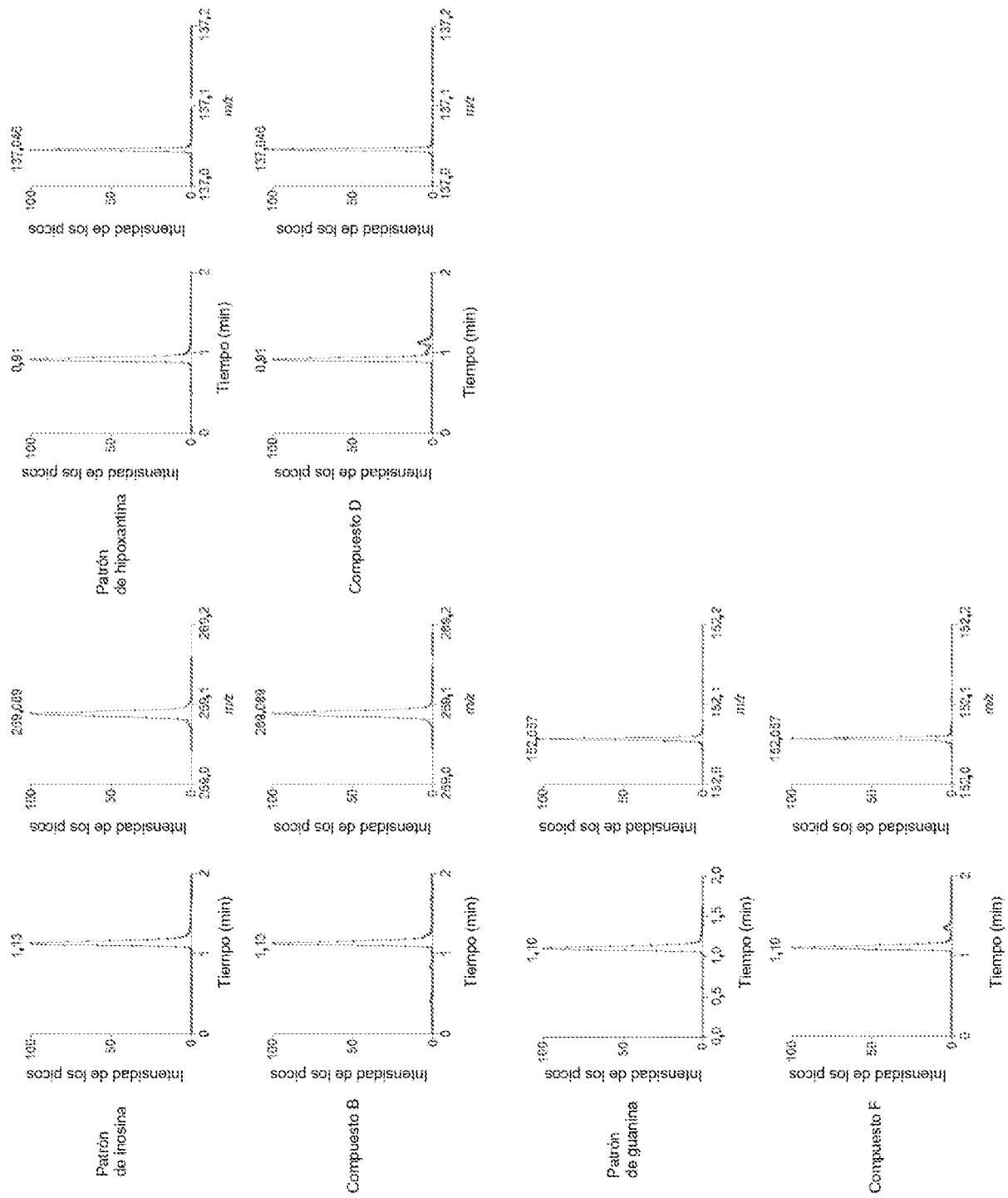


FIGURA 1E

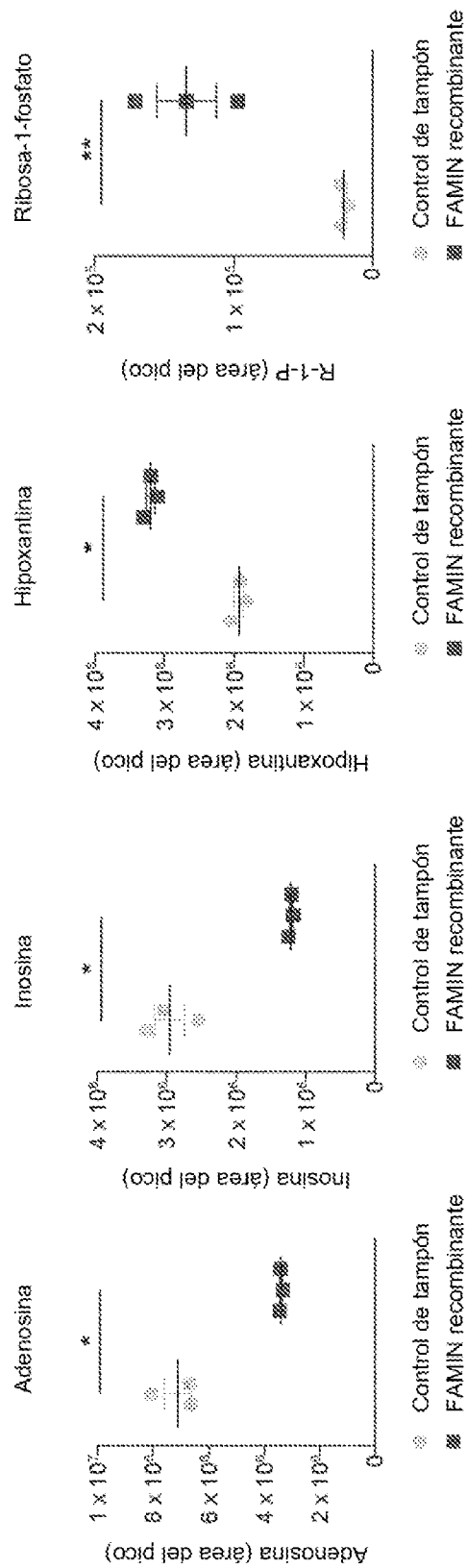


FIGURA 1F

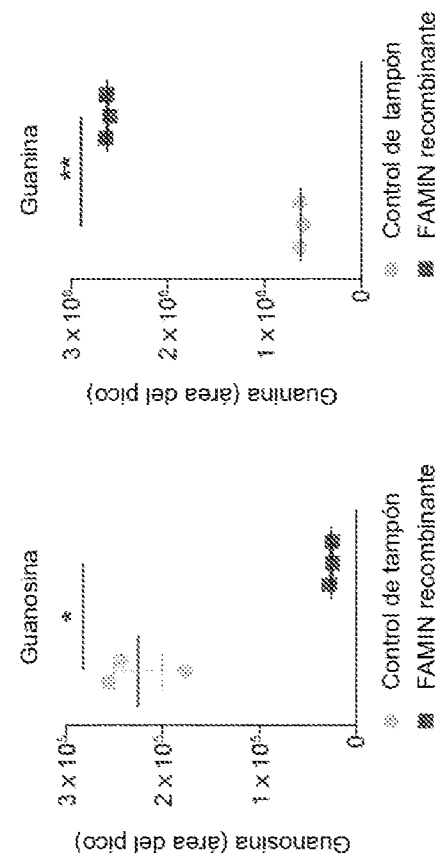


FIGURA 1G

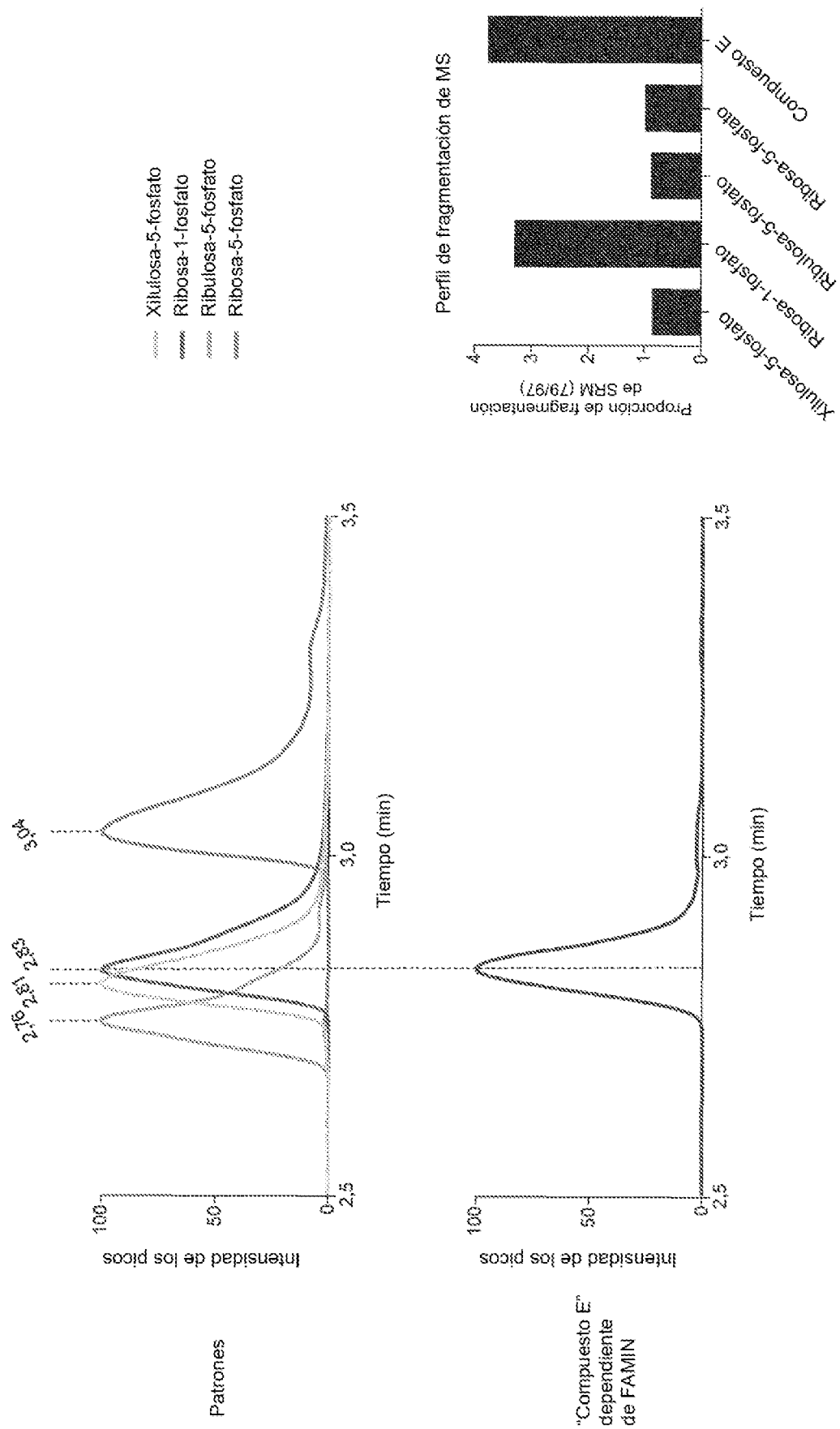


FIGURA 1H

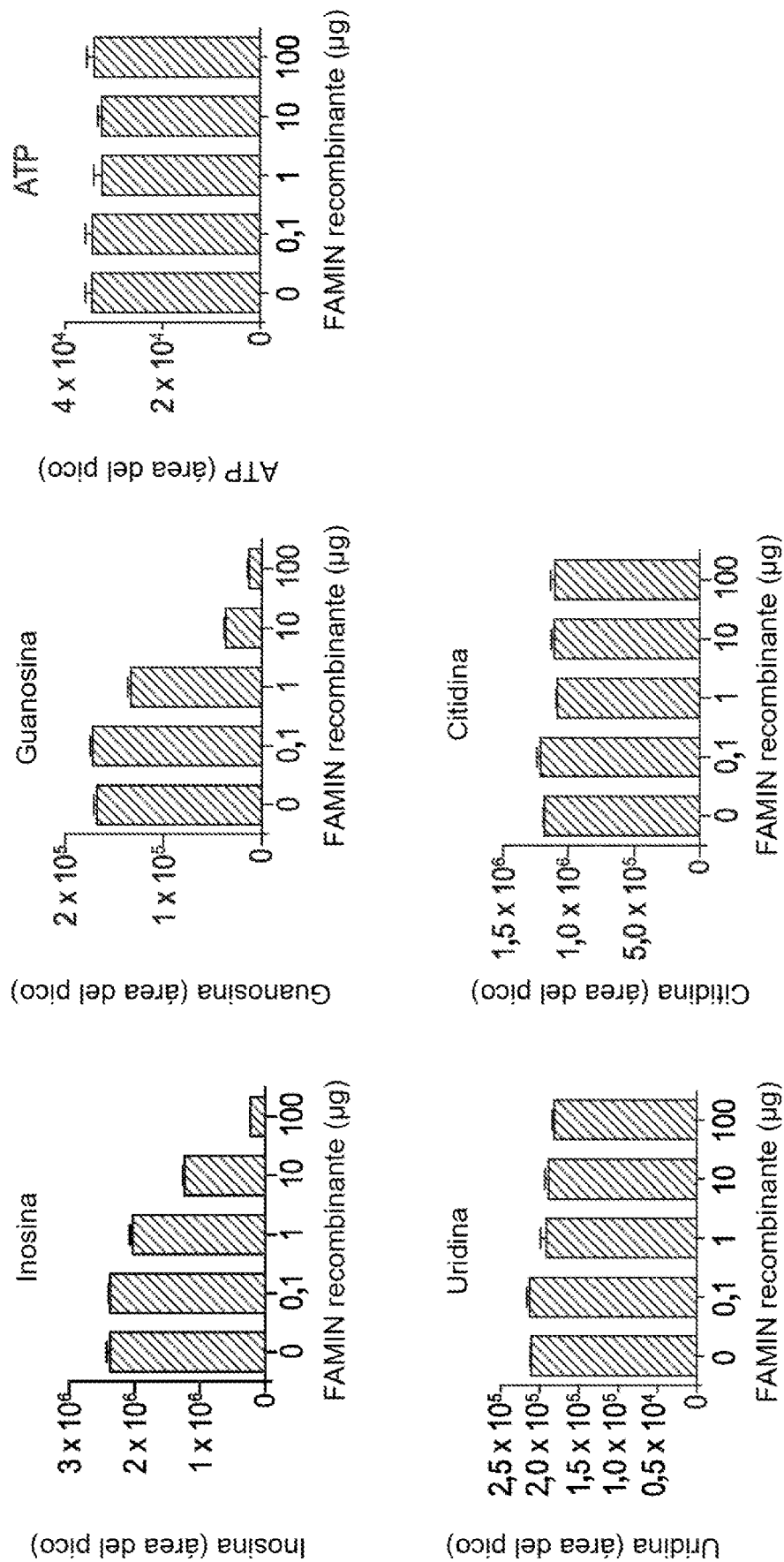


FIGURA 1I

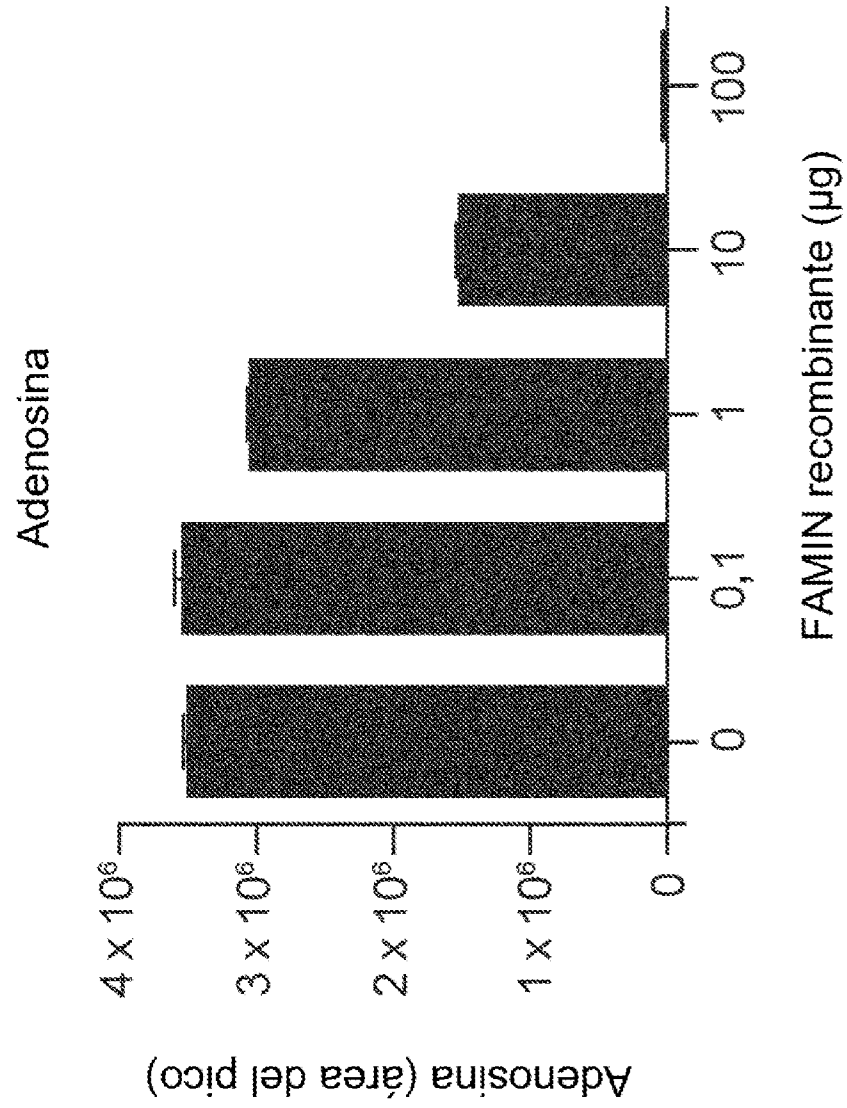
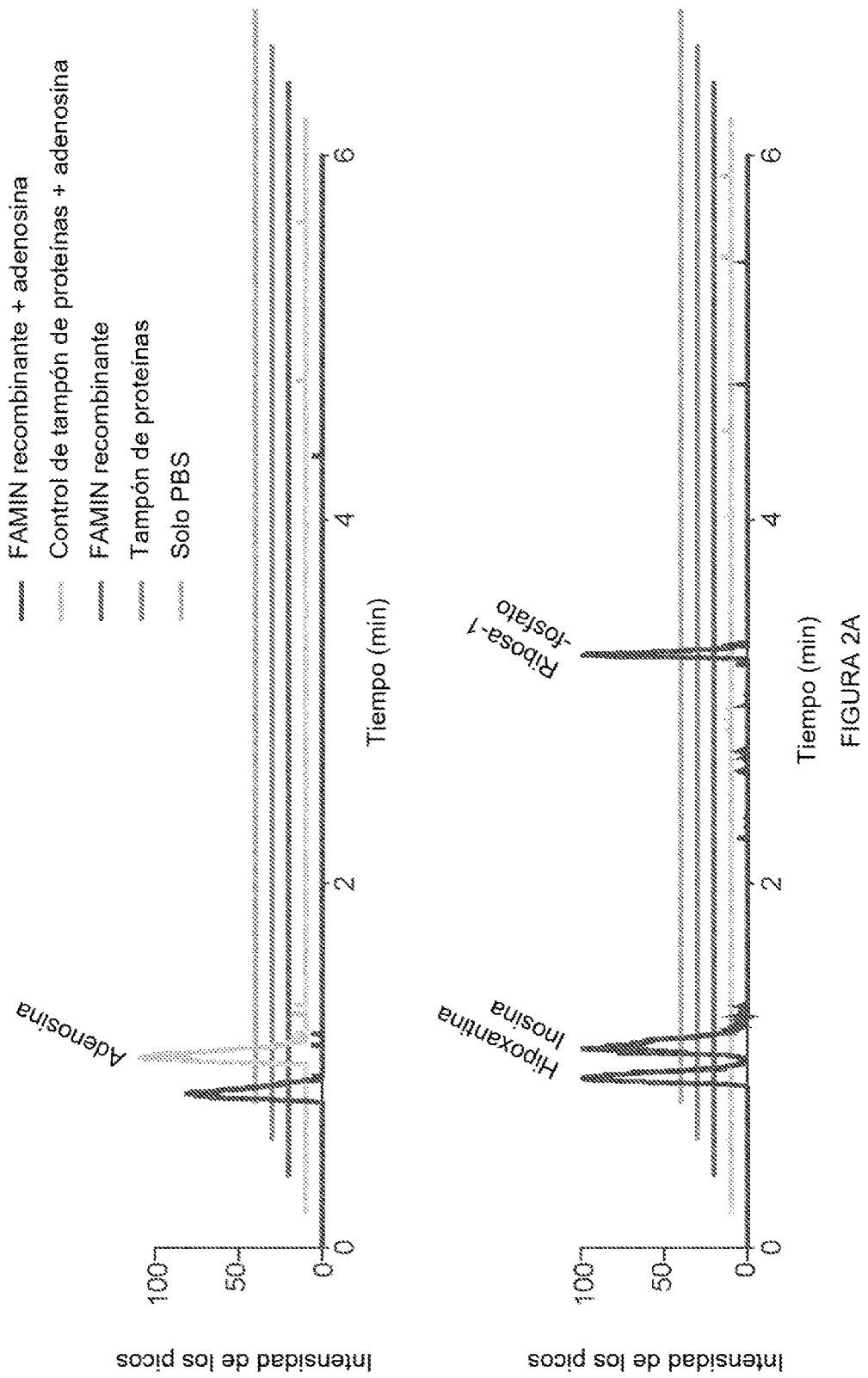


FIGURA 1J



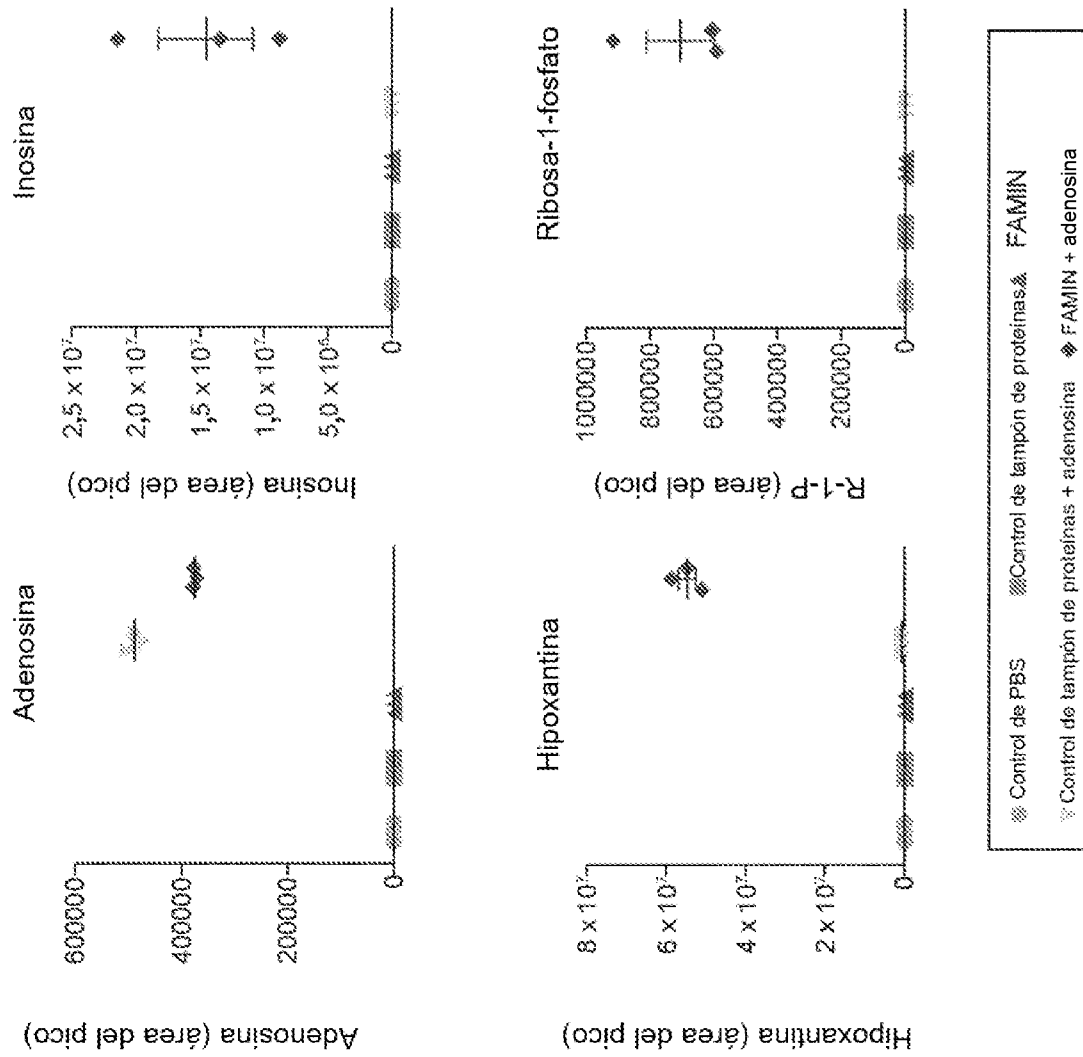


FIGURA 2B

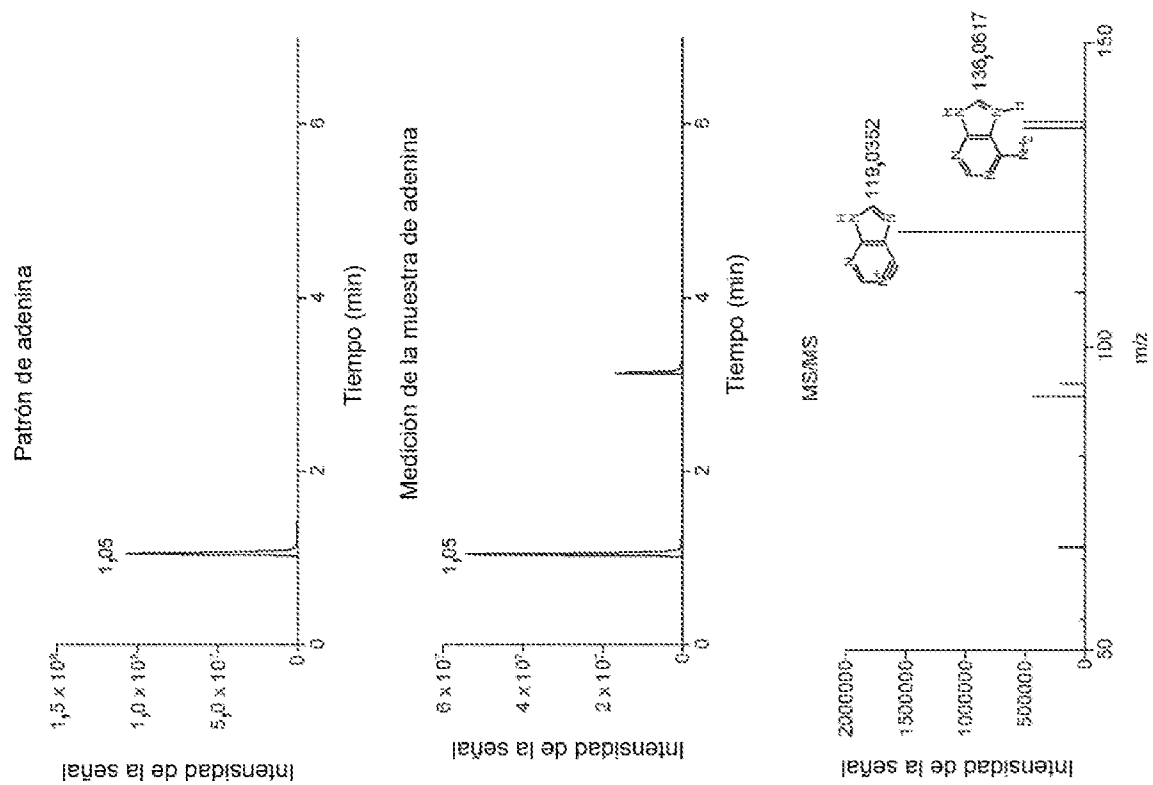


FIGURA 2C

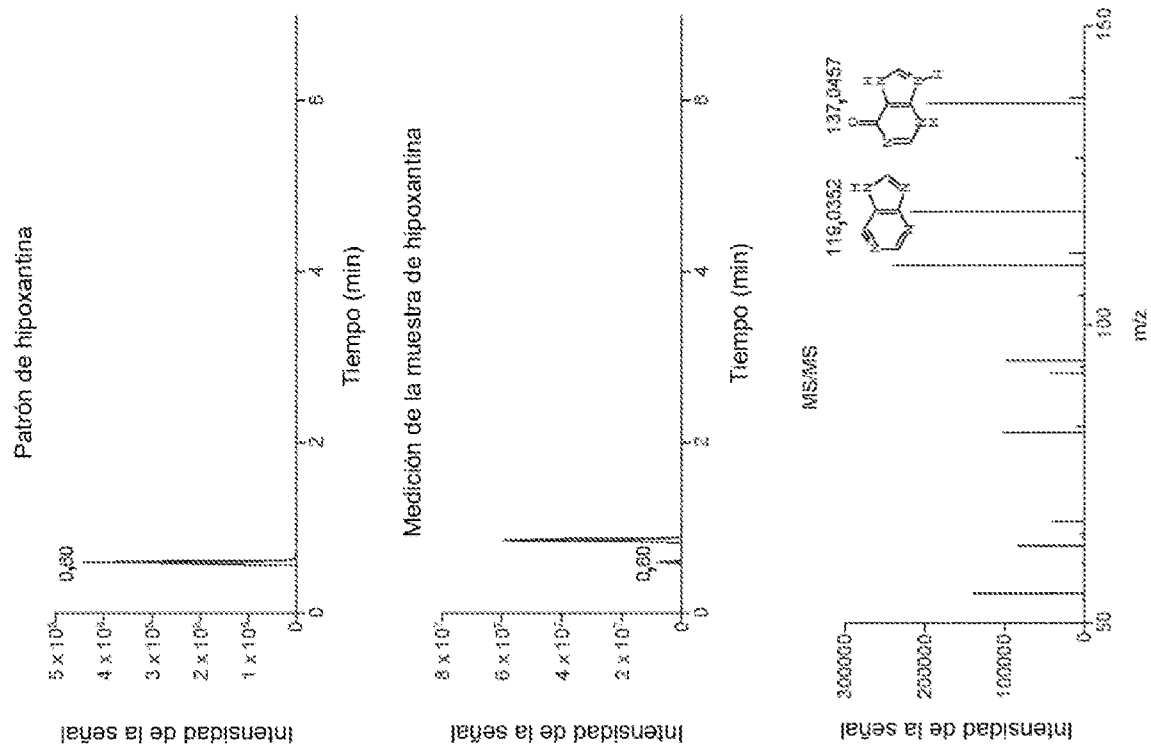


FIGURA 2D

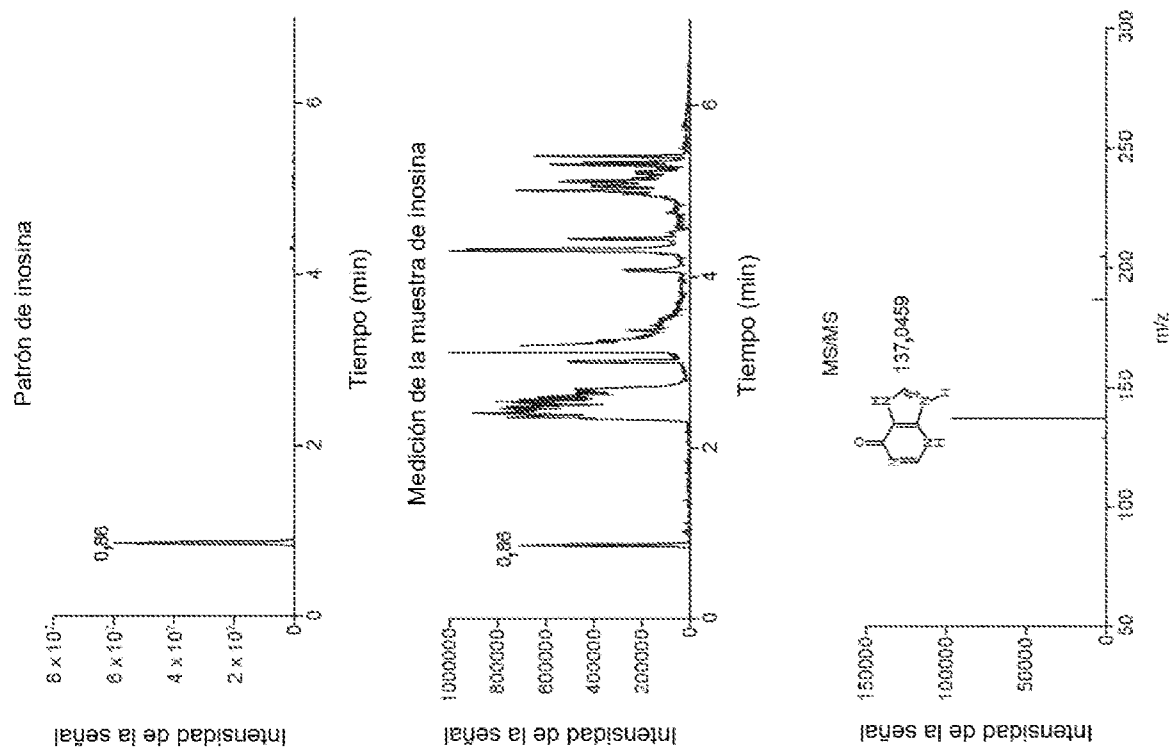


FIGURA 2E

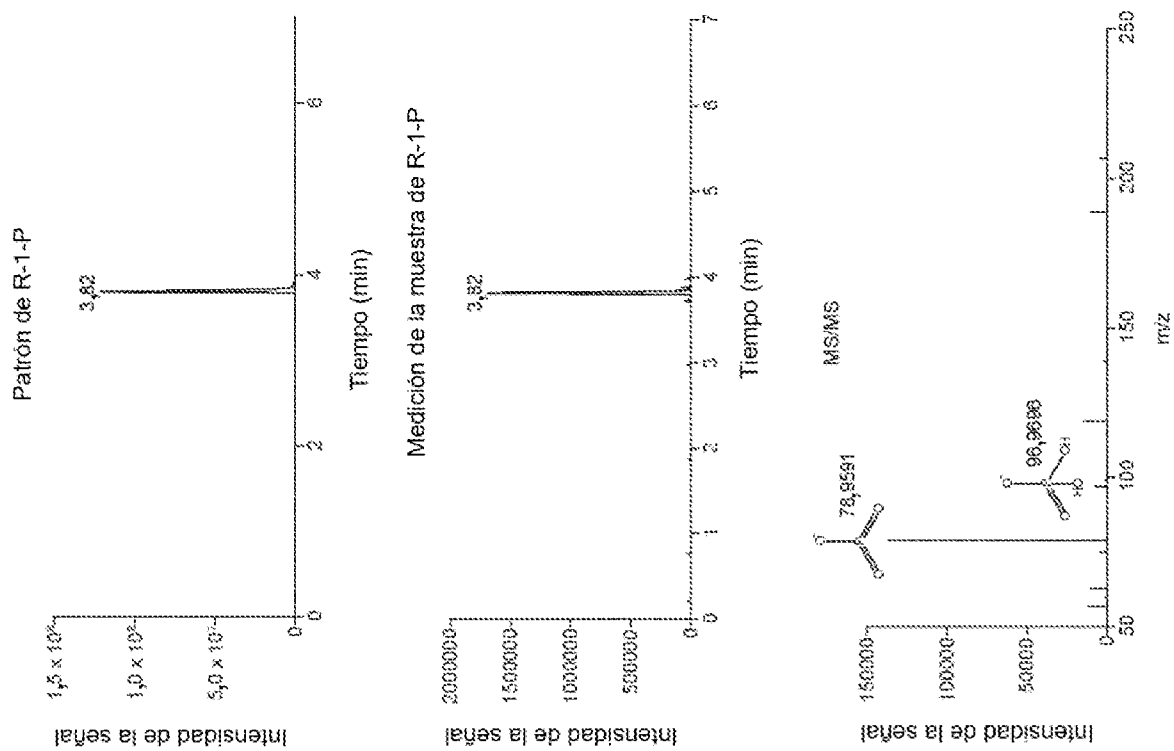


FIGURA 2F

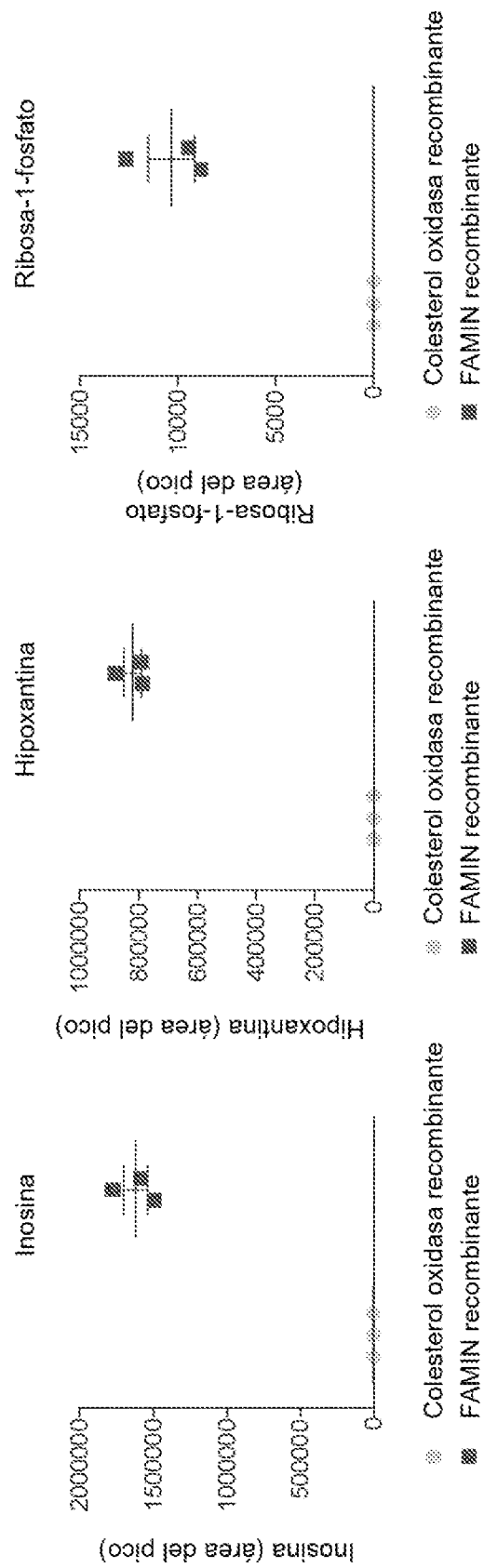


FIGURA 2G

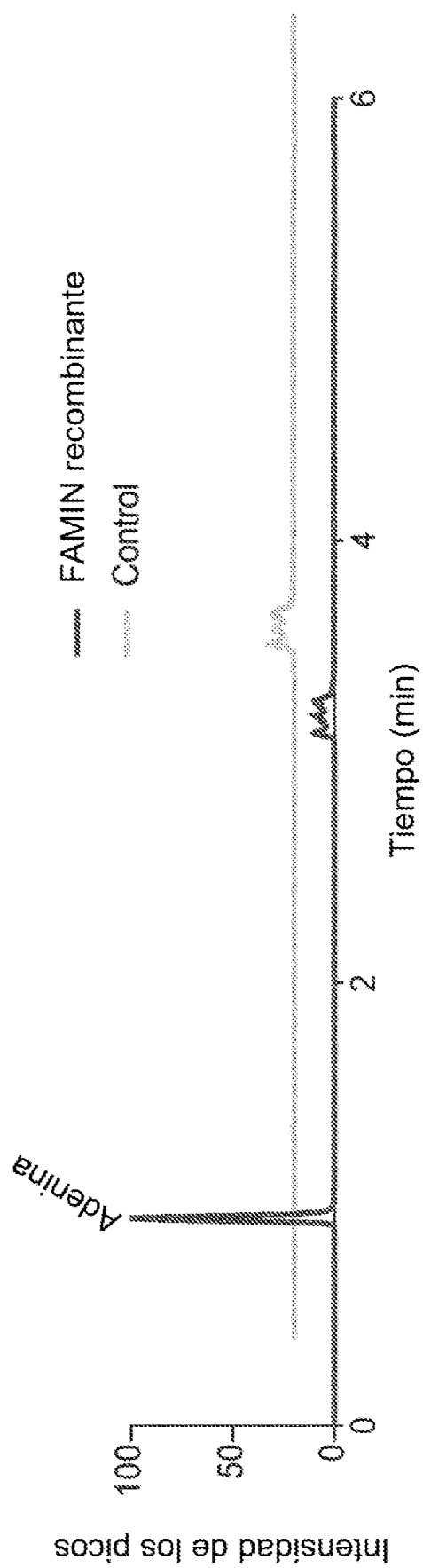


FIGURA 2H

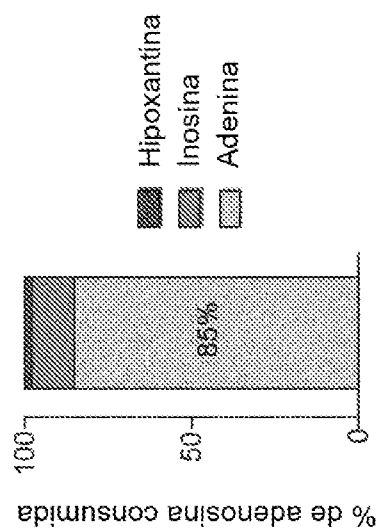


FIGURA 2I

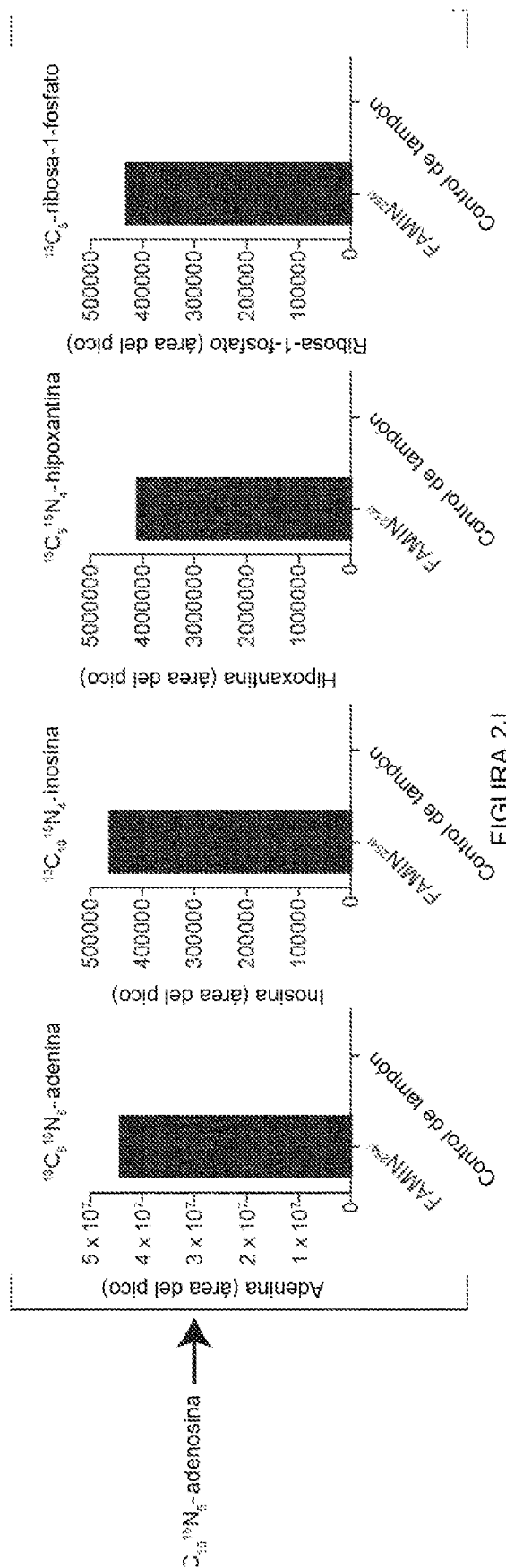


FIGURA 2J

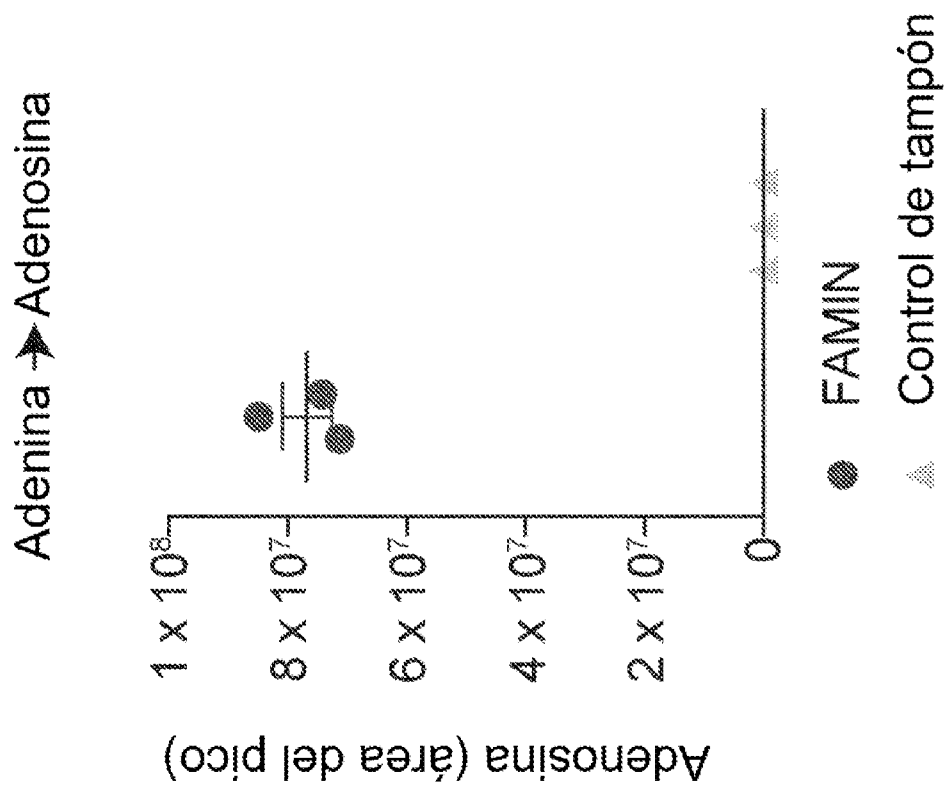
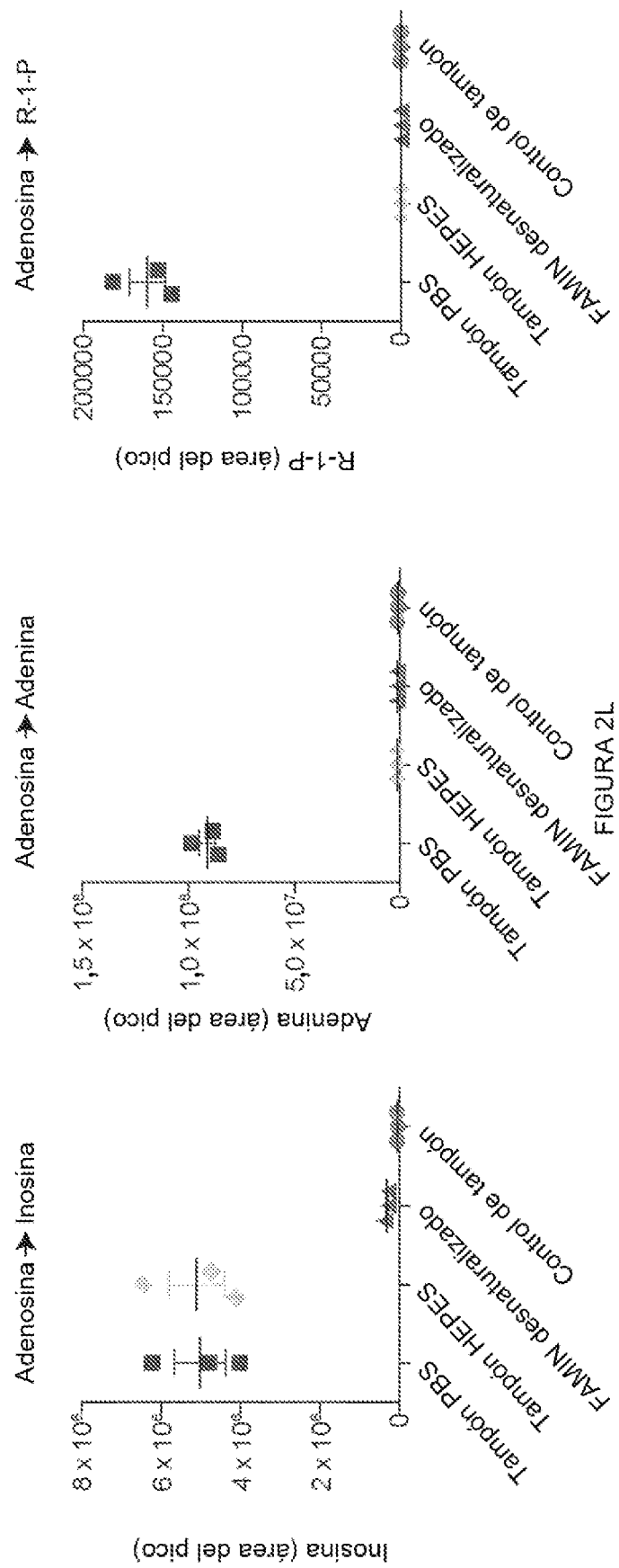


FIGURA 2K



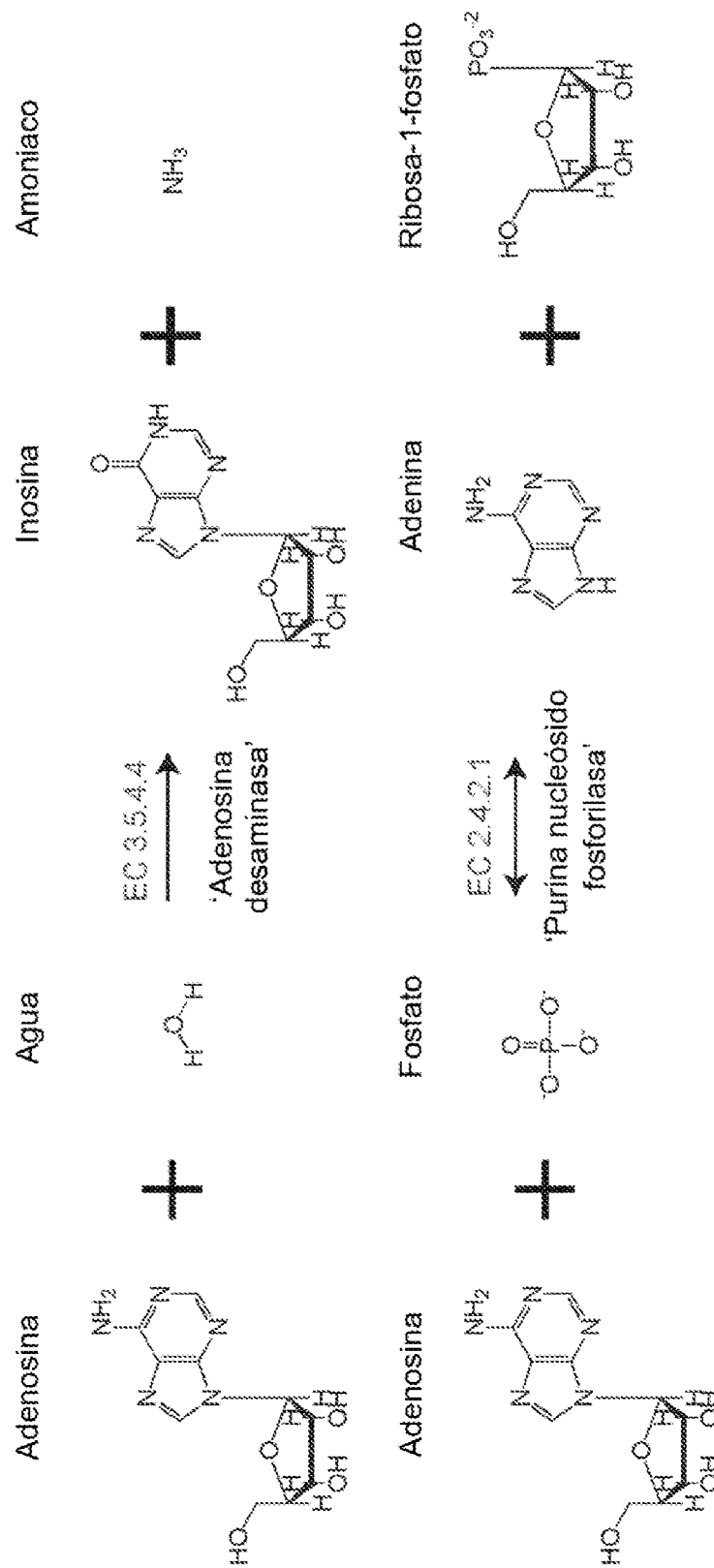


FIGURA 2M

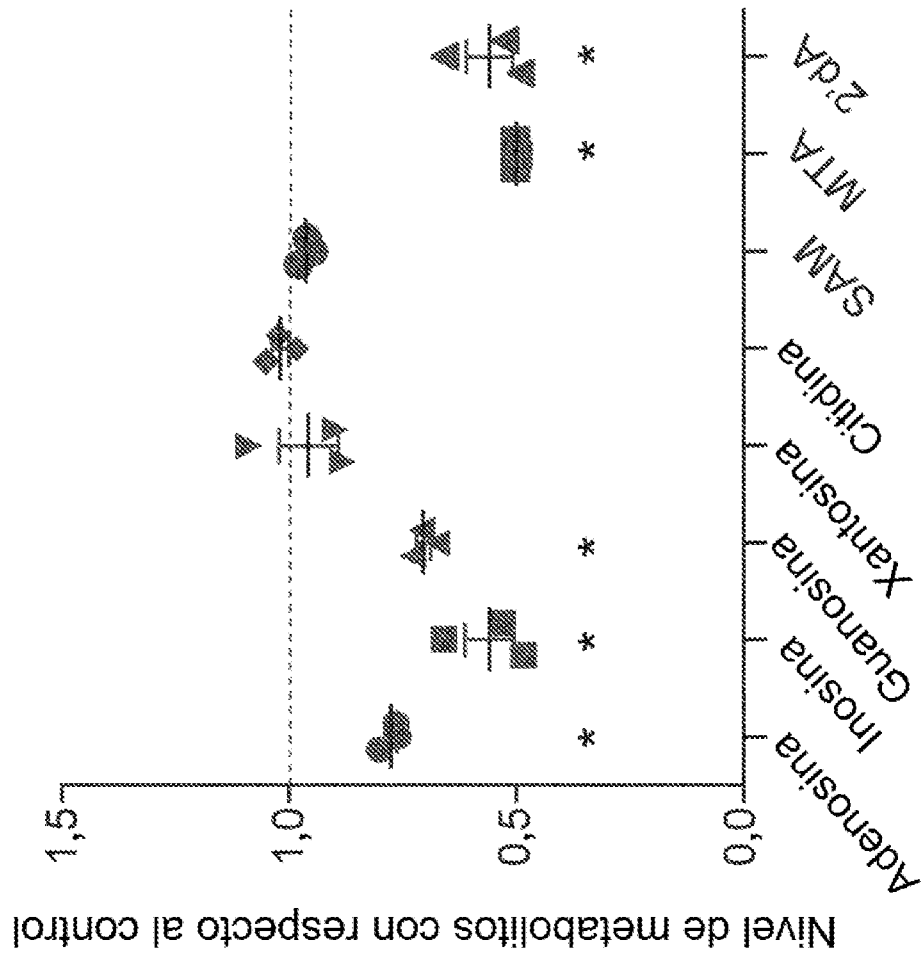


FIGURA 2N

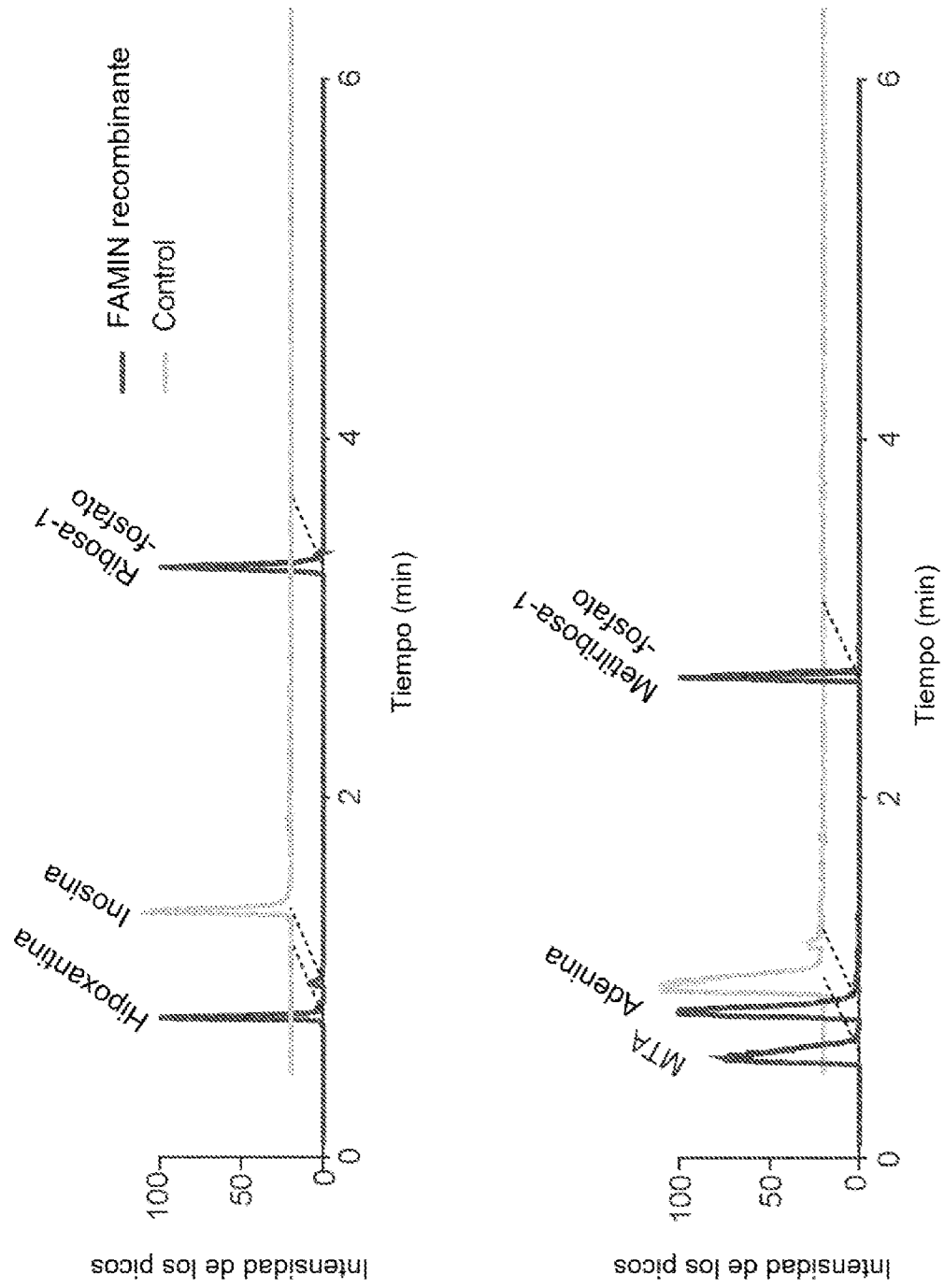


FIGURA 20

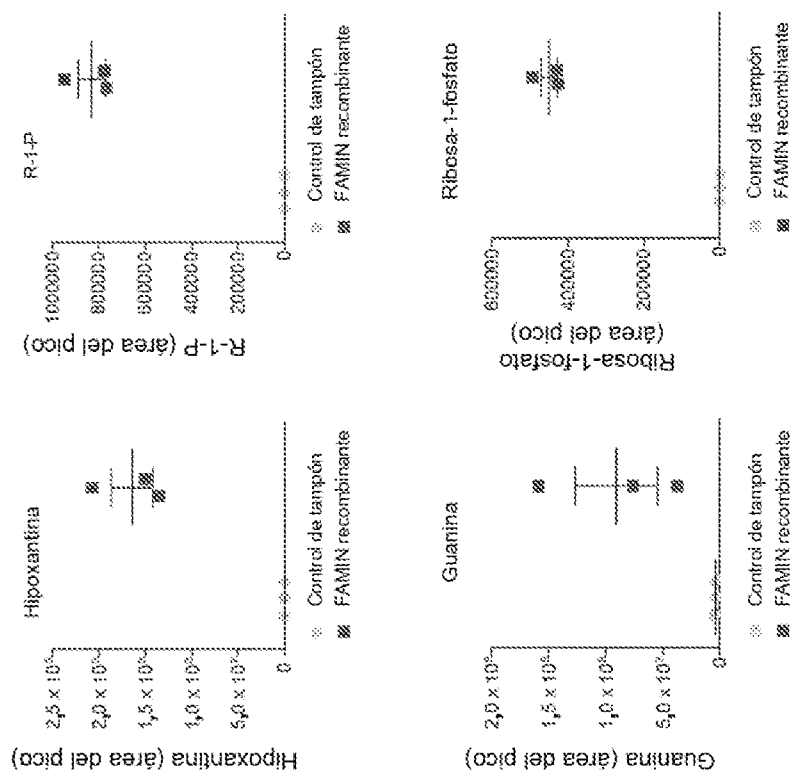


FIGURA 2P

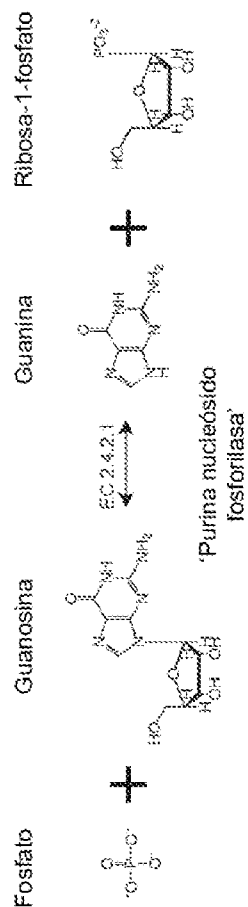


FIGURA 2Q

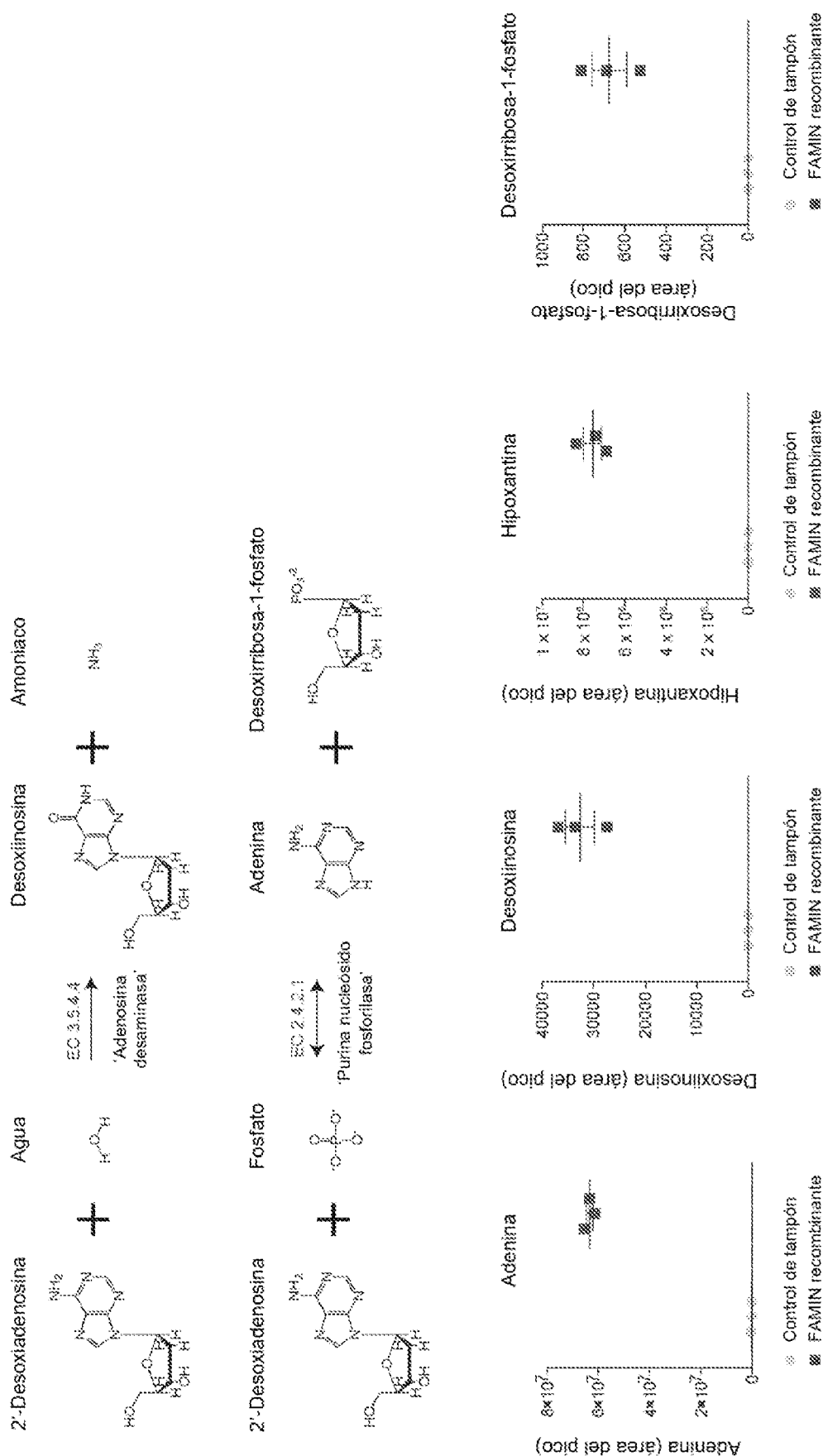


FIGURA 2R

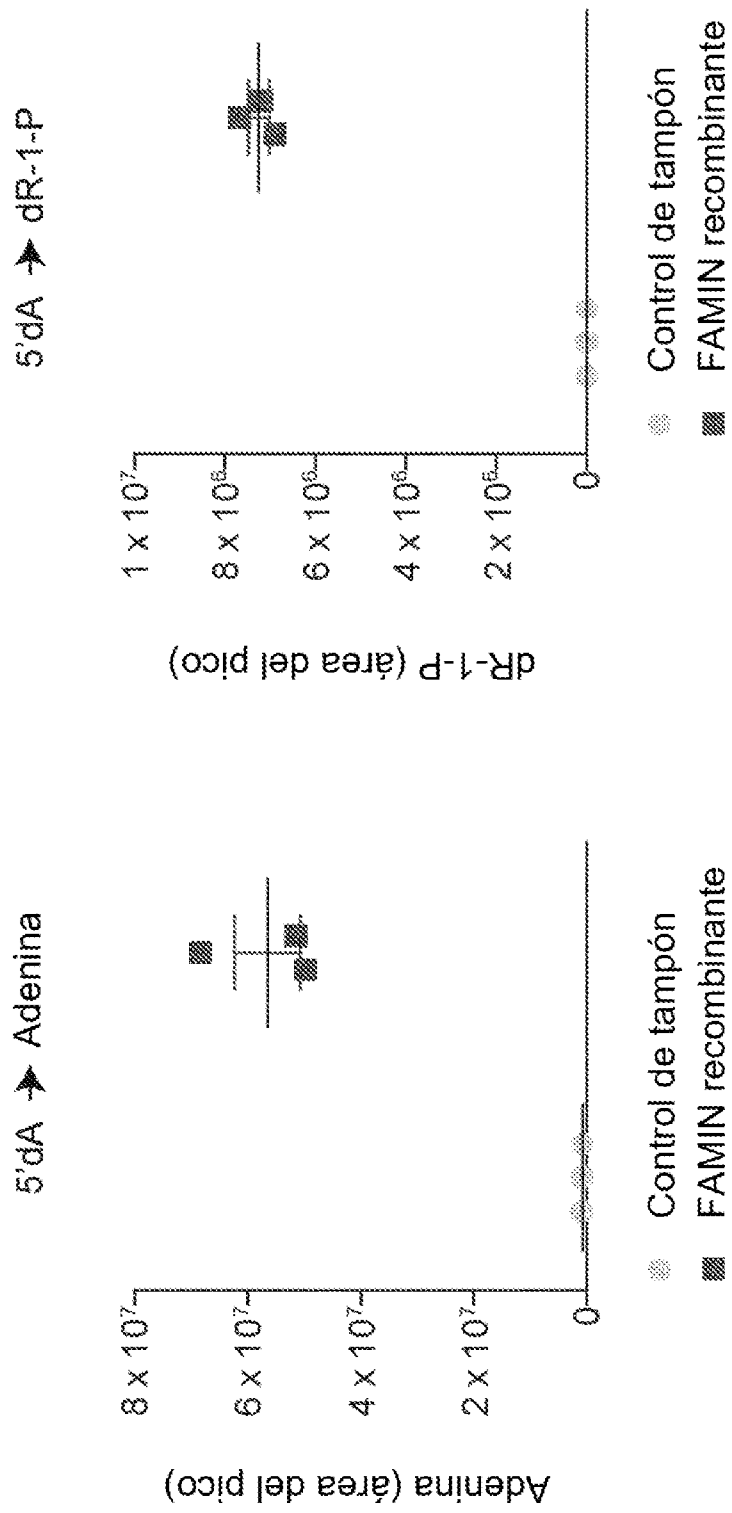


FIGURA 2S

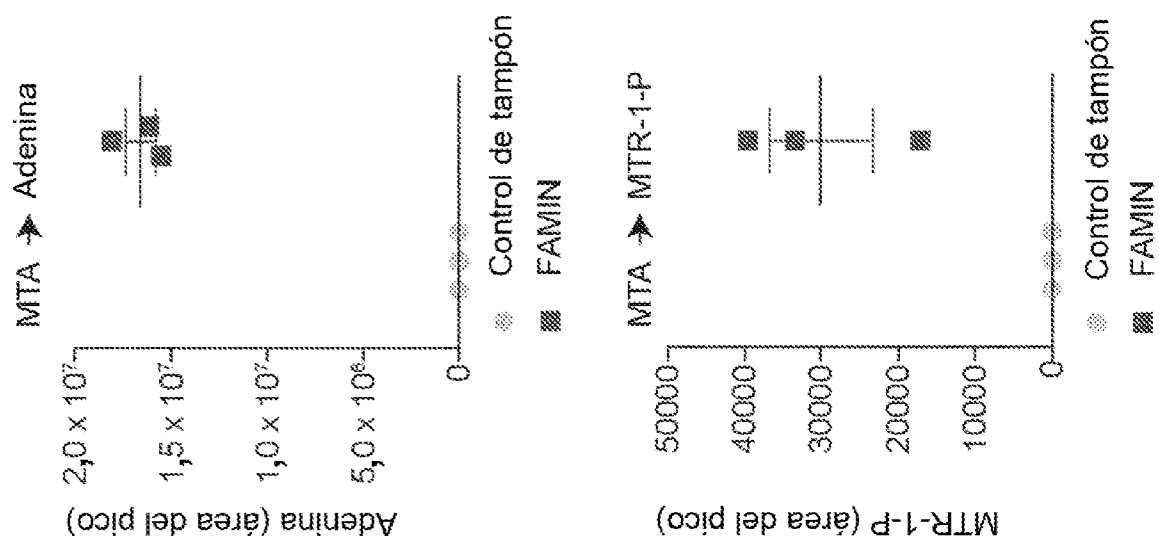


FIGURA 2T

Metiltioadenosina

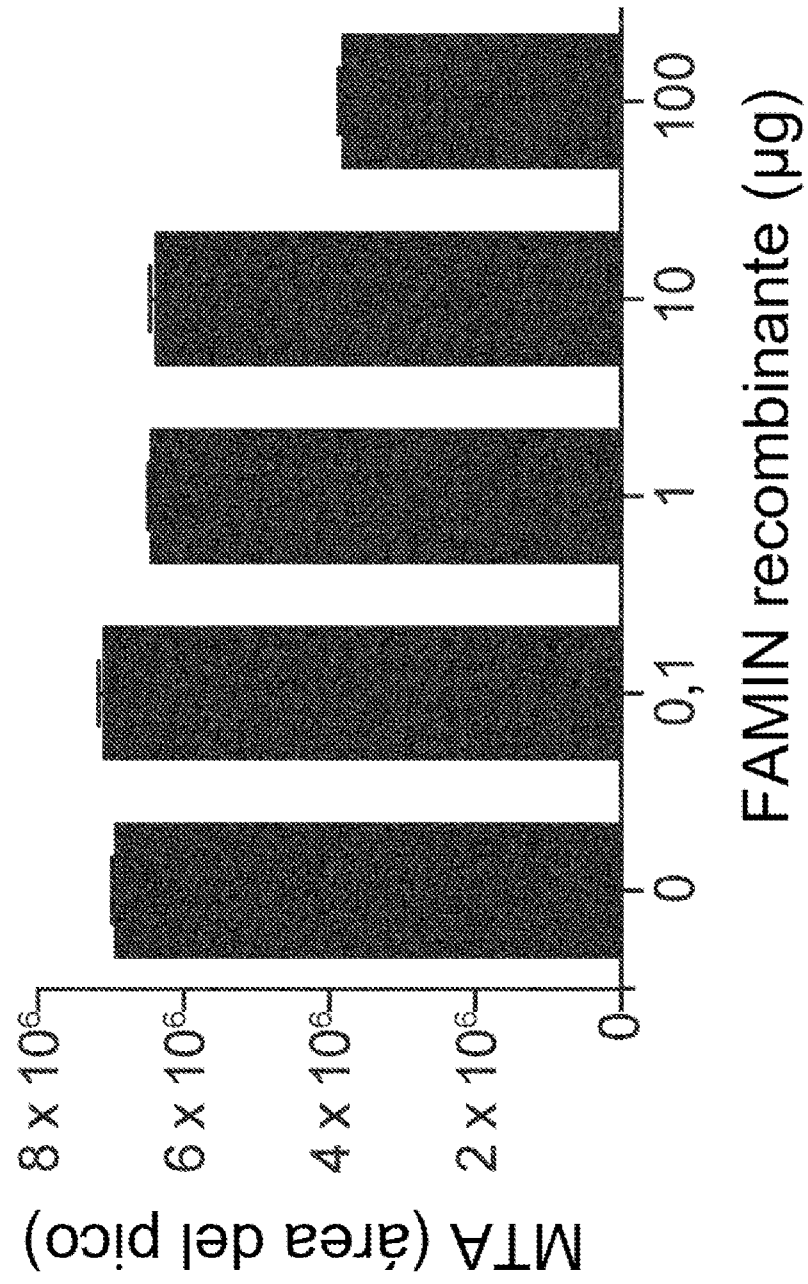


FIGURA 2U



FIGURA 2V

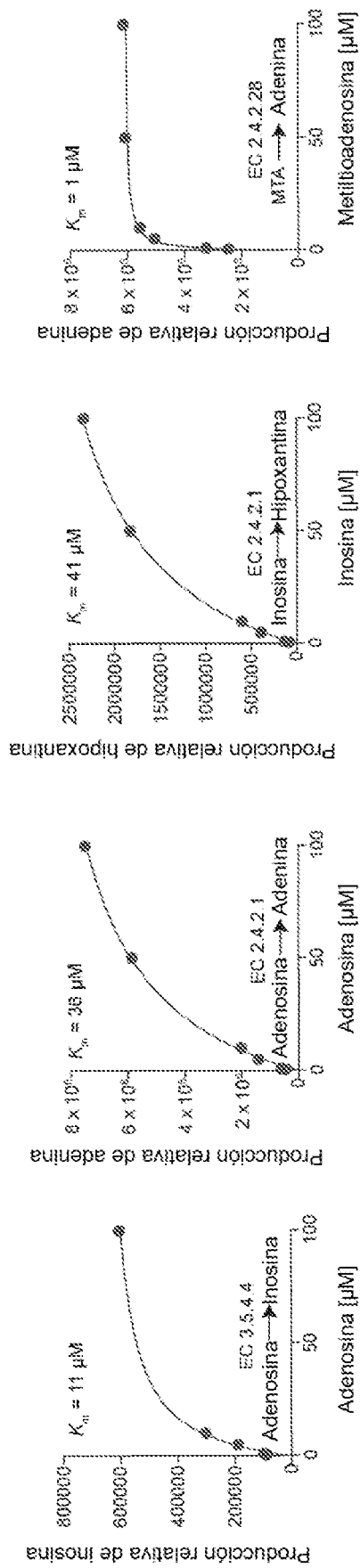


FIGURA 3A

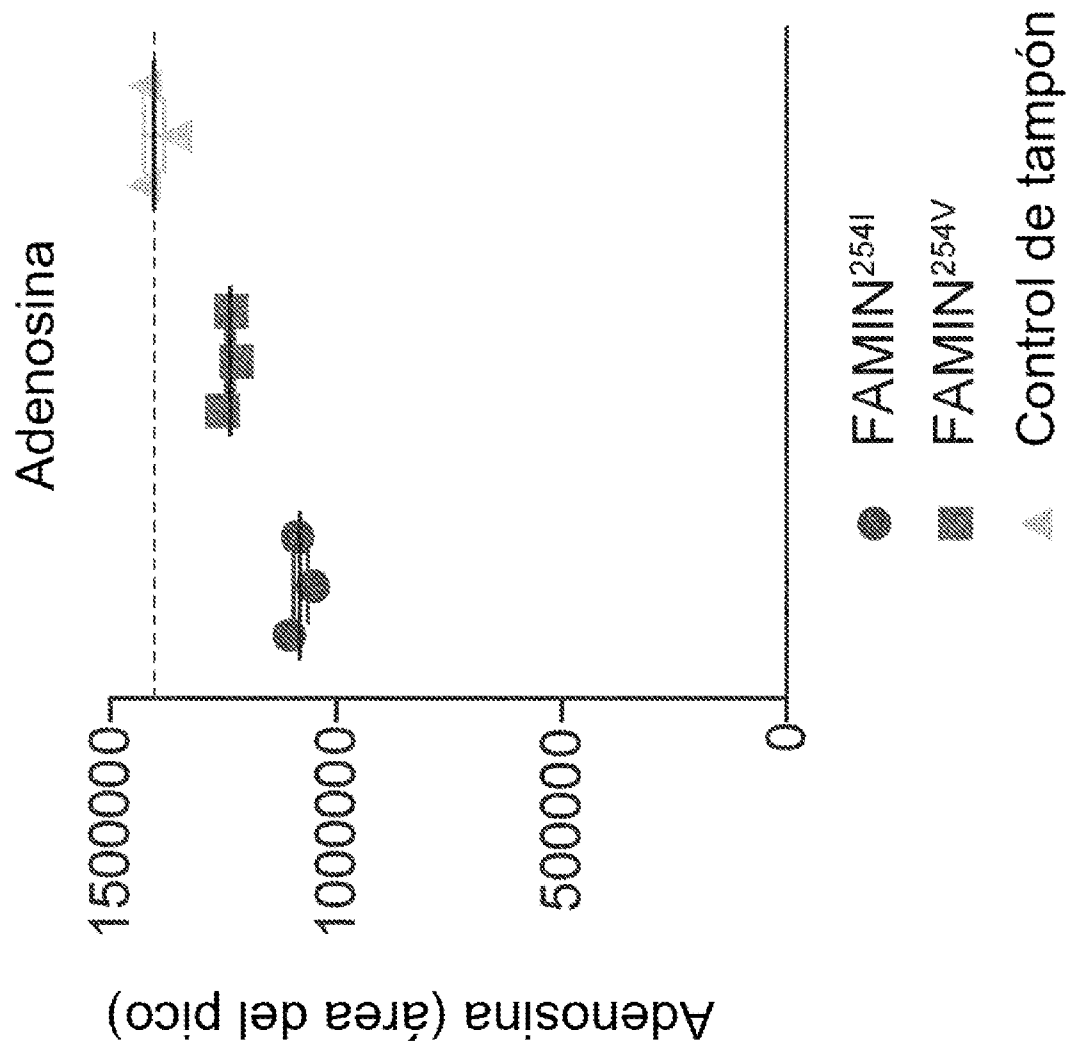


FIGURA 3B

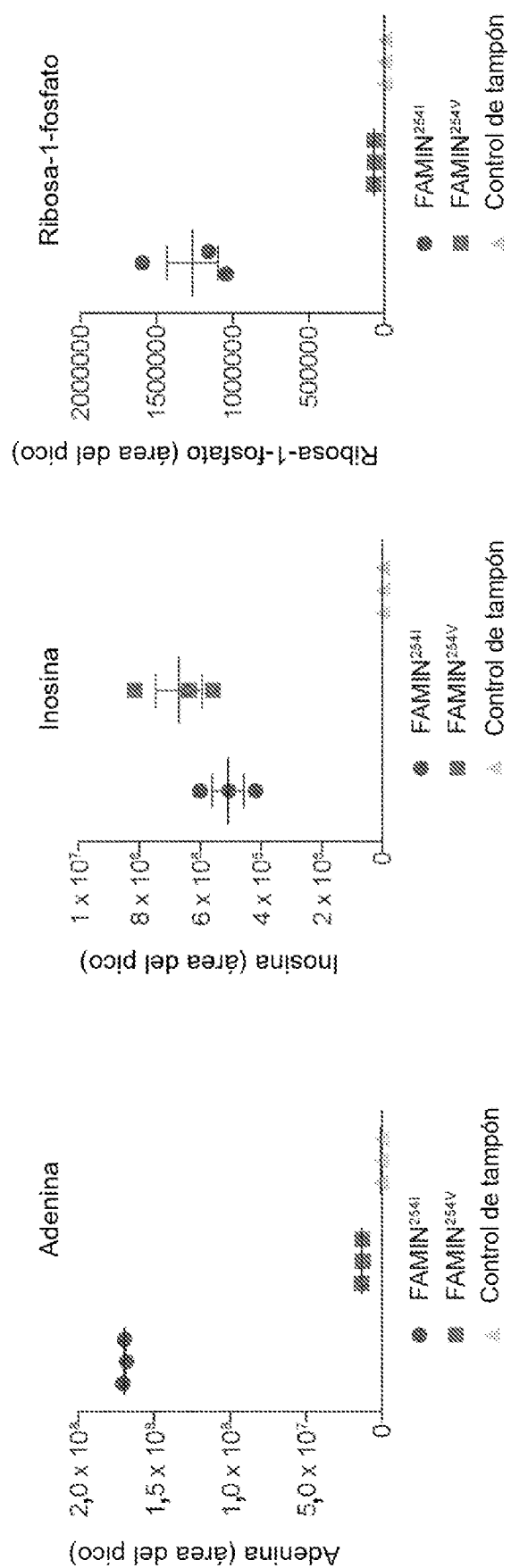


FIGURA 3C

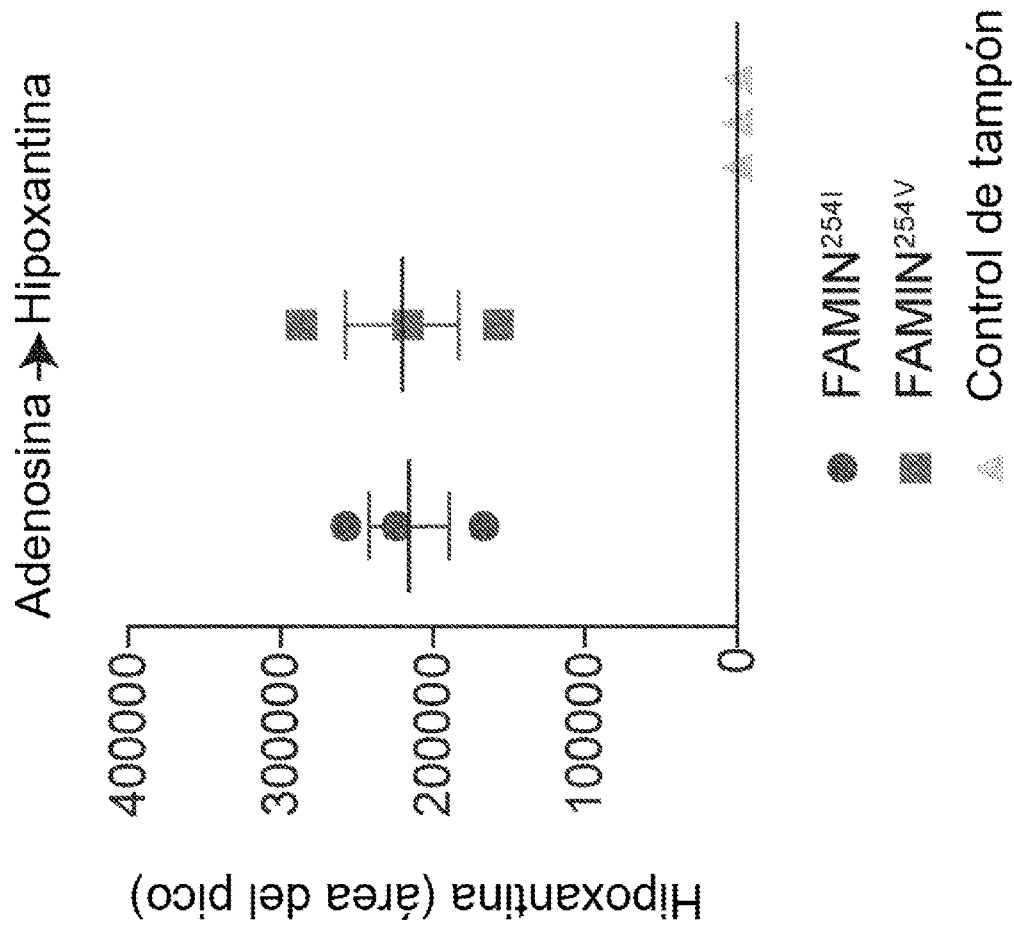


FIGURA 3D

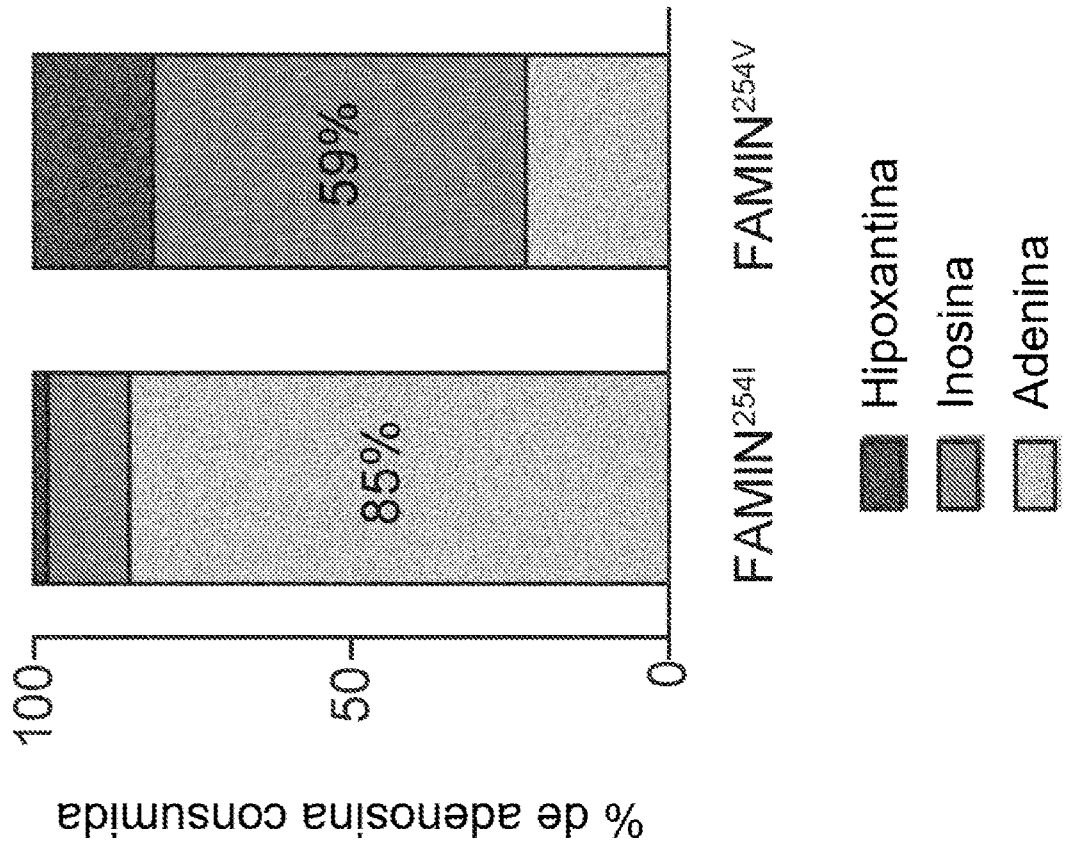


FIGURA 3E

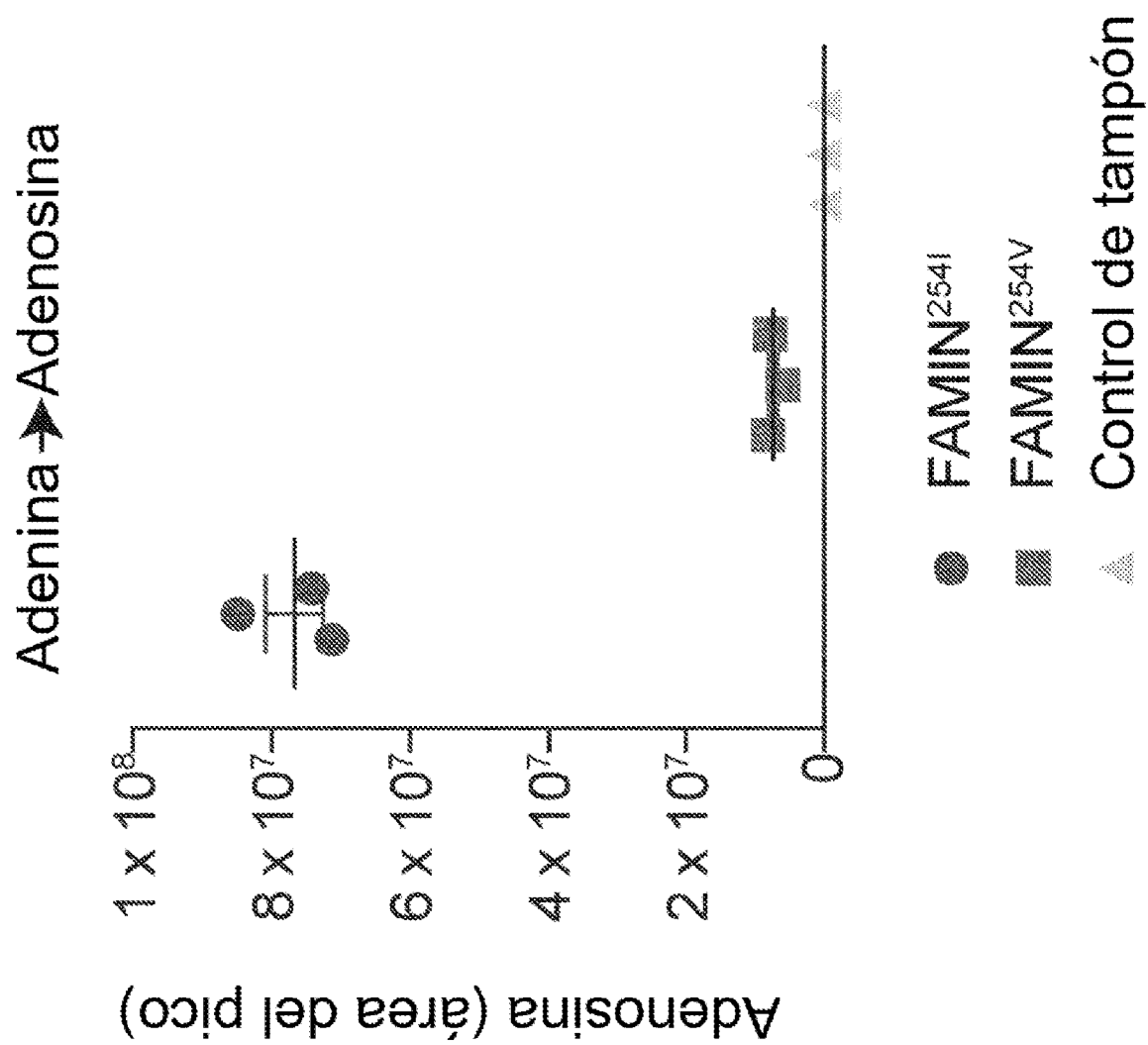


FIGURA 3F

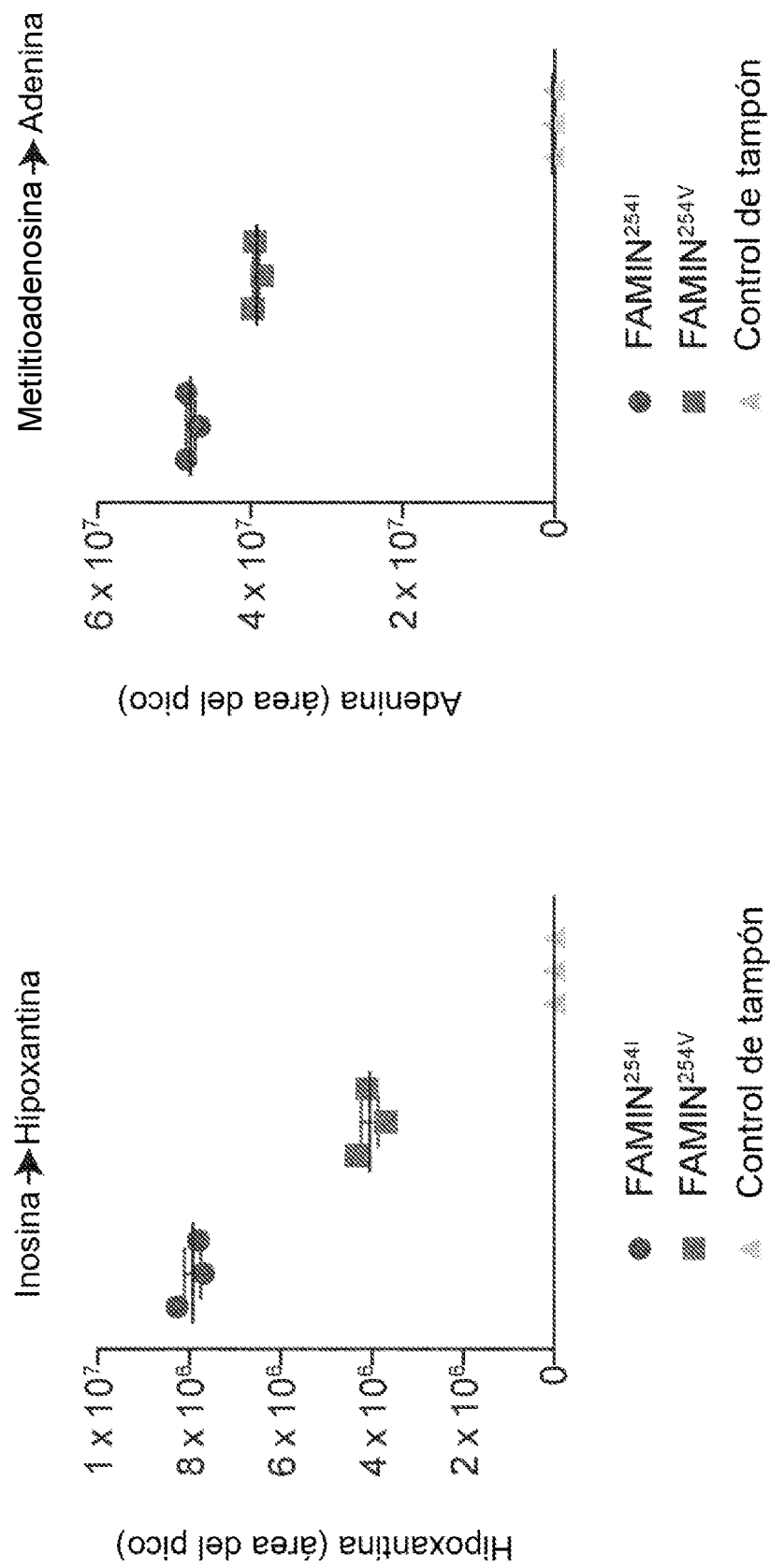


FIGURA 3G

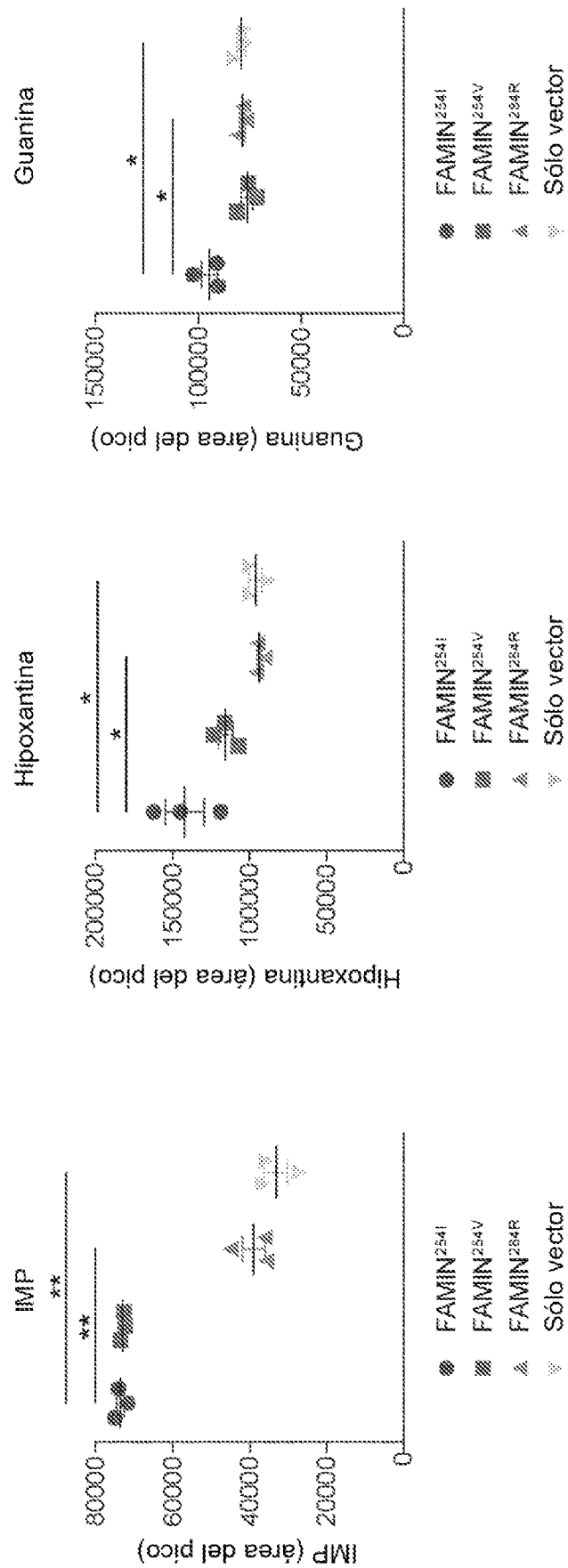


FIGURA 3H

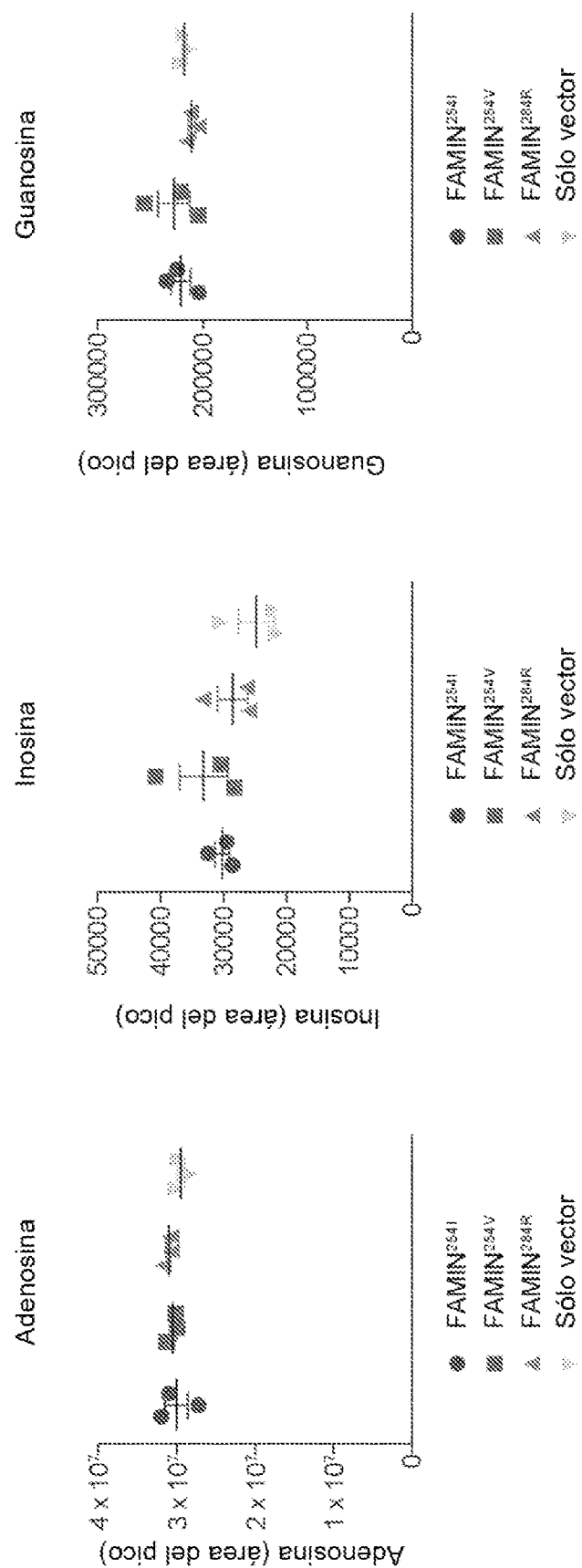


FIGURA 3I

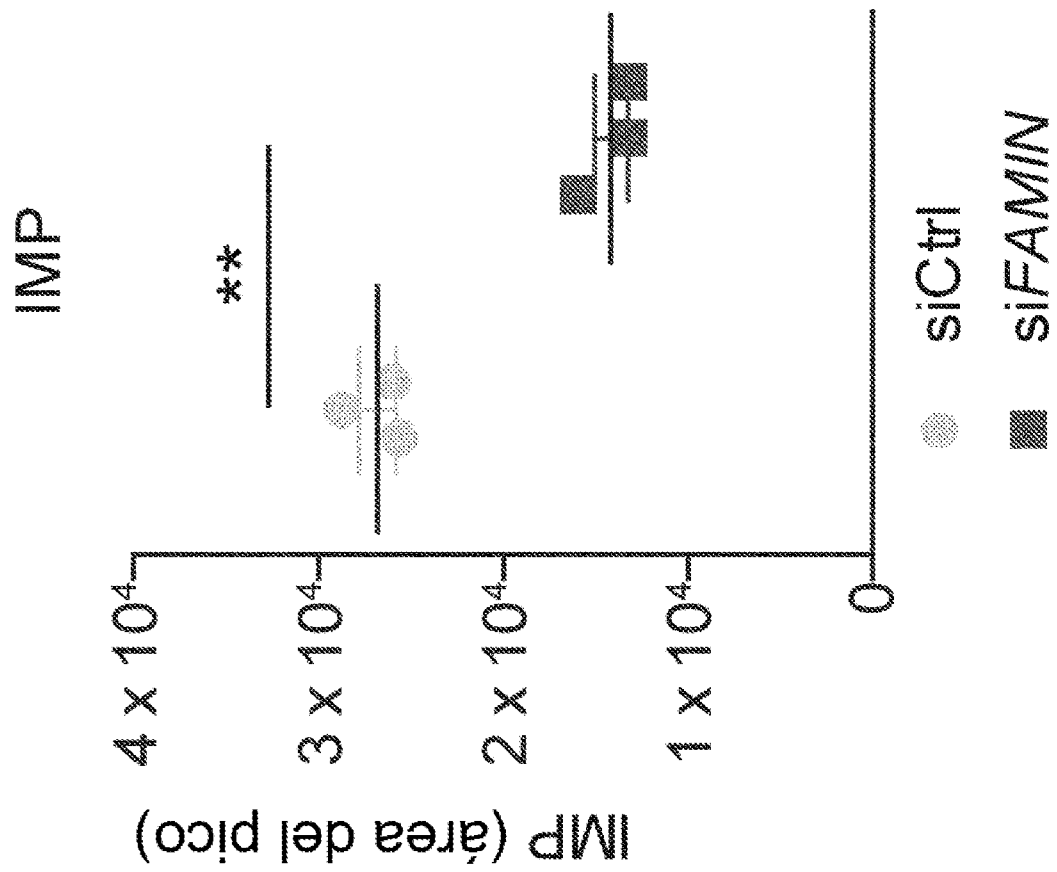


FIGURA 3J

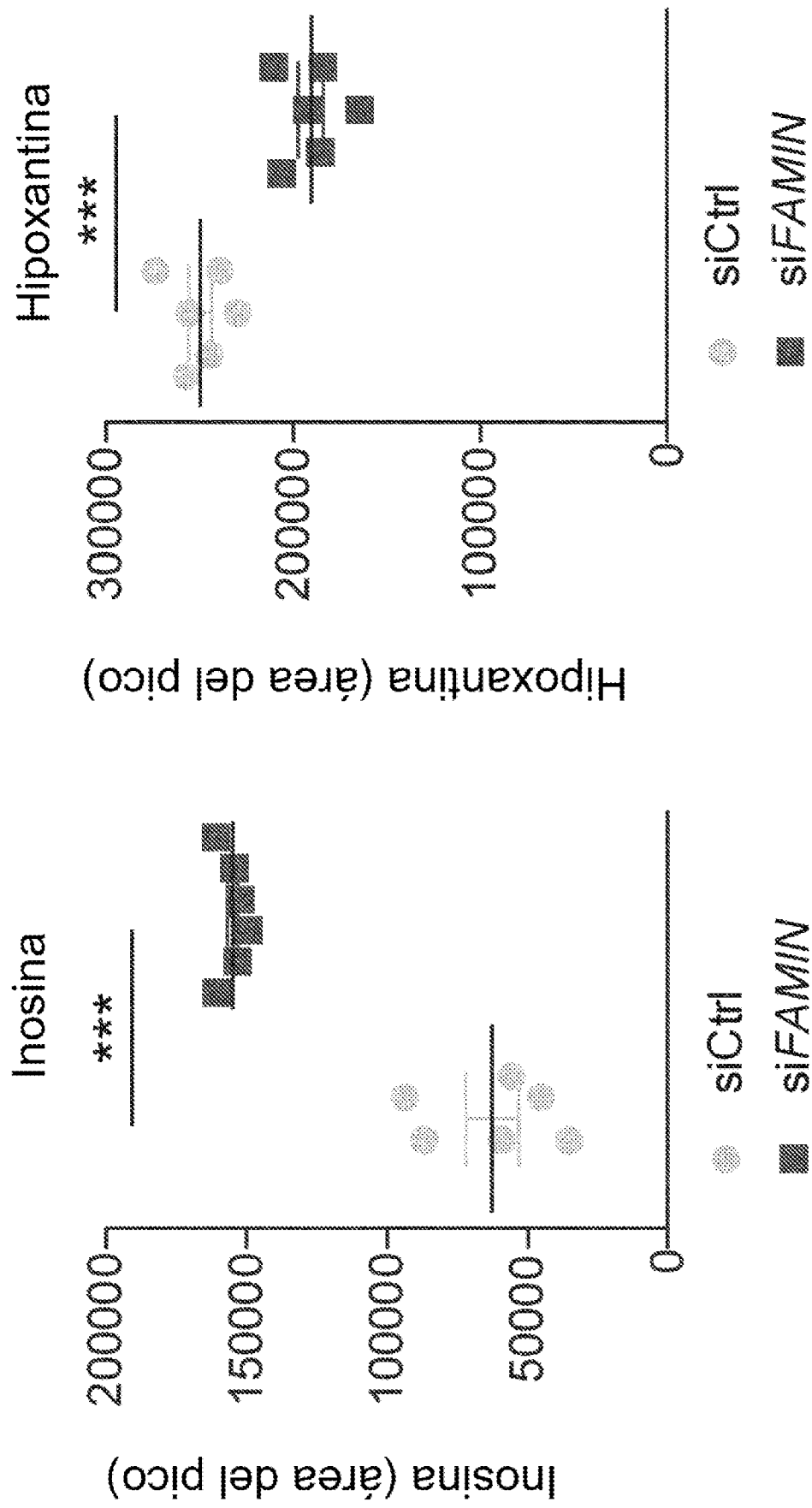


FIGURA 3K

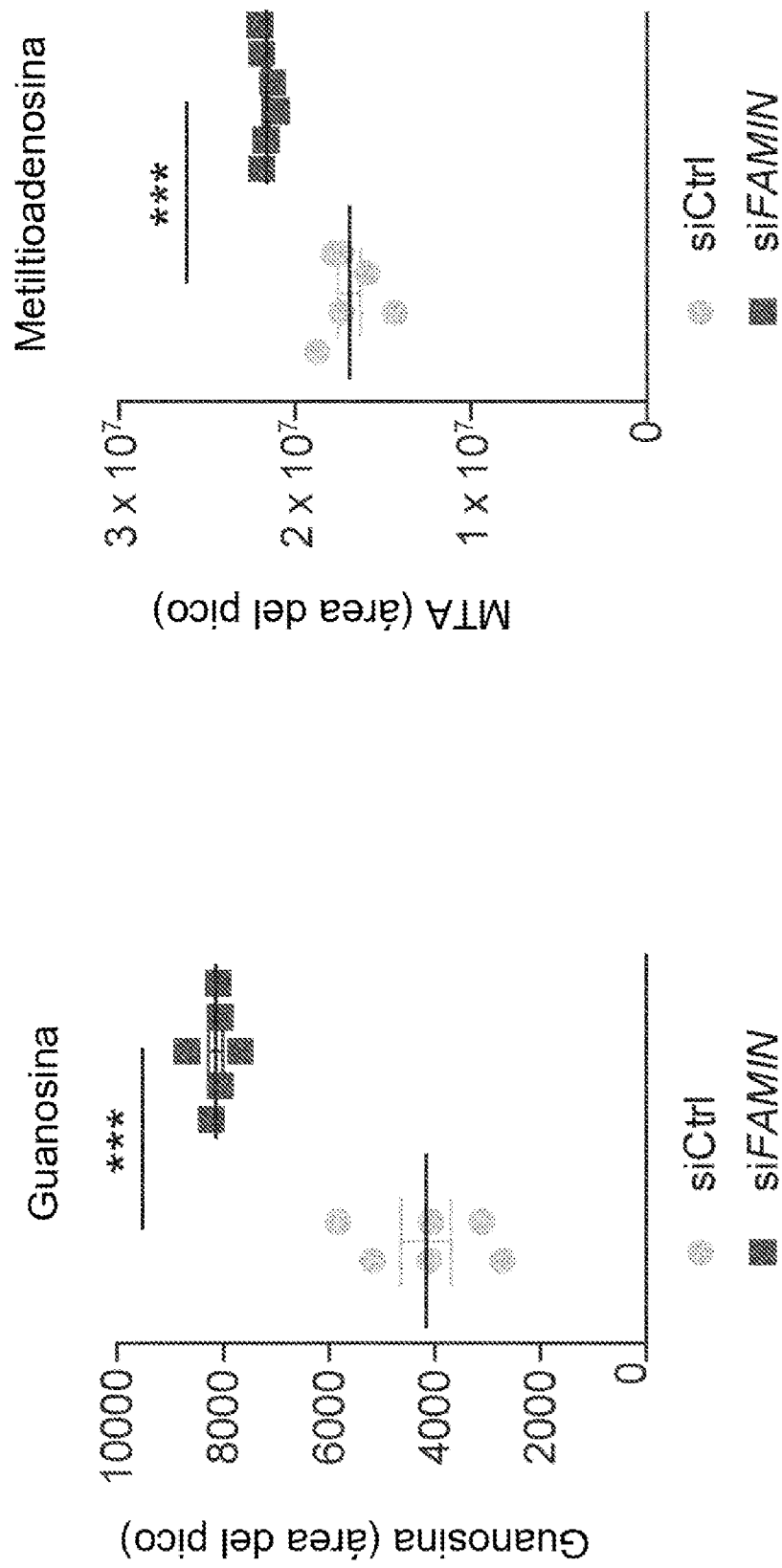


FIGURA 3L

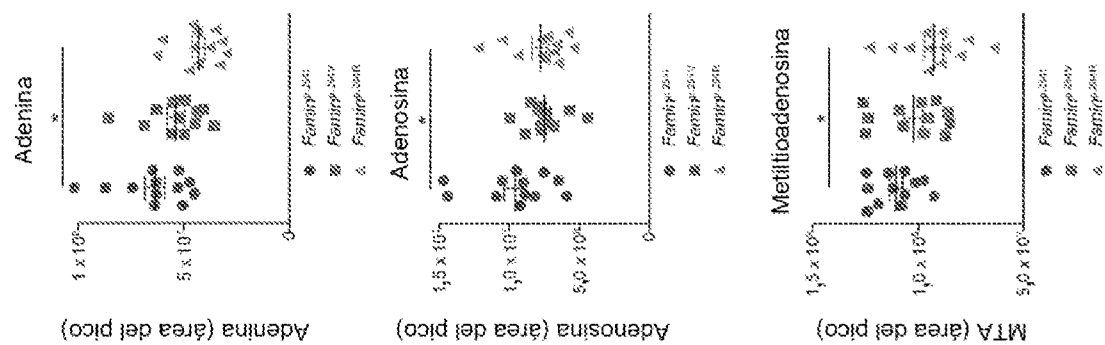


FIGURA 4A

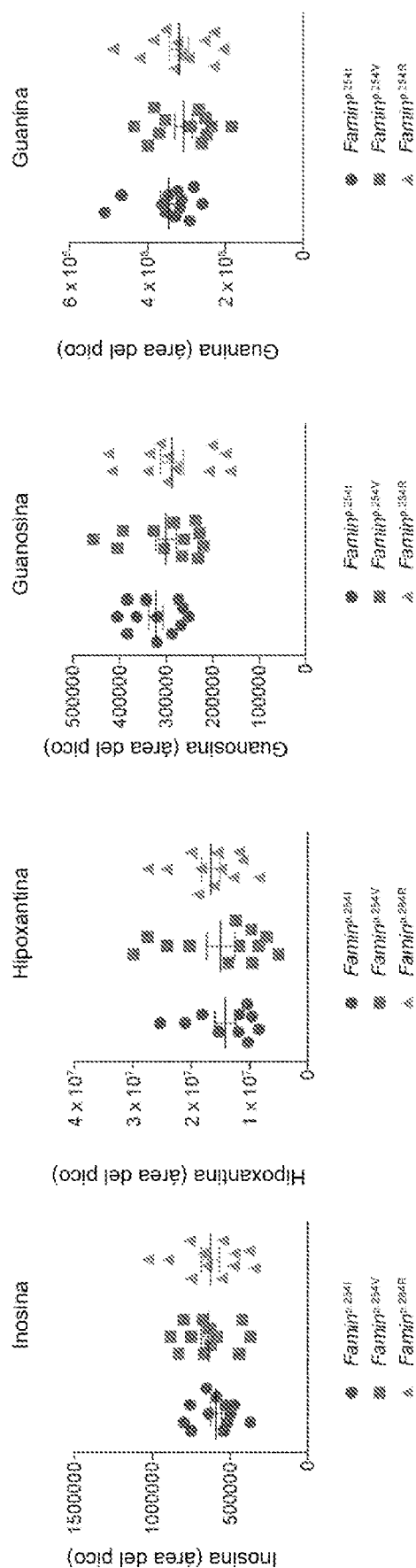


FIGURA 4B

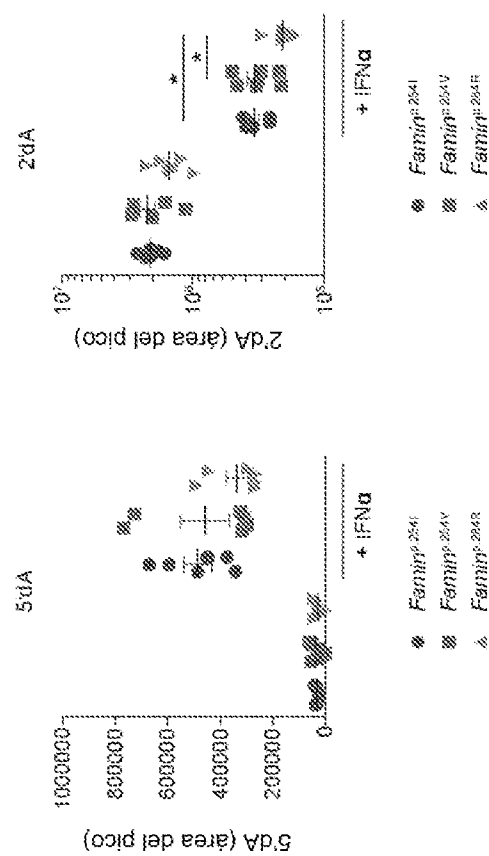


FIGURA 4C

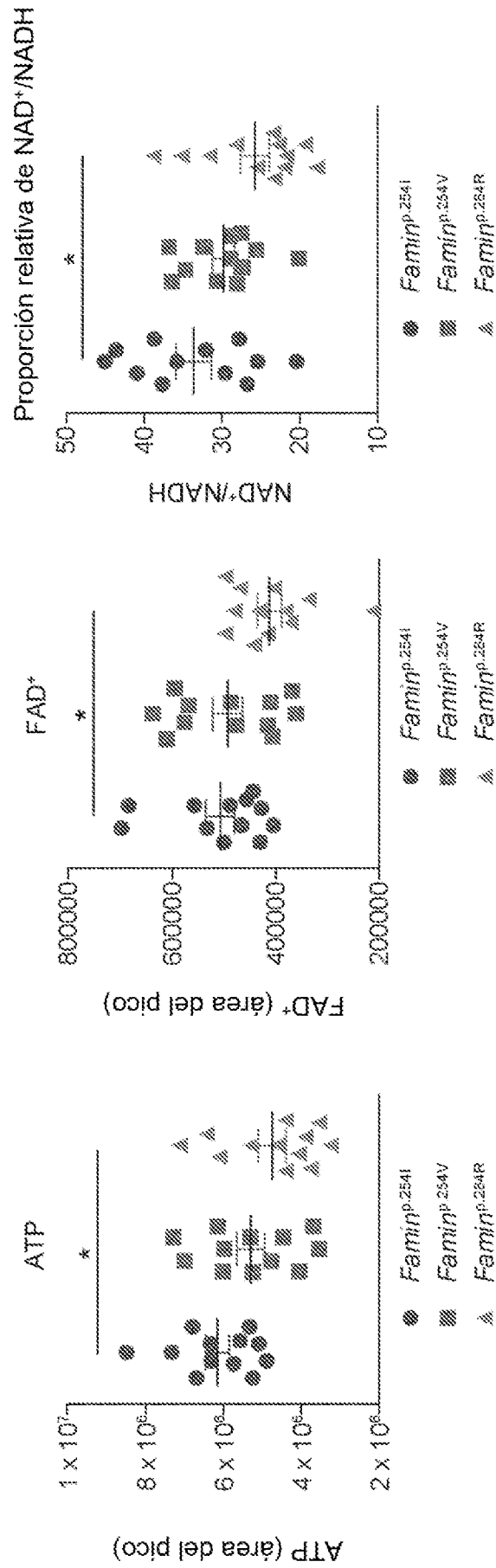


FIGURA 4D

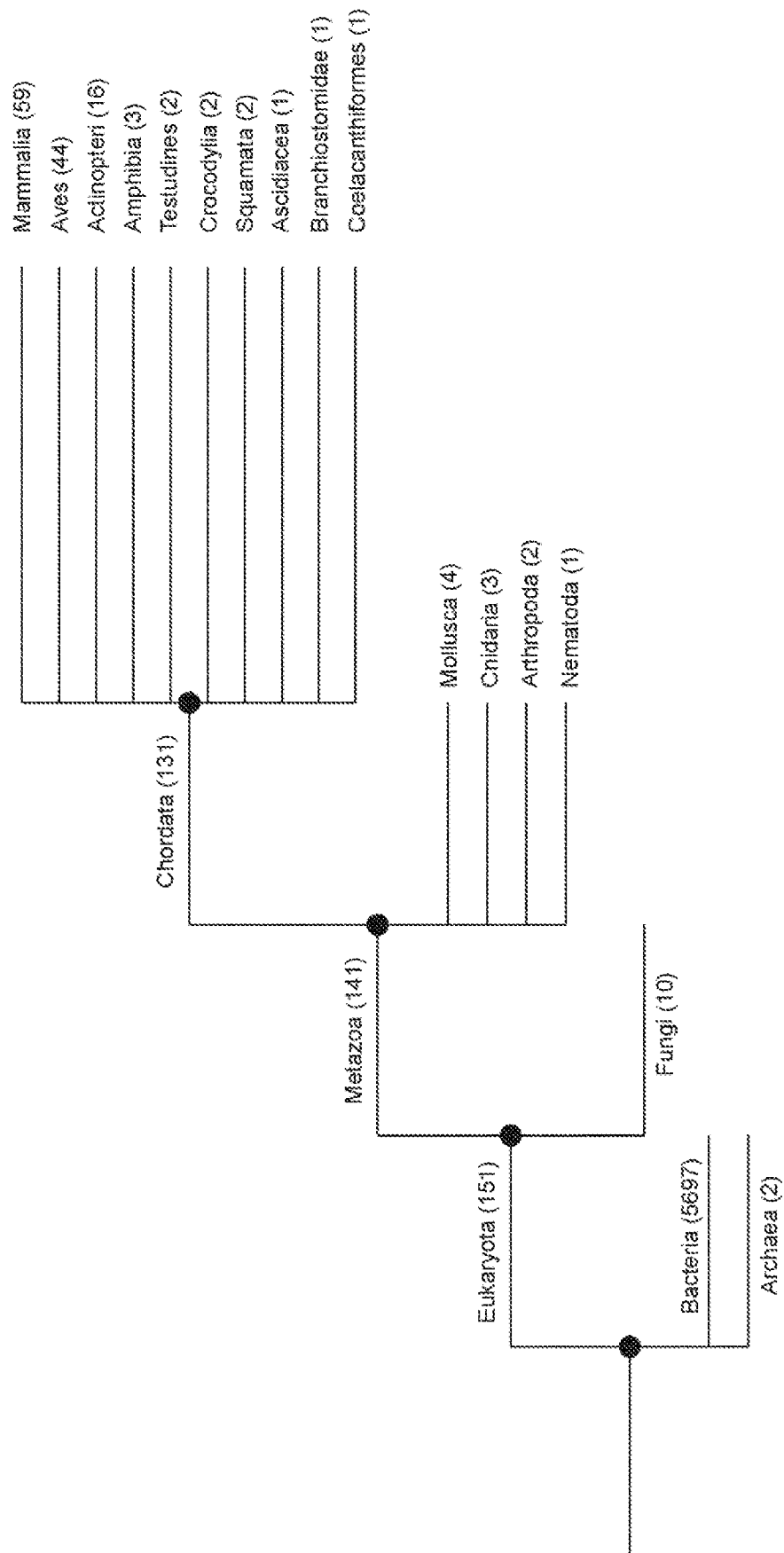
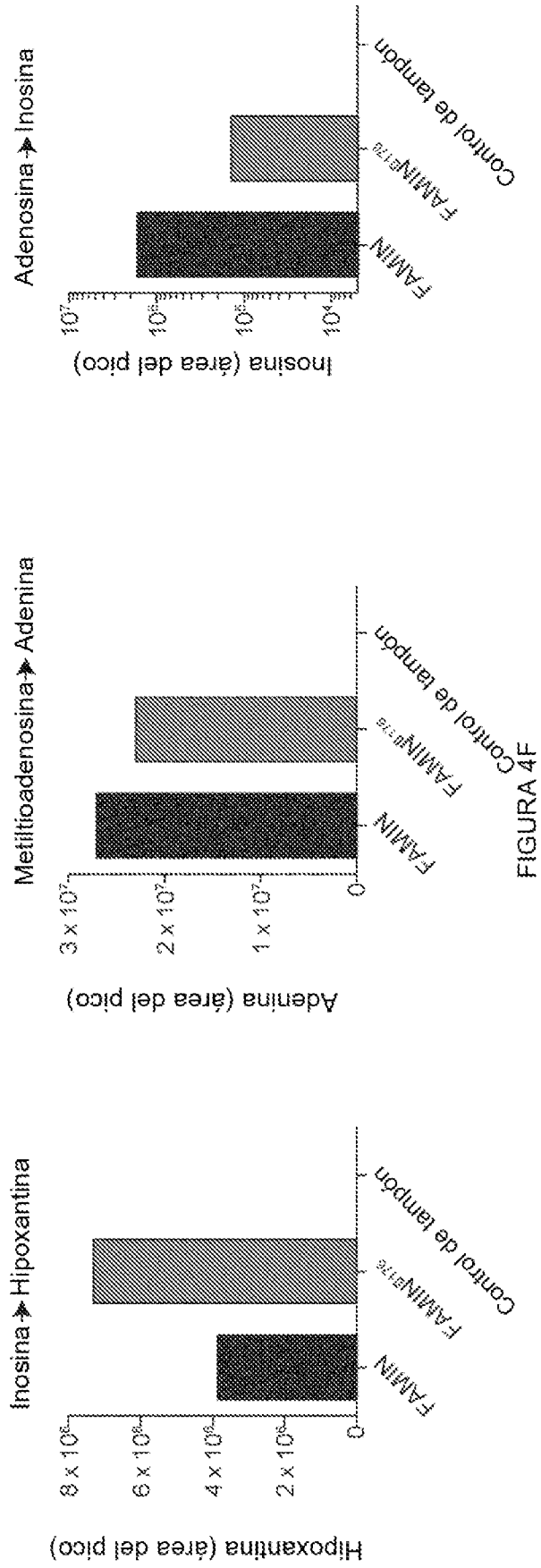


FIGURA 4E



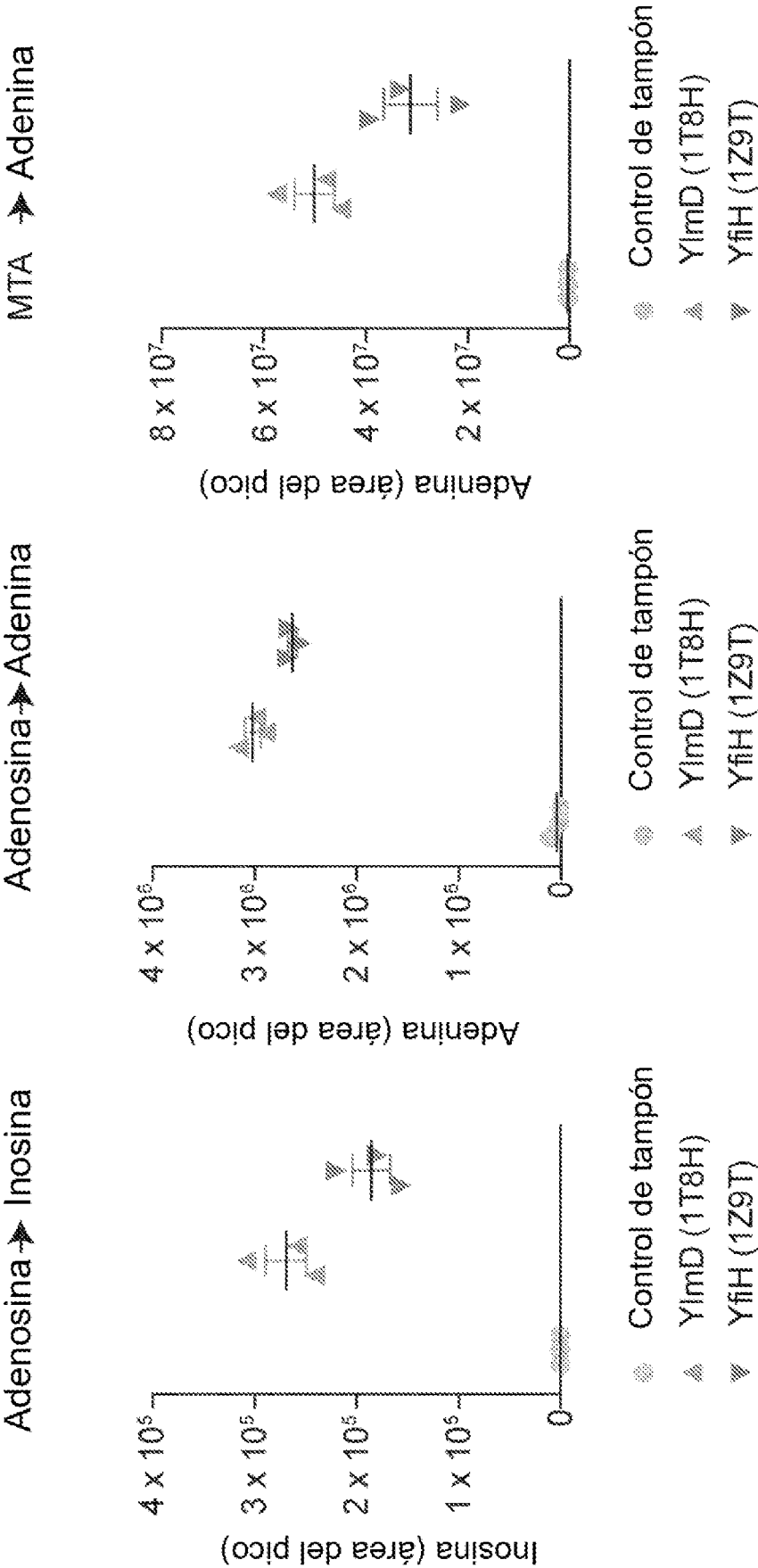
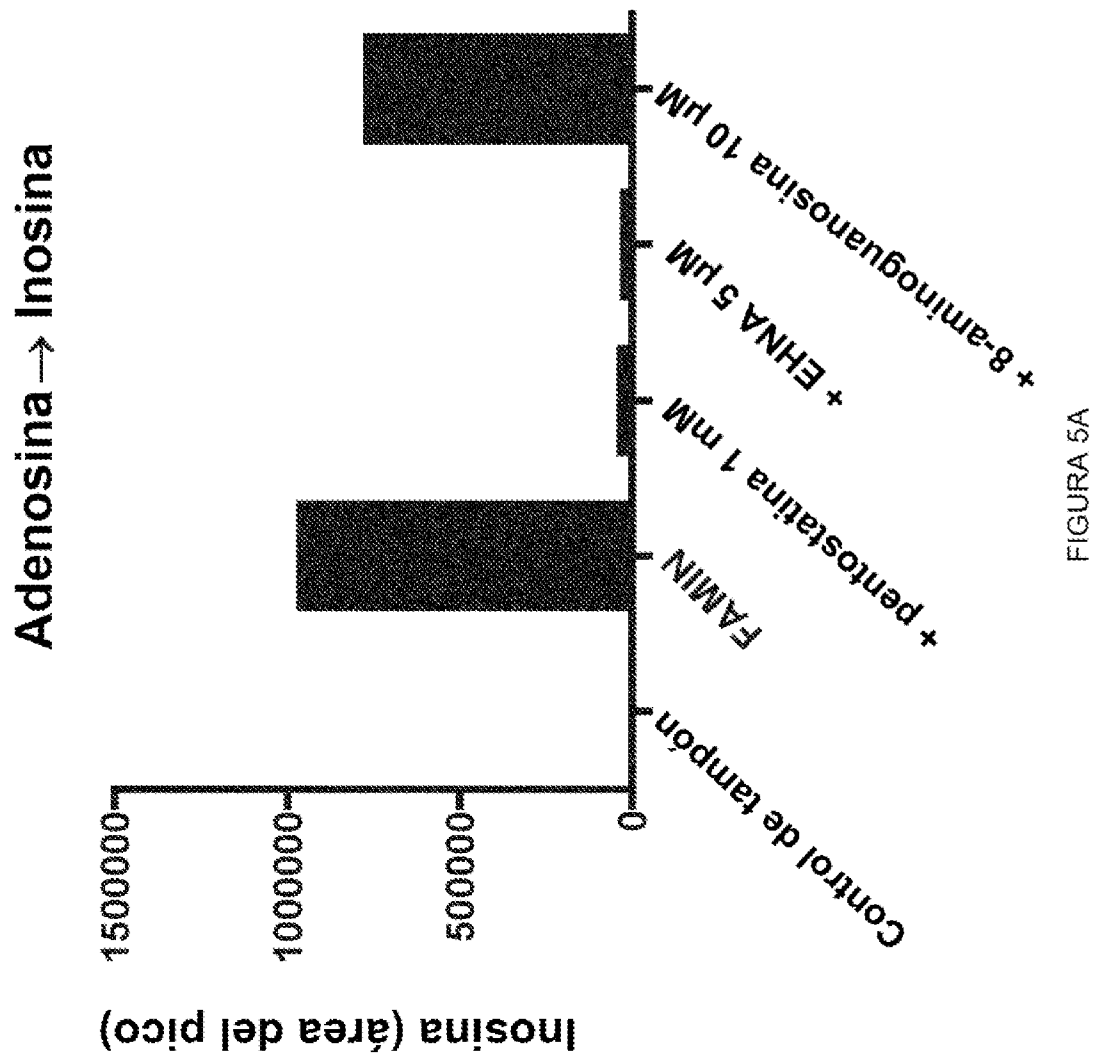


FIGURA 4G



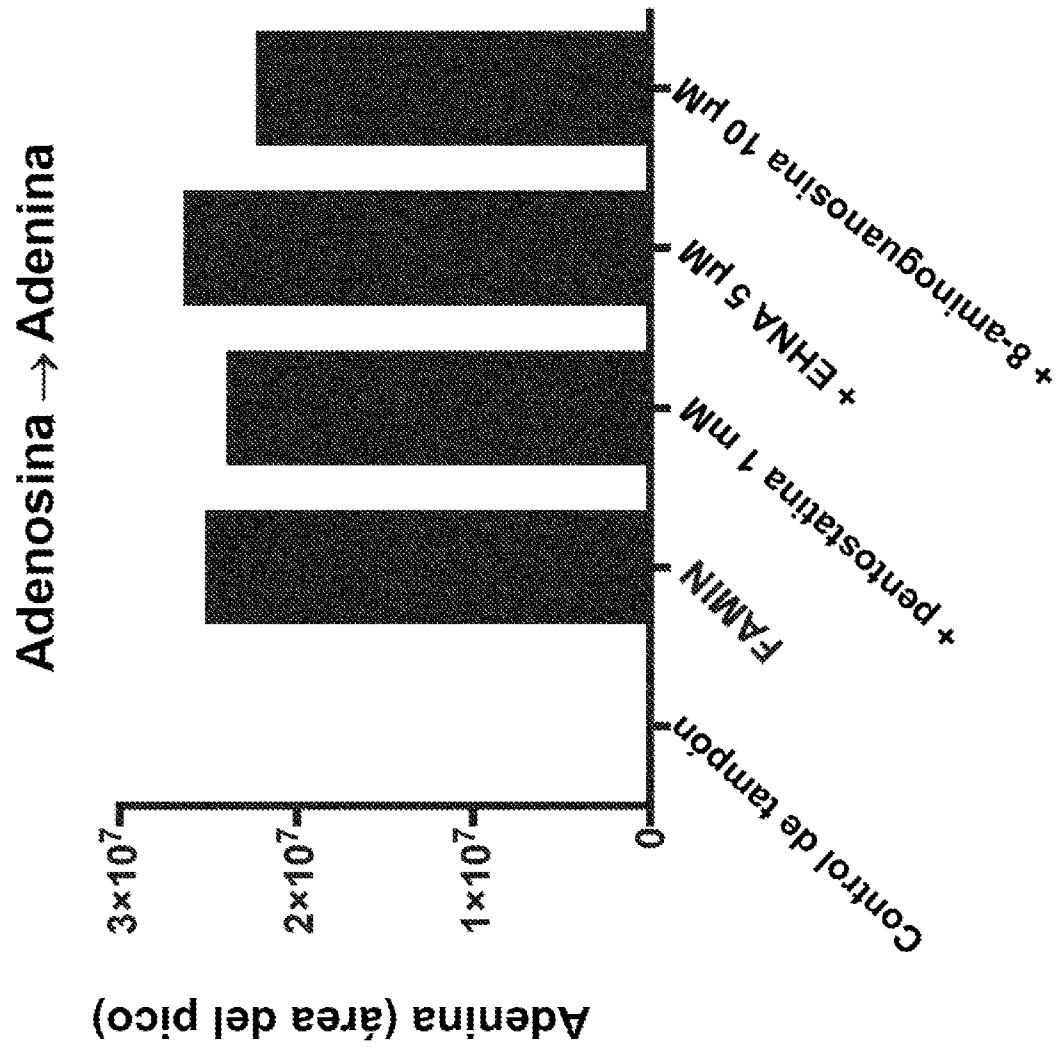


Figura 5B

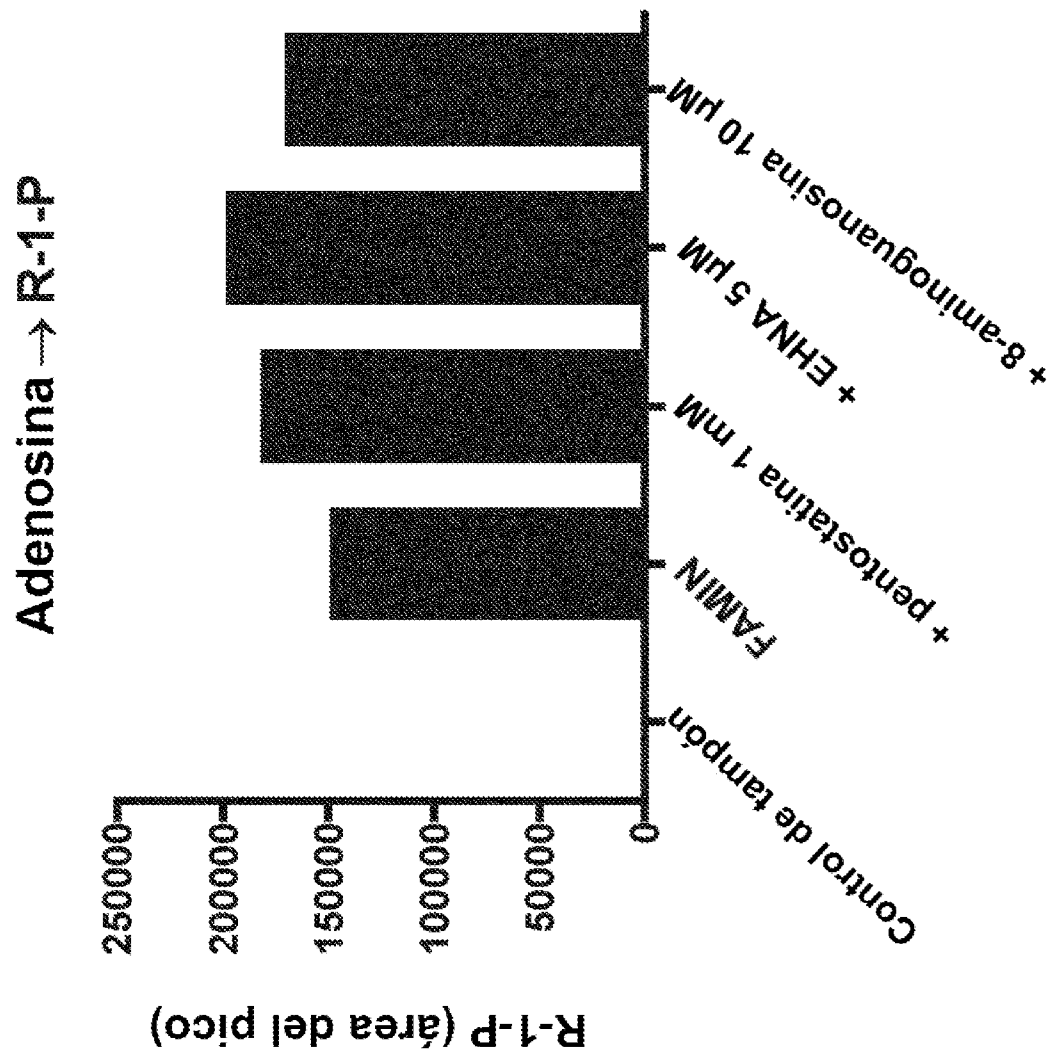


Figura 5C

