(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 936 072**

(51) Int. CI.:

A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 9/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2017 PCT/GB2017/050227**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17130003**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2017 E 17703216 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3407977**

(54) Título: **Métodos de diagnóstico y pronóstico para el cáncer y enfermedad metastásica, y biomarcadores para estas afecciones**

(30) Prioridad:

28.01.2016 GB 201601585

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2023

(73) Titular/es:

NEURO-BIO LTD (100.0%)
Building F5, Culham Science Centre
Abingdon, Oxfordshire OX14 3DB, GB

(72) Inventor/es:

GREENFIELD, SUSAN;
TU, HENRY;
MORRILL, PAUL;
GARCIA-RATES, SARA;
PEPPER, CHRIS y
FEGAN, CHRIS

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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 diagnóstico y pronóstico para el cáncer y enfermedad metastásica, y biomarcadores para estas afecciones

Esta divulgación se refiere al cáncer y, en particular, a nuevas composiciones farmacéuticas, terapias y métodos para tratar, prevenir o mejorar el cáncer y, especialmente, enfermedad metastásica. La invención se relaciona con métodos de diagnóstico y pronóstico para cáncer y enfermedad metastásica, y biomarcadores para estas afecciones.

El cáncer y los tumores malignos forman un grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o diseminarse a otras partes del cuerpo, es decir, metástasis. En 2012, se produjeron aproximadamente 14 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un diagnóstico y terapias mejoradas para el tratamiento del cáncer y la metástasis.

La acetilcolinesterasa (AChE) se expresa en diferentes etapas de desarrollo en varias formas, todas las cuales tienen una actividad enzimática idéntica, pero que tienen una composición molecular muy diferente. La 'cola' (T-AChE - SEQ ID No: 1) se expresa en las sinapsis y los inventores identificaron previamente dos péptidos que podrían escindirse del extremo terminal C, uno denominado como "T14" (SEQ ID No: 3), dentro de la otra que se conoce como "T30" (SEQ ID No: 2), y que tienen una fuerte homología de secuencia con la región comparable de β-amiloide. El péptido "T14" del extremo terminal C de AChE ha sido identificado como la parte sobresaliente de la molécula de AChE responsable de su gama de acciones no hidrolíticas. El análogo peptídico sintético de 14 aminoácidos (es decir, "T14") y, posteriormente, la secuencia de aminoácidos más grande, más estable y más potente en la que está incrustado (es decir, "T30" - SEQ ID No: 3) muestra acciones comparables a las notificadas para la AChE 'no colinérgica', mientras que el residuo inerte dentro de la secuencia de T30 (es decir, "T15" - SEQ ID No: 4) queda sin efecto.

El péptido T14 se une a un sitio alostérico en el receptor nicotínico α7, en la que, por sí solo, no tiene efecto. Sin embargo, en presencia de un ligando primario, como la acetilcolina o la colina de la dieta, la T14 aumenta la entrada de calcio inducida por estos agentes primarios. El exceso de calcio puede ser absorbido por las mitocondrias, en la que compromete la fosforilación oxidativa y provoca una fuga de electrones. En consecuencia, se forman radicales libres que luego desestabilizan la membrana y la célula muere.

Los inventores investigaron los niveles del péptido T14 tóxico, el receptor nicotínico α7 y las proteínas de acetilcolinesterasa utilizando transferencia Western en lisado celular y medios de cultivo celular de siete líneas celulares de cáncer (MEC-1, KG1a, H929, MCF-7, MDA-MB 231, CLL y JJN3). Descubrieron que solo el péptido T14 tóxico se liberaba de las células cancerosas y que las concentraciones de T14 eran más altas fuera de las células que los niveles de T14 dentro de las células cancerosas. A continuación, los inventores continuaron investigando la relación entre el marcador metastásico conocido CD44 con el péptido T14 tóxico, AChE, y el receptor nicotínico α7 en fracciones de membrana y citosol de líneas celulares cancerosas. Se sorprendieron al observar que CD44 está significativa y positivamente correlacionado con la molécula tóxica T14. En conjunto, estos datos sugieren fuertemente que el péptido tóxico T14, incluidas sus rutas metabólicas y de biosíntesis, representa un buen objetivo para tratar el cáncer y la metástasis y, además, que el propio T14 actúa como un biomarcador sólido para la metástasis del cáncer. El documento WO97/35962 divulga un péptido de la SEQ ID No: 3 y un inhibidor del péptido, que puede ser un anticuerpo. El documento WO97/35962 también da a conocer que la AChE completa puede estar asociada con el cáncer. El documento WO01/73446 divulga un inhibidor del péptido de la SEQ ID No: 3 y una detección para encontrar dicho inhibidor. El documento WO02/42778 divulga el péptido de la SEQ ID No: 3 y divulga la detección de compuestos que inhiben el péptido. Cottingham et al., "The intact human acetylcholinesterase C-terminal oligomerization domain is alpha-helical in situ and in isolation, but a shorter fragment forms beta-sheet-rich amyloid fibrils and protofibrillar oligomers", Biochemistry; vol. 42, núm. 36, 2013, páginas 10863-10873 divulga T14 y un anticuerpo producido contra T14. Organer et al., "An acetylcholinesterase-derived peptide inhibits endocytic membrane activity in a human metastatic breast cancer cell line", vol. 1760, núm. 3, 2006, páginas 415-420, divulga que el péptido AChE de 14 mer puede afectar a las células metastásicas de cáncer de mama, cuando se añade exógenamente a las mismas.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar a un individuo que padece cáncer o enfermedad metastásica, o tiene una predisposición al mismo, o para proporcionar un pronóstico de la afección de un individuo, comprendiendo el método detectar, en una muestra obtenida del individuo, la presencia de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, en la que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, significa que el individuo sufre de cáncer o enfermedad metastásica, o tiene predisposición a padecerla, o la afección del individuo tiene un pronóstico negativo.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit para usar en el diagnóstico de un sujeto que padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a la misma, o para proporcionar un pronóstico de la afección del sujeto, el kit comprende medios de detección para determinar la concentración de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, presente en una muestra de un sujeto de prueba, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento

o variante del mismo que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, en la muestra sugiere que el sujeto padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a ello.

Esta divulgación proporciona un inhibidor de la síntesis y/o actividad de un péptido de la SEQ ID No: 3, para uso en el tratamiento, mejora o prevención del cáncer o enfermedad metastásica.

Esta divulgación proporciona un método para tratar, mejorar o prevenir el cáncer o la enfermedad metastásica en un sujeto, comprendiendo el método, administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la síntesis y/o actividad de un péptido de la SEQ ID No: 3.

Como se describe en el Ejemplo 1, los inventores detectaron los niveles del péptido T14 tóxico (SEQ ID No: 3), el receptor nicotínico alfa-7 y las proteínas de acetilcolinesterasa (AChE) usando transferencia Western en lisado celular y medios de cultivo celular de siete líneas celulares de cáncer (MEC-1, KG1a, H929, MCF-7, MDA-MB 231, CLL y JJN3), y linfocitos B normales actuando como control. Las células MDA-MB-231, KG1a y MEC-1 son líneas celulares de cáncer altamente migratorias, mientras que H929, JJN3, CLL y MCF-7 son líneas celulares de cáncer menos migratorias, y los linfocitos B son células normales no cancerosas. Se detectaron dentro de las células cancerosas T14, receptores alfa 7 y AChE. Sorprendentemente, las tres proteínas tienen una movilidad similar y sus niveles se correlacionan positivamente entre sí, lo que sugiere que forman complejos entre sí. Sin embargo, fuera de las células cancerosas (es decir, dentro de los medios de cultivo celular), solo se detectó el péptido T14 tóxico. Aún más sorprendente fue que los niveles de T14 eran más altos fuera de las células que dentro de seis de las siete líneas de células cancerosas, lo que sugiere que T14 se produce para ser liberado de la célula. Los inventores también se sorprendieron al ver que los niveles de T14 fuera de las células cancerosas estaban significativamente correlacionados negativamente con los niveles del receptor alfa-7 dentro de las células cancerosas.

El Ejemplo 2 describe el uso de Transferencia Western para mostrar la relación entre el conocido marcador metastásico CD44 con el péptido T14 tóxico, AChE, y el receptor alfa-7 en fracciones de membrana y citosol de seis líneas celulares de cáncer (JJN3, MDA-MB231, MCF-7, KG1a, MEC-1 y H929) y también una línea celular derivada del cáncer (PC12). En todas las líneas de células cancerosas, el marcador metastásico (CD44) está significativa y positivamente correlacionado con la molécula tóxica T14, y esta correlación es válida tanto dentro de la membrana de la célula cancerosa como dentro del citosol de la célula cancerosa. Estos hallazgos sugieren fuertemente que T14 es un buen predictor del grado de cáncer y metástasis, es decir, la migración de células tumorales.

El cáncer, que se trata, puede ser leucemia. Por ejemplo, el cáncer puede ser leucemia linfocítica o leucemia linfocítica crónica (CLL). El cáncer puede ser leucemia mieloide o leucemia mieloide aguda. El cáncer puede ser mieloma múltiple. El cáncer puede ser cáncer de mama. El cáncer puede ser plasmacitoma.

Lo más preferiblemente, el inhibidor de la síntesis y/o actividad del péptido T14 (SEQ ID No: 3) de esta divulgación, es para uso en el tratamiento, mejora o prevención de enfermedad metastásica o metástasis.

La acetilcolinesterasa es una serina proteasa que hidroliza la acetilcolina, y será bien conocida por el experto en la materia. La forma principal de acetilcolinesterasa, que se encuentra en el cerebro, se conoce como acetilcolinesterasa de cola (T-AChE). La secuencia de proteína de un ejemplo de acetilcolinesterasa de cola humana (Gen Bank: AAA68151.1) tiene una longitud de 614 aminoácidos y se proporciona en el presente documento como la SEQ ID No: 1, como sigue:

```
  1 mrppqcllht pslaspllll llwllgggvg aegredaell vtvrggrlrg irlktpggpv
 61 saflgipfae ppmgprrflp pepkqpwsgv vdattfqsvc yqyvdtlypg fegtemwnpn
121 relsedclyl nvwtpyprpt sptpvlvwiy gggfysgass ldvydgrflv qaertvlvsm
181 nyrvgafgfl alpgsreapg nvglldqrla lqwvqenvaa fggdptsvtl fgesagaasv
241 gmhllsppsr glfhravlqs gapngpwatv gmgearrrat qlahlvgcpp ggtggndtel
301 vaclrtrpaq vlvnhewhvl pqesvfrfsf vpvvdgdfls dtpealinag dfhglqvlvg
361 vvkdegsyfl vygapgfskd neslisraef lagvrvgvpq vsdlaaeavv lhytdwlhpe
421 dparlreals dvvgdhnvvc pvaqlagrla aqgarvyayv fehrastlsw plwmgvphgy
481 eiefifgipl dpsrnytaee kifaqrlmry wanfartgdp neprdpkapq wppytagaqq
541 yvsldlrple vrrglraqac afwnrflpkl lsatdtldea erqwkaefhr wssymvhwkn
601 qfdhyskqdr csdl
```

[SEQ ID No:1]

Se apreciará que los primeros 31 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No:1 se eliminan mientras se libera la proteína, dejando así una secuencia de 583 aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de T30 (que corresponde a los últimos 30 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1) se proporciona en este documento como la SEQ ID No: 2, como sigue: -
KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL [SEQ ID No: 2]

La secuencia de aminoácidos del péptido T14 tóxico (que corresponde a los 14 residuos de aminoácidos ubicados hacia el final de la SEQ ID No: 1, y carece de los 15 aminoácidos finales que se encuentran en T30) se proporciona en este documento como la SEQ ID No: 3, como sigue: -

AEFHRWSSYMVHWK [SEQ ID NO: 3]

La secuencia de aminoácidos de T15 (que corresponde a los últimos 15 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No: 1) se proporciona en este documento como la SEQ ID No: 4, como sigue: -
NQFDHYSKQDRCSDL [SEQ ID NO: 4]

Los inventores han descubierto que se requiere la inhibición del péptido T14 tóxico para el tratamiento eficaz del cáncer o la metástasis. Los inhibidores pueden usarse para prevenir el desarrollo de cáncer o el desarrollo y propagación de metástasis. Por ejemplo, los inhibidores pueden administrarse a sujetos que están en riesgo (p. ej., una predisposición genética o exposición ambiental adversa) de desarrollar cáncer o metástasis. Los inhibidores también se pueden usar después de cirugía, radioterapia o quimioterapia para evitar que el cáncer se restablezca en un sujeto.

Los inventores han demostrado que el péptido T14 tóxico se une a un sitio alostérico en el receptor nicotínico α7, en la que, por sí solo, no tiene efecto sobre la célula. Sin embargo, en presencia de un ligando primario, como la acetilcolina o la colina dietética, T14 aumenta la entrada de calcio en la célula inducida por estos agentes primarios. El exceso de calcio se absorbe en las mitocondrias, en la que compromete la fosforilación oxidativa y provoca una fuga de electrones. En consecuencia, se forman radicales libres que luego desestabilizan la membrana y la célula muere.

Basándose en el entendimiento de lo anterior, los inventores han diseñado inhibidores que son capaces de disminuir la síntesis o la actividad biológica del péptido T14 tóxico, y que pueden lograr su efecto por varios medios biosintéticos y/o metabólicos. Preferiblemente, el inhibidor puede unirse a T14 y evitar que se una al receptor nicotínico α7. Los inventores han descubierto que cualquier péptido T14 que haya logrado alcanzar el sitio alostérico sigue interactuando con el receptor, y que esta interacción puede provocar sobrerregulación de más receptores en 24 horas, es decir, T14 puede aumentar su propio objetivo. En consecuencia, lo más preferido es la prevención de la interacción de T14 con el sitio alostérico.

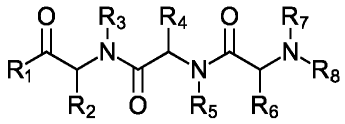
Por ejemplo, tales inhibidores pueden:

(a) reducir la interacción entre el péptido T14 y un sitio alostérico en el receptor alfa-7;
(b) competir con el péptido T14 endógeno por el sitio alostérico en el receptor alfa-7;
(c) unirse al péptido T14 para reducir su actividad biológica;
(d) disminuir la escisión postraduccional del polipéptido acetilcolinesterasa para crear el péptido T14; o
(e) inhibir la translocación de T14 al sitio alostérico en el receptor alfa-7.

En un primer ejemplo preferido, el inhibidor puede interactuar directamente con el péptido T14 (p. ej. (a) a (c) anteriores) para reducir la actividad bioquímica y/o metabólica de T14 y, por lo tanto, la toxicidad de T14 en las células del sujeto. Preferiblemente, el inhibidor da como resultado una reducción en la interacción de T14 con el sitio alostérico en el receptor alfa-7.

Los inhibidores preferidos comprenden inhibidores de moléculas pequeñas. Dichos inhibidores pueden identificarse como parte de una detección de alto rendimiento de bibliotecas de moléculas pequeñas. Por ejemplo, el método de detección de acuerdo con esta divulgación (véase más adelante) representa un medio adecuado para identificar dichos inhibidores que pueden utilizarse para tratar el cáncer o la metástasis.

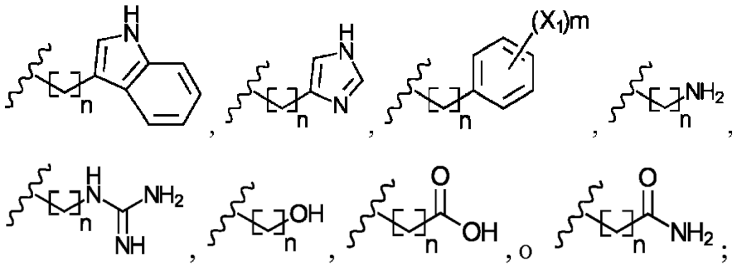
En un ejemplo preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I):



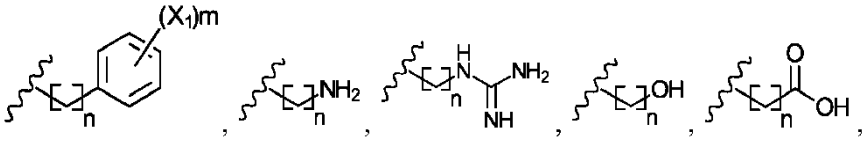
Fórmula (I)

, en la que:

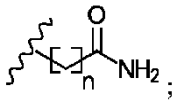
R_1 es $-NR_9R_{10}$ o -OH;
R_2 es



R_3 es -H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;
R_4 es

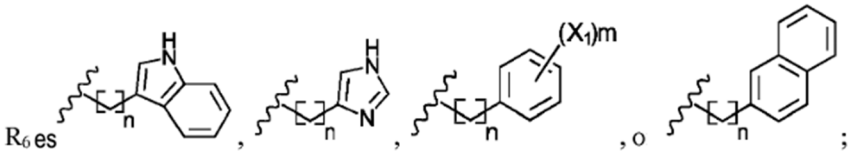


o

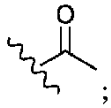


;

R_5 es -H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

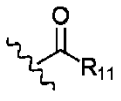


R_7 es -H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;
R_8 es -H; un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado o



;

X_1 es $-NR_9R_{10}$, -OH o



;

el o cada R_9 y R_{10} son independientemente -H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;
R_{11} es -NH2, -OH o un grupo arilo;
el o cada m está independientemente entre 0 y 5; y
cada n está independientemente entre 0 y 10;
o una de sus sales, solvatos, formas tautoméricas o formas polimórficas farmacéuticamente aceptables.

Puede entenderse que el término "sal" se refiere a cualquier sal de un compuesto proporcionado en el presente documento que conserva sus propiedades biológicas y que no es tóxico ni indeseable de otro modo para uso farmacéutico. Tales sales pueden derivarse de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica. Tales sales incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácido formadas con ácidos orgánicos o inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, sulfámico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, propiónico, hexanoico, ciclopentilpropiónico, glicólico, glutárico, pirúvico, láctico, malónico, succínico, sórbico, ascórbico, málico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, pícrico, cinámico, mandélico, ftálico, láurico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etano-disulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, 2-naftalenosulfónico, 4-toluenosulfónico, canfórico, canforsulfónico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, 3-fenilpropiónico, trimetilacético, tert-butilacético, laurilsulfúrico, glucónico, benzoico, glutámico, hidroxinaftoico, salicílico, esteárico, ciclohexilsulfámico, quínico, mucónico y similares; o (2) sales de adición de bases formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original (a) es reemplazado por un ion metálico, p. ej., un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo o un ion de aluminio, o hidróxidos de metal alcalino o metal alcalinotérreo, tales como hidróxido de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, litio, zinc y bario, amoníaco o (b) coordinados con una base orgánica, tal como aminas orgánicas alifáticas, alicíclicas o aromáticas, tales como amoníaco, metilamina, dimetilamina, dietilamina, picolina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, etilendiamina, lisina, arginina, ornitina, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, dietanolamina, procaína, N-bencilfenetilamina, piperazina N-metilglucamina, tris(hidroximetil)-aminometano, hidróxido de tetrametilamonio y similares.

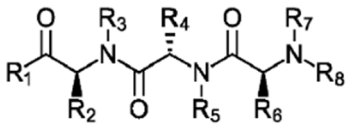
Las sales pueden incluir además, solo a modo de ejemplo y sin limitación, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, y cuando el compuesto contiene una función básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos, tales como hidrohaluros, p. ej., clorhidrato y bromhidrato, sulfato, fosfato, sulfamato, nitrato,

acetato, trifluoroacetato, tricloroacetato, propionato, hexanoato, ciclopentilpropionato, glicolato, glutarato, piruvato, lactato, malonato, succinato, sorbato, ascorbato, malato, maleato, fumarato, tartrato, citrato, benzoato, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoato, picrato, cinamato, mandelato, ftalato, laurato, metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato, 1,2-etano-disulfonato, 2-hidroxietanosulfonato, bencenosulfonato (besilato), 4-clorobencenosulfonato, 2-naftaleno sulfonato, 4-toluenosulfonato, canforato, canforsulfonato, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-i-carboxilato, glucoheptonato, 3-fenilpropionato, trimetilacetato, tert-butilacetato, laurilsulfato, gluconato, benzoato, glutamato, hidroxinaftoato, salicilato, estearato, ciclohexilsulfamato, quinato, muconato y similares.

Puede entenderse que el término "solvato" se refiere a un compuesto proporcionado en el presente documento o una de sus sales, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Donde el solvente es agua, el solvato es un hidrato.

Puede apreciarse que un grupo arilo se refiere a un sustituyente derivado de un anillo aromático. El grupo arilo puede ser un grupo arilo C6-C12. Preferiblemente, el grupo arilo es fenilo, bifenilo o naftilo.

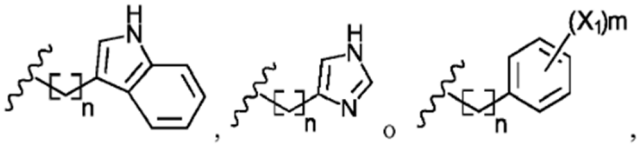
Lo más preferiblemente, el compuesto tiene la Fórmula (Ia):



Fórmula (Ia)

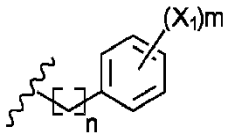
R_1 puede ser -OH. Sin embargo, preferiblemente, R_1 es $-NR_9R_{10}$, más preferiblemente R_1 es $-NR_9H$, y lo más preferiblemente R_1 es -NH2.

Preferiblemente, R_2 es



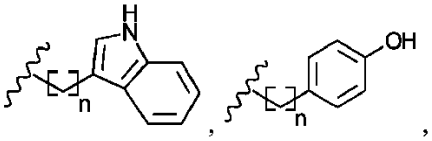
y n está preferiblemente entre 1 y 5. En consecuencia, n puede ser 1, 2, 3, 4 o 5, y lo más preferiblemente n es 1.

Se apreciará que en los ejemplos donde R_2 es

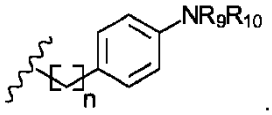


entonces m puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Preferiblemente m es 1. Preferiblemente, X_1 está en la posición para.

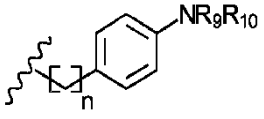
En un ejemplo preferido R_2 es



o

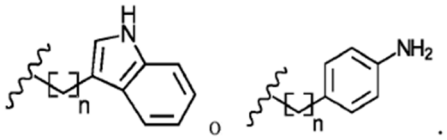


Preferiblemente, en los ejemplos cuando R_2 es

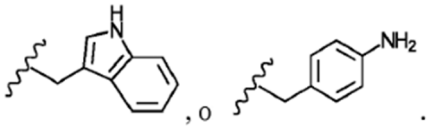


entonces al menos uno de R_9 o R_{10} es -H, y lo más preferiblemente R_9 o R_{10} son ambos -H.

En un ejemplo preferido, R_2 es

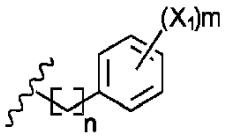


En un ejemplo más preferido, R_2 es



Se apreciará que R_3 puede ser un grupo metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. Preferiblemente, R_3 es metilo. Sin embargo, en un ejemplo más preferido, R_3 es -H.

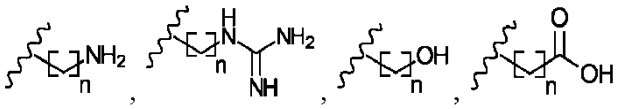
En un ejemplo R_4 es



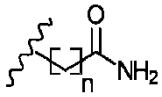
y n está preferiblemente entre 1 y 5.

En consecuencia, n puede ser 1, 2, 3, 4 o 5, y preferiblemente n es 1.

En ejemplos donde R_4 es

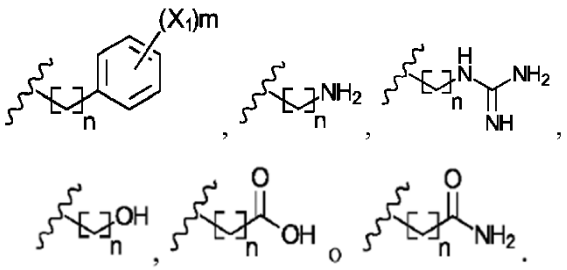


o

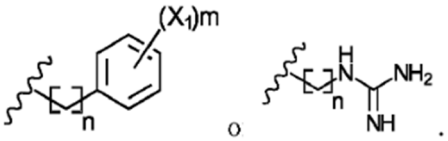


entonces n está preferiblemente entre 1 y 7, y más preferiblemente entre 2 y 6. En consecuencia, n puede ser 2, 3, 4, 5 o 6, y es preferible que n sea 3 o 4.

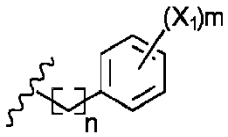
En un ejemplo, R_4 es preferiblemente



Más preferiblemente, R_4 es

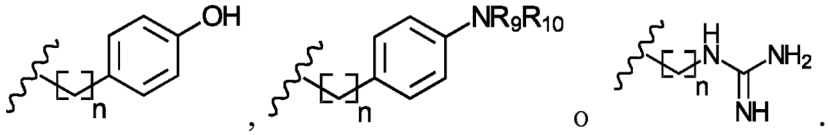


Se apreciará que en los ejemplos donde R_4 es

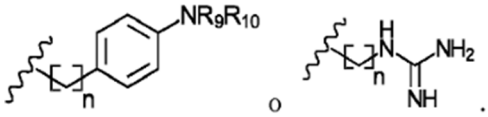


entonces m puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Preferiblemente m es 1. Preferiblemente, X_1 está en la posición para.

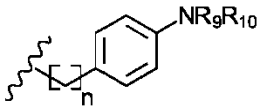
Preferiblemente, R_4 es



Más preferiblemente, R_4 es

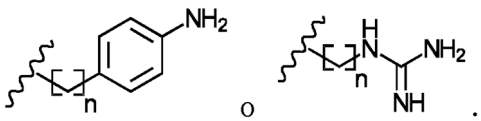


Preferiblemente, en los ejemplos cuando R_4 es

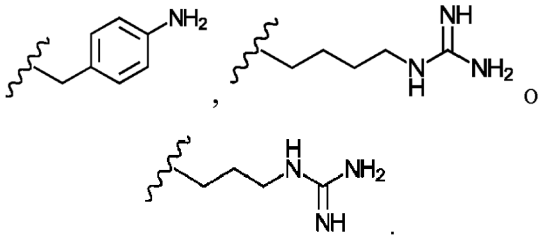


entonces al menos uno de R_9 o R_{10} es -H, y lo más preferiblemente tanto R_9 o R_{10} son -H.

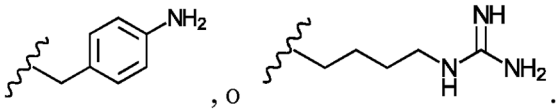
En consecuencia, R_4 es preferiblemente



Más preferiblemente, R_4 es

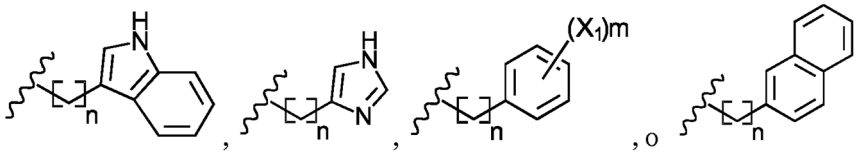


Más preferiblemente, R_4 es



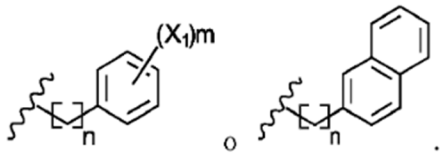
Se apreciará que R_5 puede ser un grupo metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. Preferiblemente, R_5 es metilo. Sin embargo, en un ejemplo más preferido, R_5 es -H.

En R_6 es

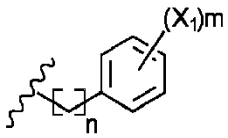


y n está entre 1 y 5. En consecuencia, n puede ser 1, 2, 3, 4 o 5, y preferiblemente n es 1.

Preferiblemente, R_6 es

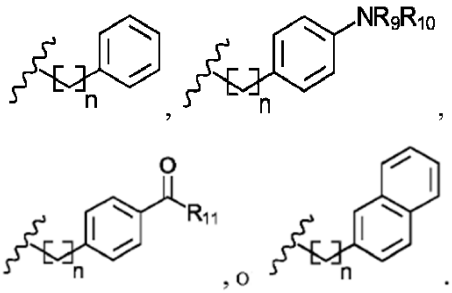


Se apreciará que en los ejemplos donde R_6 es

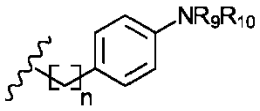


entonces m puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Preferiblemente, m es 0. Más preferiblemente, m es 1. Preferiblemente, X_1 está en la posición para.

En un ejemplo preferido R_6 es

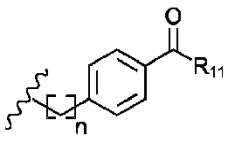


Preferiblemente, en los ejemplos cuando R_6 es



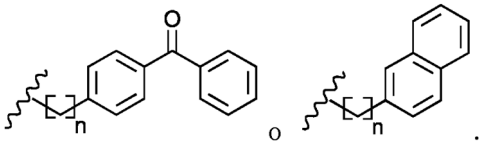
entonces al menos uno de R_9 o R_{10} es -H, y lo más preferiblemente tanto R_9 o R_{10} son -H.

Preferiblemente, en los ejemplos cuando R_6 es

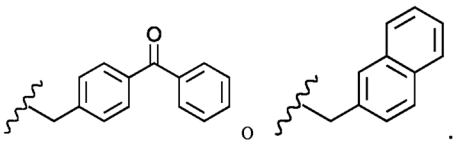


entonces R_{11} es arilo, y lo más preferiblemente fenilo.

En un ejemplo preferido, R_6 es

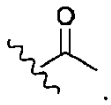


En un ejemplo más preferido, R_6 es



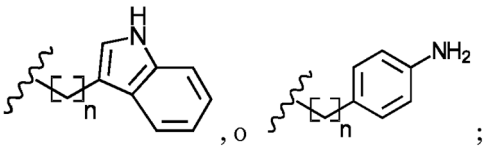
Se apreciará que R_7 puede ser un grupo metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. Preferiblemente, R_7 es metilo. Sin embargo, en un ejemplo más preferido, R_7 es -H.

En un ejemplo preferido R_8 es -H. Sin embargo, en un ejemplo más preferido R_8 es



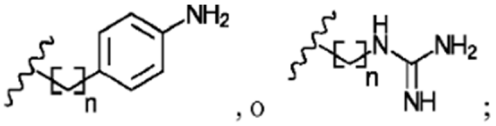
En un ejemplo preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

R_2 es



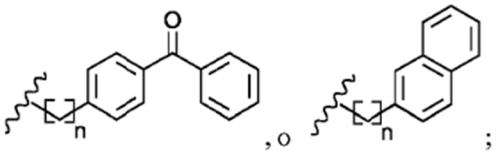
R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

R_4 es



R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

R_6 es



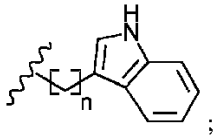
y

R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H.

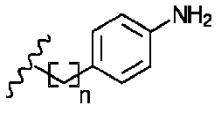
En un ejemplo más preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

R_2 es



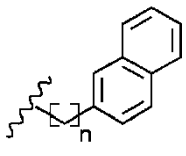
R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

R_4 es



R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado; o

R_6 es

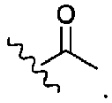


;

y

R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

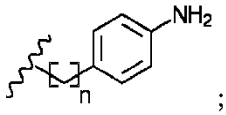
Preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (Ia). Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H. Preferiblemente, R_1 es -OH y R_8 es H. Más preferiblemente, R_1 es NH2 y R_8 es



.

En un ejemplo alternativo más preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

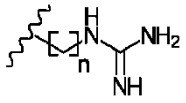
R_2 es



;

R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

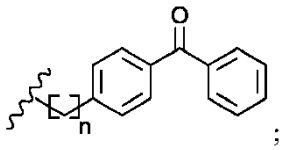
R_4 es



;

R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado; o

R_6 es

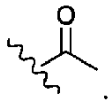


;

y

R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

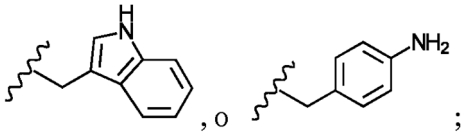
Preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (Ia). Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H. Preferiblemente, R_1 es -OH y R_8 es H. Más preferiblemente, R_1 es NH2 y R_8 es



.

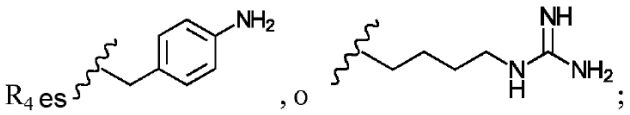
En un ejemplo incluso más preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

R_2 es



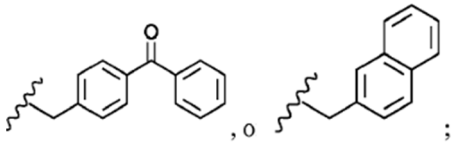
;

R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;



R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

R_6 es



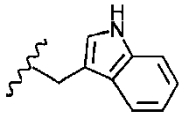
y

R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H.

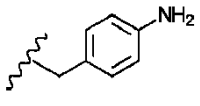
En un ejemplo más preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

R_2 es



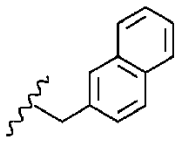
R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

R_4 es



R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado; o

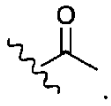
R_6 es



y

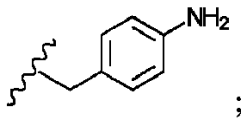
R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

Preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (Ia). Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H. Preferiblemente, R_1 es -OH y R_8 es H. Más preferiblemente, R_1 es NH2 y R_8 es



En un ejemplo alternativo más preferido, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (I), en la que:

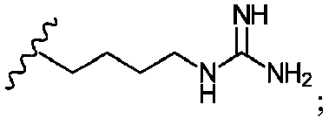
R_2 es



;

R_3 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado;

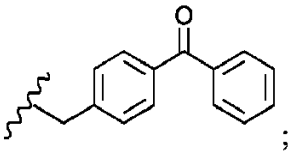
R_4 es



;

R_5 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado; o

R_6 es

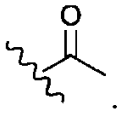


;

y

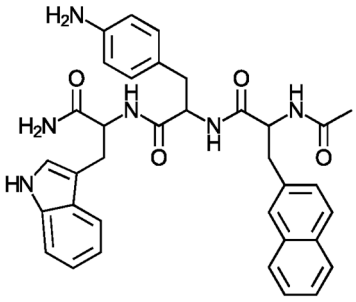
R_7 es H o un alquilo o alquenilo C_{1-5} lineal o ramificado.

Preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (Ia). Preferiblemente, R_3 es H, R_5 es H y R_7 es H. Preferiblemente, R_1 es -OH y R_8 es H. Más preferiblemente, R_1 es NH_2 y R_8 es

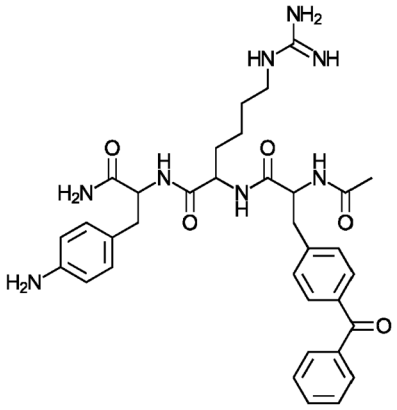


.

Preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (101) o (103):

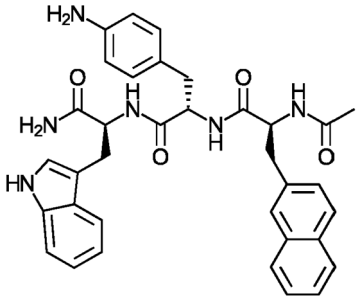


Fórmula (101)

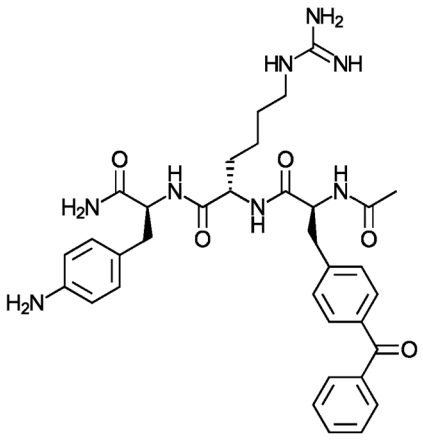


Fórmula (103)

Más preferiblemente, el inhibidor comprende un compuesto de Fórmula (101a) o (103a):



Fórmula (101a)



Fórmula (103a)

Se apreciará que los compuestos de Fórmula (101a) y (103a) corresponden a los compuestos Trio2 y Trio4, respectivamente, que se analizan en los Ejemplos. Por lo tanto, en otro ejemplo, se proporciona un inhibidor como se define en este documento, para usar en el tratamiento, mejora o prevención del cáncer o enfermedad metastásica, preferiblemente en el que el inhibidor es de Fórmula (101a) o (103a).

En un ejemplo preferido, el inhibidor comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, es decir, un anticuerpo neutralizante de T14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo bloquea preferiblemente la interacción de T14 con el sitio alostérico en el receptor alfa-7. Preferiblemente, el anticuerpo se une a T14, formando así un complejo que es incapaz de unirse al receptor para causar toxicidad.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede generarse en un conejo, ratón o rata.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No: 3. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en el extremo terminal C de la SEQ ID No: 3. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en la SEQ ID No: 5 (es decir, SYMVHWK, que son los aminoácidos números 7-14 del extremo terminal C de la SEQ ID No: 3). Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un residuo de lisina (K) del extremo terminal C en el epítopo.

Los inventores han observado sorprendentemente que la secuencia de aminoácidos VHWK del extremo terminal C en la SEQ ID No: 3, que se describe en este documento como la SEQ ID No. 6 (es decir, los aminoácidos números 10-14 del extremo terminal C de la SEQ ID No. 3), actúa como un epítopo para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por consiguiente, más preferiblemente el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en la SEQ ID No. 6. Lo más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No. 6. Por lo tanto, se apreciará que el epítopo al que se une el anticuerpo comprende o consiste en la SEQ ID No: 6.

Con base en el descubrimiento del epítopo VHWK (SEQ ID No: 6) dentro del péptido T14, los inventores creen que estas secuencias pueden usarse como antígeno para la producción de anticuerpos útiles. Como se describe en los ejemplos, el péptido T14 (SEQ ID No: 3) se entrecruzó con cisteína a la hemocianina de lapa californiana (KLH) que actúa como una proteína transportadora que estimula una respuesta inmunitaria en el huésped. La proteína KLH entrecruzada con T14 se denomina en el presente documento como la SEQ ID No: 7, es decir, CAEFHRWSSYMVHWK (la C se añadió para unir KLH con la A en el extremo terminal N del péptido T14).

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No: 4.

Los anticuerpos policlonales se pueden producir como sueros policlonales mediante la inyección de antígeno en animales. Los anticuerpos policlonales preferidos pueden generarse mediante la inoculación de un animal (p. ej., un conejo) con antígeno (p. ej., T14 o fragmentos al mismo, incluido el extremo terminal C) usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede obtenerse inmunizando un animal huésped con la SEQ ID No:3 y luego recolectando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El animal huésped es lo más preferiblemente un conejo.

En otro ejemplo preferido, el inhibidor comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos monoclonales preferidos pueden generarse usando tecnología de hibridoma usando T14 o fragmentos del mismo como antígeno. Preferiblemente, el anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo humano. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo humano" puede significar un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, que comprende sustancialmente las mismas secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera y pesada que se encuentran en un anticuerpo humano particular que exhibe inmuno especificidad por la SEQ ID No: 3. Una secuencia de aminoácidos, que es sustancialmente la misma que una CDR de cadena ligera o pesada, exhibe una cantidad considerable de identidad de secuencia cuando se compara con una secuencia de referencia. Tal identidad es definitivamente conocida o reconocible como representativa de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano particular. Sustancialmente, la misma secuencia de aminoácidos de CDR de cadena ligera y pesada puede tener, p. ej., modificaciones menores o sustituciones conservadoras de aminoácidos. Dicho anticuerpo humano mantiene su función de unión selectiva a la SEQ ID No: 3.

Pueden usarse técnicas de hibridoma convencionales para generar los anticuerpos. El antígeno utilizado para generar anticuerpos monoclonales puede ser la proteína T14 completa o un fragmento de la misma. Los fragmentos preferidos para generar los anticuerpos también pueden ser los péptidos discutidos anteriormente, y particularmente SYMVHWK (SEQ ID No: 5) o VHWK (SEQ ID No: 6). Se prefiere que el anticuerpo sea una γ-inmunoglobulina (IgG).

Otro inhibidor preferido es un fragmento peptídico inactivo del péptido T14 que competirá con el T14 endógeno y por lo tanto reducirá su actividad. Por ejemplo, los mutantes de truncamiento de T14 que no se unen al sitio alostérico en el receptor alfa-7 y que inhiben la capacidad de T14 para interactuar con el sitio alostérico en el receptor alfa-7 también pueden usarse como inhibidores.

En otro ejemplo, el inhibidor puede prevenir o reducir la escisión postraduccional de la enzima acetilcolinesterasa para formar el péptido T14, es decir, (d) anterior. Por ejemplo, el inhibidor de acuerdo con la divulgación puede ser una molécula silenciadora de genes configurada para bloquear o interrumpir la escisión enzimática del polipéptido acetilcolinesterasa en T14.

El término "molécula silenciadora de genes" puede significar cualquier molécula que interfiere con la expresión del péptido T14. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ARNi, incluyendo ANpi, ARNpi, miARN, ribozimas y moléculas antisentido.

Como se discutió anteriormente, el gen que codifica la acetilcolinesterasa se expresa y se traduce en la proteína que se muestra como la SEQ ID NO: 1. Las modificaciones postraduccionales de la SEQ ID No: 1 pueden incluir la escisión por una proteasa para crear T14 (SEQ ID No: 3). Por consiguiente, en un ejemplo preferido, el inhibidor comprende

una molécula silenciadora de genes que reduce o previene la expresión de la proteasa responsable de escindir T15 (SEQ ID No: 4) de T30 para crear T14.

En otro ejemplo, el inhibidor puede inhibir la translocación de T14 al receptor alfa-7 (es decir, (e) anterior).

Se apreciará que los inhibidores de acuerdo con esta divulgación pueden usarse en un medicamento, que puede usarse como monoterapia (es decir, el uso del inhibidor de T14 solo), para tratar, mejorar o prevenir el cáncer o la metástasis. Alternativamente, el inhibidor de T14 se puede usar como complemento o en combinación con terapias conocidas para tratar, mejorar o prevenir el cáncer o la metástasis, tal como radioterapia o quimioterapia, o cualquiera de los fármacos anticancerosos conocidos, tal como Lapatinib.

Los inhibidores de acuerdo con esta divulgación pueden combinarse en composiciones que tienen varias formas diferentes dependiendo, en particular, de la manera en que se va a utilizar la composición. Así, p. ej., la composición puede presentarse en forma de polvo, comprimido, cápsula, líquido, pomada, crema, gel, hidrogel, aerosol, atomizador, solución micelar, parche transdérmico, suspensión de liposomas o cualquier otra forma adecuada que pueda ser administrada a una persona o animal que necesita tratamiento. Se apreciará que el vehículo de los medicamentos de acuerdo con la divulgación debe ser bien tolerado por el sujeto al que se le administra, y preferiblemente permite la administración del inhibidor al sitio objetivo, p. ej., a través de la barrera hematoencefálica al tratar tumores cerebrales.

Los inhibidores de acuerdo con esta divulgación también pueden incorporarse dentro de un dispositivo de liberación lenta o retardada. Dichos dispositivos pueden, p. ej., insertarse sobre o debajo de la piel, y el medicamento puede liberarse durante semanas o incluso meses. El dispositivo puede estar ubicado al menos adyacente al sitio de tratamiento. Dichos dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiere un tratamiento a largo plazo con inhibidores usados de acuerdo con la divulgación y que normalmente requeriría una administración frecuente (p. ej., al menos una inyección diaria).

En un ejemplo preferido, los medicamentos de acuerdo con esta divulgación pueden administrarse a un sujeto mediante inyección en el torrente sanguíneo o directamente en un sitio que requiera tratamiento. Por ejemplo, el medicamento puede administrarse mediante inyección en el torrente sanguíneo. Las inyecciones pueden ser intravenosas (bolo o infusión) o subcutáneas (bolo o infusión) o intradérmicas (bolo o infusión).

Se apreciará que la cantidad de inhibidor que se requiere está determinada por su actividad biológica y biodisponibilidad, que a su vez depende del modo de administración, las propiedades fisicoquímicas del inhibidor y si se está utilizando como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también estará influenciada por la vida media del inhibidor dentro del sujeto que se está tratando. Las dosis óptimas por administrar pueden ser determinadas por los expertos en la técnica y variarán con el inhibidor particular en uso, la potencia de la composición farmacéutica, el modo de administración y el avance del cáncer o metástasis. Factores adicionales que dependen del sujeto particular que se esté tratando darán como resultado la necesidad de ajustar las dosis, incluyendo la edad, el peso, el sexo, la dieta y el momento de la administración del sujeto.

Generalmente, una dosis diaria de entre 0.001 µg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal, o entre 0.01 µg/kg de peso corporal y 1 mg/kg de peso corporal, del inhibidor de acuerdo con la divulgación puede usarse para tratar, mejorar o prevenir el cáncer o la metástasis, dependiendo del inhibidor que se use.

El inhibidor puede administrarse antes, durante o después del inicio del cáncer. Las dosis diarias pueden administrarse en una sola administración (p. ej., una sola inyección diaria o la inhalación de un aerosol nasal). Alternativamente, el inhibidor puede requerir la administración dos o más veces durante un día. Como ejemplo, los inhibidores pueden administrarse como dos (o más dependiendo de la gravedad del cáncer o la metástasis que se esté tratando) dosis diarias de entre 0.07 µg y 700 mg (es decir, suponiendo un peso corporal de 70 kg). Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis al despertar y luego una segunda dosis por la noche (si está en un régimen de dos dosis) o a intervalos de 3 o 4 horas a partir de entonces. Alternativamente, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas de inhibidor de acuerdo con la divulgación a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

Procedimientos conocidos, como los empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (p. ej., experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.), pueden usarse para formar formulaciones específicas del inhibidor de acuerdo con esta divulgación y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias de los agentes y la frecuencia de administración). Los inventores creen que son los primeros en sugerir una composición de tratamiento contra el cáncer, basada en el uso de inhibidores de esta divulgación.

Por lo tanto, en un ejemplo, se proporciona una composición farmacéutica anticancerígena o antimetastásica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de acuerdo con esta divulgación y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Esta divulgación también proporciona un proceso para preparar la composición farmacéutica anticancerígena o antimetastásica de acuerdo con esta divulgación, comprendiendo el proceso combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidor de acuerdo con el primer aspecto, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El inhibidor de esta divulgación inhibe la síntesis y/o actividad de un péptido de la SEQ ID No: 3, como se describió anteriormente.

Un "sujeto" puede ser un vertebrado, un mamífero o un animal doméstico. Por lo tanto, los medicamentos de acuerdo con la divulgación se pueden usar para tratar a cualquier mamífero, p. ej., ganado (p. ej., un caballo), mascotas, o se pueden usar en otras aplicaciones veterinarias. Sin embargo, lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del inhibidor es cualquier cantidad que, cuando se administra a un sujeto, es la cantidad de agente activo que se necesita para tratar el cáncer o la metástasis, o producir el efecto deseado. El inhibidor puede usarse como adyuvante para el tratamiento de tumores sólidos o metastásicos, p. ej., con quimioterapia o radioterapia. Esto significa que se requieren dosis y tiempos de exposición más bajos de quimioterapia y/o radioterapia.

Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de inhibidor usada puede ser de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 800 mg, y preferiblemente de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se hace referencia en el presente documento, es cualquier compuesto conocido o combinación de compuestos conocidos que los expertos en la técnica saben que es útil para formular composiciones farmacéuticas.

En un ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido y la composición puede estar en forma de polvo o tableta. Sin embargo, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica está en forma de solución. Las composiciones farmacéuticas líquidas, que son soluciones o suspensiones estériles, se pueden utilizar, p. ej., mediante inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, intravenosa y particularmente subcutánea.

El inhibidor y las composiciones de esta divulgación pueden administrarse por vía oral en forma de una solución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión (p. ej., suficiente solución salina o glucosa para hacer que la solución sea isotónica), sales biliares, goma arábiga, gelatina, monooleato de sorbitano, polisorbato 80 (ésteres oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares. El inhibidor utilizado de acuerdo con la divulgación también se puede administrar por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, tabletas y polvos, y formas líquidas, tales como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para la administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones y suspensiones estériles.

El conocimiento del papel sorprendente que juega T14 en el cáncer, y especialmente en la enfermedad metastásica, tal como lo demuestran los datos de CD44 en el Ejemplo 2, ha permitido a los inventores desarrollar una detección para identificar si los compuestos de prueba son o no inhibidores probables para tratar, prevenir o mejorar cáncer o metástasis.

Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo, se proporciona un método para seleccionar un compuesto candidato para probar si el compuesto tiene o no eficacia para tratar, prevenir o mejorar el cáncer o la enfermedad metastásica, comprendiendo el método:

(i) exponer un sistema biológico al compuesto candidato;
(ii) detectar la concentración, expresión o actividad del péptido T14 de la SEQ ID No: 3 en el sistema biológico; y
(iii) comparar la concentración, expresión o actividad del péptido T14 en el sistema biológico tratado con el compuesto en relación con la concentración, expresión o actividad encontrada en un sistema biológico de control que no fue tratado con el compuesto,

en el que un compuesto con eficacia para tratar, prevenir o mejorar el cáncer o la enfermedad metastásica disminuye la concentración, expresión o actividad del péptido T14 en relación con el control.

Se apreciará que el método de acuerdo con este ejemplo se puede adaptar de modo que se pueda usar para probar si un compuesto realmente causa o no cáncer o metástasis.

Por lo tanto, de acuerdo con otro ejemplo, se proporciona un método para seleccionar un compuesto para probar si el compuesto causa cáncer o no, comprendiendo el método:

(i) exponer un sistema biológico al compuesto de prueba;
(ii) detectar la concentración, expresión o actividad del péptido T14 de la SEQ ID No: 3 en el sistema biológico; y
(iii) comparar la concentración, expresión o actividad del péptido T14 en el sistema biológico tratado con el compuesto en relación con la concentración, expresión o actividad del péptido T14 encontrado en un sistema biológico de control que no fue tratado con el compuesto,

en el que un compuesto que es cancerígeno o que aumenta la metástasis aumenta la concentración, expresión o actividad del péptido T14 con respecto al control.

Los métodos o ensayos de detección de esta divulgación se basan en la comprensión de los inventores de que el grado de expresión y/o actividad de T14 está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer y metástasis. El método de detección de esta divulgación es particularmente útil para seleccionar bibliotecas de compuestos para identificar compuestos que pueden usarse como agentes anticancerígenos o antimetástasis usados de acuerdo con la divulgación. Este ejemplo de la divulgación puede usarse para identificar compuestos que son cancerígenos y que deben evitarse. En consecuencia, la detección de esta divulgación puede usarse para el control ambiental (p. ej., para probar efluentes de fábricas) o en pruebas de toxicidad (p. ej., para probar la seguridad de supuestos productos farmacéuticos, cosméticos, alimenticios y similares).

El término "sistema biológico" puede significar cualquier sistema experimental que un experto en la materia entendería para proporcionar información sobre los efectos que un compuesto puede tener sobre la concentración, expresión o actividad del péptido T14 en el entorno fisiológico. El sistema puede comprender: (a) un sujeto de prueba experimental cuando se va a emplear una prueba *in vivo*; (b) una muestra biológica derivada de un sujeto de prueba (p. ej.: sangre o una fracción de sangre (p. ej., suero o plasma), linfa o una muestra de células/biopsia); (c) un modelo de línea celular (p. ej., una célula que expresa naturalmente el péptido T14 o una célula diseñada para expresar T14); o (d) un sistema *in vitro* que contiene T14 o su gen y simula el entorno fisiológico de manera que se puede medir la concentración, expresión o actividad del péptido T14.

La selección preferiblemente ensaya células biológicas o lisados de las mismas. Cuando la detección implica el ensayo de células, pueden estar contenidas dentro de un animal de experimentación (p. ej., un ratón o una rata) cuando el método es una prueba *in vivo*. Alternativamente, las células pueden estar en una muestra de tejido (por pruebas *ex-vivo*) o las células se pueden hacer crecer en cultivo. Se apreciará que dichas células deben expresar, o pueden ser inducidas a expresar, T14 funcional (es decir, tóxico). También es posible utilizar células que no están naturalmente predispuestas a producir T14 siempre que dichas células se transformen con un vector de expresión. Tales células representan pruebas de prueba preferidas para usar de acuerdo con esta divulgación. Esto se debe a que las células animales o incluso las células procariotas pueden transformarse para expresar el péptido T14 humano y, por lo tanto, representan un buen modelo celular para probar la eficacia de fármacos candidatos para uso en terapia humana.

Lo más preferido es que las células biológicas usadas de acuerdo con los métodos de detección de esta divulgación se deriven de un sujeto y, en particular, de modelos de xenoinjerto de cáncer (p. ej., xenoinjertos de ratón).

Con respecto a "detectar la concentración, expresión o actividad del péptido T14" de acuerdo con los métodos de detección de la presente divulgación, el término "actividad" puede significar la detección de la interacción de T14 con el sitio alostérico en el receptor alfa-7 o la determinación de un efecto fisiológico de punto final. El término "expresión" puede significar la detección de la proteína T14 en cualquier compartimento de la célula (p. ej., en el citosol, el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi).

La expresión de T14 en el sistema biológico puede detectarse mediante transferencia Western, inmunoprecipitación (IP) o IP conjunta, o inmunohistoquímica.

Los métodos de detección también pueden basarse en el uso de extractos celulares que comprenden el péptido T14. Dichos extractos se derivan preferiblemente de las células descritas anteriormente.

La concentración, expresión o actividad del péptido T14 puede medirse utilizando varias técnicas convencionales. La prueba puede ser una prueba basada en un inmunoensayo. Por ejemplo, los anticuerpos marcados pueden usarse en un inmunoensayo para evaluar la unión de un compuesto a T14 en la muestra. El péptido T14 puede aislarse y detectarse la cantidad de marcador unido a él. Una reducción en el marcador unido (en relación con los controles) sugeriría que el compuesto de prueba compite con el marcador para unirse a T14 y que también era un supuesto agente anticancerígeno o antimetástasis. Alternativamente, puede emplearse una actividad funcional que mida la actividad del péptido T14.

Además, pueden usarse técnicas de biología molecular para detectar el péptido T14 en la detección. Por ejemplo, se puede generar ADNc a partir de ARNm extraído de células o sujetos analizados y cebadores diseñados para amplificar secuencias de prueba utilizadas en una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para amplificar a partir del ADNc. Cuando se utiliza un sujeto (p. ej., un modelo animal o incluso un modelo animal diseñado para expresar T14 humano), el compuesto de prueba debe administrarse al sujeto durante un período de tiempo predeterminado y luego se debe tomar una muestra del sujeto para analizar la concentración, expresión o actividad del péptido T14. La muestra puede ser, p. ej., sangre o tejido de biopsia.

Como se discute en los Ejemplos, los inventores han demostrado claramente que el péptido T14 tóxico es fácilmente detectable fuera de las células cancerosas (es decir, dentro del medio de cultivo celular), mientras que la AChE y el receptor nicotínico alfa-7 no lo eran. Además, los inventores han demostrado una fuerte correlación entre el marcador metastásico (CD44) y la molécula tóxica del péptido T14. Esta correlación es cierta tanto dentro de la membrana de la célula cancerosa como dentro del citosol de la célula cancerosa. En consecuencia, los inventores creen que T14 representa un biomarcador robusto para el cáncer por sí mismo, y en particular, para la metástasis.

Por lo tanto, de acuerdo con un ejemplo, se proporciona el uso de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, como biomarcador de diagnóstico o pronóstico para cáncer o enfermedad metastásica.

Lo más preferiblemente, esta divulgación proporciona el uso de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, como biomarcador de diagnóstico o pronóstico para la enfermedad metastásica.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar a un individuo que padece cáncer o enfermedad metastásica, o tiene predisposición al mismo, o para proporcionar un pronóstico de la afección de un individuo, comprendiendo el método detectar, en una muestra obtenida del individuo, por la presencia de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, significa que el individuo padece cáncer o enfermedad metastásica, o tiene predisposición a padecerla, o la afección del individuo tiene un pronóstico negativo.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un kit para diagnosticar un sujeto que padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición al mismo, o para proporcionar un pronóstico de la afección del sujeto, comprendiendo el kit medios de detección para determinar la concentración de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, presente en una muestra de un sujeto de prueba, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, en la muestra sugiere que el sujeto padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a ello.

Ventajosamente, el uso, el método y el kit de la invención permiten el diagnóstico o pronóstico de un individuo que padece cáncer o enfermedad metastásica, o tiene una predisposición al mismo, más preferiblemente metástasis. Los inventores han encontrado que el péptido T14 tóxico es un biomarcador robusto para identificar individuos que padecen cáncer o enfermedad metastásica. Por lo tanto, los individuos diagnosticados de cáncer o enfermedad metastásica, o que tengan predisposición al mismo, o tengan pronóstico negativo, de acuerdo con el uso, métodos y kit de la invención, pueden beneficiarse del tratamiento terapéutico precoz con el fin de prevenir la aparición del cáncer o enfermedad metastásica.

El individuo puede ser un vertebrado, un mamífero o un animal doméstico. Sin embargo, lo más preferiblemente, el individuo es un ser humano. El individuo puede ser un niño o un adulto. Preferiblemente, el método se lleva a cabo *in vitro.*

Preferiblemente, la muestra comprende una muestra biológica. La muestra puede ser cualquier material que se pueda obtener de un individuo del que se pueda obtener proteína. Además, la muestra puede ser sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, saliva, lágrimas, aspirado de mama, líquido prostático, líquido seminal, líquido vaginal, heces, raspado cervical, citos, líquido amniótico, líquido intraocular, moco, humedad en el aliento, tejido animal, lisados celulares, tejido tumoral, cabello, piel, raspados bucales, linfa, líquido intersticial, uñas, médula ósea, cartílago, priones, polvo óseo, cerumen o combinaciones de los mismos.

La muestra puede comprender sangre, orina, tejido, etc. Lo más preferiblemente, la muestra comprende una muestra de sangre. La sangre puede ser sangre venosa o arterial.

El kit puede comprender un recipiente de recolección de muestras para recibir la muestra extraída. Las muestras de sangre pueden analizarse inmediatamente para determinar los niveles de T14. Alternativamente, la muestra de sangre puede almacenarse a bajas temperaturas, p. ej., en un refrigerador o incluso congelarse antes de realizar el ensayo de T14. La detección de T14 puede realizarse en sangre completa. Preferiblemente, sin embargo, la muestra de sangre comprende suero sanguíneo. Preferiblemente, la muestra de sangre comprende plasma sanguíneo.

La sangre puede procesarse adicionalmente antes de realizar el ensayo de T14. Por ejemplo, se puede agregar un anticoagulante, tal como citrato (tal como citrato de sodio), hirudina, heparina, PPACK o fluoruro de sodio. Por lo tanto, el recipiente de recolección de muestras puede contener un anticoagulante para evitar que la muestra de sangre se coagule. Alternativamente, la muestra de sangre se puede centrifugar o filtrar para preparar una fracción de plasma o suero, que se puede usar para el análisis. Por lo tanto, se prefiere que el T14 se analice o ensaye en una muestra de plasma sanguíneo o suero sanguíneo. Se prefiere que la concentración de T14 se mida *in vitro* de una muestra de suero sanguíneo o una muestra de plasma tomada del individuo.

Preferiblemente, el kit o método se usa para identificar la presencia o ausencia de células positivas para T14 (es decir, células que comprenden la SEQ ID No: 3) en la muestra, o determinar la concentración de las mismas en la muestra. Los medios de detección pueden comprender un ensayo adaptado para detectar la presencia y/o ausencia de células positivas para T14 en la muestra. El kit o método puede comprender el uso de un control positivo y/o un control negativo contra el cual se puede comparar el ensayo. Por ejemplo, el kit comprende preferiblemente una referencia para la concentración de células positivas para T14 en una muestra de un individuo que (es decir, control positivo) sufre cáncer o enfermedad metastásica y/o una referencia para la concentración de células negativas para T14 en una muestra de alguien que no (es decir, un control negativo) sufre de cáncer o enfermedad metastásica.

El péptido T14 (SEQ ID No: 3) puede ensayarse mediante varias formas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, preferiblemente, se pueden emplear inmunoensayos para medir los niveles de péptido T14. Sin embargo, se apreciará que se pueden emplear ensayos no basados en inmuno, p. ej., marcando un compuesto que tiene afinidad con un ligando de la molécula del péptido T14, y luego analizando el marcador.

El péptido T14 también se puede determinar con análisis de transferencia Western. Por lo tanto, pueden usarse inmunoensayos y análisis de transferencia Western para determinar el nivel de proteína total del péptido T14. La concentración de péptido T14 también puede detectarse mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo fluorométrico, ensayo quimioluminiscente o análisis de radioinmunoensayo.

El kit puede comprender además un marcador que puede detectarse. El término "marcador" puede significar una fracción que se puede unir al medio de detección, o un fragmento del mismo. Las fracciones se pueden usar, p. ej., para procedimientos terapéuticos o de diagnóstico. Los marcadores terapéuticos incluyen, p. ej., fracciones que se pueden unir a un anticuerpo o fragmento del mismo de la divulgación y usar para monitorear la unión del anticuerpo al péptido T14 (es decir, la SEQ ID No: 3). Como se describe en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No: 3, o a un fragmento o variante del mismo, y puede usarse como medio de detección, o en el medio de detección. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No: 2 (es decir, T30). Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No: 4 (es decir, T15).

Los marcadores de diagnóstico incluyen, p. ej., fracciones que pueden detectarse mediante métodos analíticos. Los métodos analíticos incluyen, p. ej., procedimientos cualitativos y cuantitativos. Los métodos analíticos cualitativos incluyen, p. ej., inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta. Los métodos analíticos cuantitativos incluyen, p. ej., procedimientos de inmunoafinidad tales como radioinmunoensayo, ELISA o análisis FACS. Los métodos analíticos también incluyen procedimientos de obtención de imágenes tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ejemplos específicos de marcadores de diagnóstico que pueden detectarse por medios analíticos incluyen enzimas, radioisótopos, fluorocromos, marcadores quimioluminiscentes y biotina.

Los ejemplos 3 y 4 describen datos de ELISA y transferencia Western para T14 en una variedad de pacientes con cáncer. Se apreciará que la concentración de péptido T14 en pacientes con cáncer depende en gran medida de una serie de factores, p. ej., cuánto ha progresado el cáncer. También se apreciará que la concentración de péptido T14 en individuos que no padecen cáncer puede fluctuar hasta cierto punto, pero que, en promedio durante un período de tiempo dado, la concentración tiende a ser sustancialmente constante. Además, debe apreciarse que la concentración de péptido T14 en un grupo de individuos que no padecen cáncer puede ser diferente a la concentración del péptido T14 en otro grupo de individuos que no padecen cáncer. Sin embargo, el técnico experto sabrá cómo determinar la concentración promedio de péptido T14 en individuos que no padecen cáncer, y esto se denomina concentración "normal" de péptido T14. La concentración normal corresponde a los valores de referencia discutidos anteriormente.

Las concentraciones en suero de péptido T14 o en plasma de péptido T14 pueden medirse mediante ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo, que será conocido por el técnico experto. El ELISA puede comprender el uso de un anticuerpo adecuado para recubrir una placa de microtitulación. Por ejemplo, tal anticuerpo adecuado puede comprender un anticuerpo policlonal anti-péptido T14 humano marcado de conejo purificado por afinidad. Además, el ELISA puede comprender el uso de un anticuerpo adecuado para la detección. Por ejemplo, dicho anticuerpo adecuado puede comprender un anticuerpo monoclonal de ratón anti-péptido T14 humano marcado con peroxidasa. El péptido T14 humano, que puede purificarse a partir de plasma, y que luego puede cuantificarse mediante análisis de aminoácidos, puede usarse para calibrar un patrón de plasma usando técnicas estándar conocidas por el técnico experto.

Se puede unir un marcador directamente al anticuerpo o al agente de unión secundario que se une específicamente a T14. Tal agente de unión secundario puede ser, p. ej., un anticuerpo secundario. Un anticuerpo secundario puede ser policlonal o monoclonal y de origen humano, de roedor o quimérico.

Debido a las limitaciones actuales de los ensayos (tanto transferencia Western como ELISA), todos los valores en ambos casos pueden actualmente solo considerarse como grupos relativamente diferentes. Sin embargo, si bien los datos de ELISA pueden no ser totalmente concluyentes, hubo una diferencia sorprendentemente clara y significativa entre los grupos que utilizaron el análisis de transferencia Western donde la supervivencia deficiente con un tiempo más prolongado hasta el primer tratamiento correspondió ($P = 0.01$) a niveles más bajos de T14. Dado que las transferencias Western medirán agregados del péptido, estos datos sugieren que habrá más monómero libre para actuar como molécula señalizadora en la circulación de aquellos que aún deben ser tratados y, por lo tanto, con peor pronóstico. El hecho de que los datos con ELISA no sean, en la actualidad, concluyentes podría deberse a que el monómero libre que estaría midiendo ha sido absorbido y/o está unido a sus respectivos objetivos, mediando la migración celular.

Preferiblemente, por lo tanto, se usa transferencia Western para detectar T14 y/o cuantificar los niveles de T14.

Por lo tanto, de acuerdo con un décimo aspecto de la divulgación, se proporciona un método para tratar a un individuo que tiene susceptibilidad a desarrollar cáncer o enfermedad metastásica, comprendiendo el método:

(i) determinar la concentración de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, presente en una muestra de un sujeto de prueba, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo, en la muestra sugiere que el sujeto padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a ello; y

(ii) administrar, al individuo, un agente terapéutico o régimen de tratamiento que prevenga, reduzca o retraso el desarrollo de cáncer o enfermedad metastásica.

Los ejemplos de agentes terapéuticos adecuados que pueden administrarse incluyen, entre otros, Herceptina. Los ejemplos de regímenes de tratamiento adecuados incluyen radioterapia o quimioterapia.

Se apreciará que la divulgación se extiende a cualquier ácido nucleico o péptido o variante, derivado o análogo del mismo, que comprende sustancialmente las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento, incluidas variantes funcionales o fragmentos funcionales de las mismas. Los términos "sustancialmente la secuencia de aminoácidos/nucleótidos/péptidos", "variante funcional" y "fragmento funcional" pueden ser una secuencia que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos/nucleótidos/péptidos de cualquiera de las secuencias referidas en este documento, p. ej., 40% de identidad con la secuencia identificada como la SEQ ID No: 1-7, y así sucesivamente.

Secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos con una identidad de secuencia superior al 65 %, más preferiblemente superior al 70 %, incluso más preferiblemente superior al 75 % y aún más preferiblemente superior al 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias mencionadas también están previstas. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos tiene al menos un 85 % de identidad con cualquiera de las secuencias mencionadas, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 92 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 97 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 98 % de identidad y, lo más preferiblemente, al menos el 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento.

El técnico experto apreciará cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos. Para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos, primero se debe preparar una alineación de las dos secuencias, seguido del cálculo del valor de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar diferentes valores dependiendo de:- (i) el método utilizado para alinear las secuencias, p. ej., ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas) o alineación estructural a partir de la comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados por el método de alineación, p. ej., alineación local frente a global, la matriz de puntaje de pares utilizada (p. ej., BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.) y la penalización por hueco, p. ej., forma funcional y constantes.

Una vez realizada la alineación, hay muchas formas diferentes de calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, uno puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de la alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin huecos; o (iv) el número de posiciones equivalentes excluyendo los voladizos. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende fuertemente de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corta sea un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que se puede esperar que ocurra por casualidad.

Por lo tanto, se apreciará que la precisión del alineamiento de secuencias de proteína o ADN es un proceso complejo. El popular programa de alineación múltiple ClustalW (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22,4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) es una forma preferida de generar múltiples alineaciones de proteínas o ADN de acuerdo con la divulgación. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de ADN: penalización por apertura de huecos = 15.0, Penalización por extensión de huecos = 6.66 y matriz = identidad. Para alineaciones de proteínas: Penalización por apertura de hueco = 10.0, penalización por extensión de hueco = 0.2 y matriz = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: hueco en el extremo = -1 y distancia entre huecos = 4. Los expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para un alineamiento de secuencia óptimo.

Preferiblemente, el cálculo de las identidades porcentuales entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos puede calcularse a partir de dicha alineación como (N/T)*100, donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico y T es el número total de posiciones comparadas, incluidos los huecos, pero excluyendo las salientes. Por lo tanto, el método más preferido para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar un alineamiento de secuencias usando el programa ClustalW usando un conjunto adecuado de parámetros, p. ej., como se estableció anteriormente; y (ii) insertar los valores de N y T en la siguiente fórmula: - identidad de secuencia = (N/T)*100.

Los expertos en la técnica conocerán métodos alternativos para identificar secuencias similares. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar será codificada por una secuencia que se hibrida con secuencias de ADN o sus complementos en condiciones rigurosas. Por condiciones rigurosas, nos referimos a que el nucleótido se hibrida con el ADN o ARN unido al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 3x a aproximadamente 45 °C seguido de al menos un lavado en SSC/SDS al 0.1%/0.2x a aproximadamente 20 - 65 °C. Alternativamente, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias que se muestran en la SEQ ID No: 1 - 4.

Debido a la degeneración del código genético, está claro que cualquier secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento podría variarse o cambiarse sin afectar sustancialmente a la secuencia de la proteína codificada de ese modo, para proporcionar una variante funcional de la misma. Las variantes de nucleótidos adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden la totalidad o partes de la secuencia, que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido al que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, los aminoácidos hidrofóbicos no polares pequeños incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos hidrófobos no polares grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por lo tanto, se apreciará qué aminoácidos se pueden reemplazar con un aminoácido que tenga propiedades biofísicas similares, y el técnico experto conocerá las secuencias de nucleótidos que codifican estos aminoácidos.

Todas las características descritas en este documento (incluidas las reivindicaciones, el resumen y los dibujos adjuntos), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de tales características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la invención, y para mostrar cómo se pueden llevar a cabo las realizaciones de la misma, ahora se hará referencia, a modo de ejemplo, a las figuras adjuntas, en las que: -

La Figura 1 son datos de transferencia Western que muestran una movilidad similar entre T14 (A), el receptor alfa 7 (B) y AChE (C) en el lisado celular de siete líneas celulares de cáncer (CL), es decir, MEC-1, KG1a, H929, MCF-7, MDA-MB-231, CLL y JJN3, y linfocitos B normales actuando como control. Las células MDA-MB-231, KG1a y MEC-1 son líneas celulares de cáncer altamente migratorias. H929, JJN3, CLL y MCF-7 son líneas celulares de cáncer menos migratorias. Los linfocitos B son células normales, no cancerosas. Los niveles de péptido/proteína se normalizaron a proteína total (TP) y se representaron juntos para cada línea celular. Los niveles de péptido/proteína fueron similares dentro de cada línea celular con la excepción de las células MCF-7 en las que los niveles de T14 fueron más bajos. Entre líneas celulares, los niveles de péptido/proteína fueron variables. Posteriormente se cuantificaron los niveles de proteína de los anteriores, como se muestra en la Figura 2 y la Figura 5;

La Figura 2 son gráficos de los datos de transferencia Western que muestran niveles variables de T14, receptor alfa 7 y AChE en lisado celular entre las líneas celulares cancerosas, pero niveles similares dentro de cada línea celular;

La Figura 3 son gráficos basados en los datos de transferencia Western que se muestran en la Figura 1. Los niveles de T14, receptor alfa 7 y AChE se normalizaron a proteína total (TP) y el nivel de cada péptido/proteína se correlacionó con el otro en gráficos x-y y se realizaron análisis de regresión lineal, mostrando líneas de mejor ajuste (línea continua) a lo largo de su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas). A): T14 y receptor alfa 7, $R^2 = 0.6262$, $P = 0.0193$. B): Receptor alfa 7 y AChE, $R^2 = 0.6705$, $P = 0.0129$. C): T14 y AChE. El círculo en (C) resalta un punto de datos de anomalía que, cuando se excluye, produce una correlación positiva significativa ($R^2 = 0.7032$, $P = 0.0184$). El hecho de que todas las correlaciones fueran significativamente lineales sugiere que el péptido/proteína existe como un complejo con una proporción de 1:1:1 (D);

La Figura 4 son datos de transferencia Western que muestran que se detectó T14 en medios de cultivo de células cancerosas de las siete líneas de células cancerosas, pero no AChE y alfa7. La movilidad de T14 en el medio celular es ligeramente diferente de la del lisado celular. Posteriormente se cuantificaron los niveles de proteína de los anteriores, como se muestra en la Figura 5;

La Figura 5 son gráficos de los datos de Transferencia Western que muestran que las concentraciones de T14 dentro de los medios de cultivo de células cancerosas son significativamente mayores que las concentraciones de los niveles de péptido/proteína T14 celular en líneas celulares MEC-1, KG1a, linfocitos B normales y MDA-MB-231. No se detectaron señales de alfa 7 y AChE en los medios de cultivo de cáncer. Los niveles de péptido/proteína se normalizaron a proteína total (TP) y se graficaron juntos para cada línea celular;

La Figura 6 son gráficos basados en los datos de transferencia Western que se muestran en la Figura 1 y la Figura 4. Los niveles de T14, receptor alfa 7 y AChE se normalizaron a proteína total (TP) y el nivel de T14 dentro de los medios de cultivo del cáncer (T14 extracelular) se correlacionó con cada péptido/proteína intracelular en gráficos x-y y se realizaron análisis de regresión lineal, mostrando líneas de mejor ajuste (línea continua) junto con su intervalo de confianza del 95% (líneas punteadas). A): T14 extracelular y receptor alfa 7 intracelular, $R^2 = 0.6518$, $P = 0.0154$. B): T14 extracelular y T14 intracelular. Las líneas celulares se dividieron en dos grupos (círculos gris oscuro y gris claro). Gris oscuro por sí solo mostró $R^2 = 0.9794$, $P = 0.0105$. C): T14 extracelular y AChE intracelular;

La Figura 7 es un gráfico que muestra que los niveles de T14 varían significativamente entre las líneas celulares y entre los medios celulares y el lisado celular detectado por ELISA;

La Figura 8 son gráficos que demuestran las correlaciones inversas significativas entre los niveles de T14 en ELISA y las mediciones de transferencia Western para medios celulares y lisado celular en líneas de células cancerosas;

La Figura 9 muestra datos de transferencia Western que muestran una movilidad similar entre CD44, T14 y AChE en las fracciones de membrana celular y citosol de seis líneas celulares de cáncer y una línea celular derivada de cáncer. El receptor alfa 7 mostró una movilidad diferente a la de CD44, T14 y AChE. El orden de los carriles de izquierda a derecha es: JJN3, MDA-MB231, MCF-7, KG1a, MEC-1, H929 y PC12. Las células MDA-MB-231, KG1a y MEC-1 son líneas celulares de cáncer altamente migratorias, mientras que H929, JJN3, MCF-7 y PC12 son líneas celulares de cáncer menos migratorias;

La Figura 10 muestra las expresiones relativas de CD44, T14, AChE y el receptor Alpha 7 con respecto al nivel de proteína total (TP). Los cánceres fuertemente metastásicos tienen más proteínas en la membrana en comparación con el citosol, mientras que esta relación es variable para los cánceres débilmente metastásicos;

La Figura 11 muestra correlaciones positivas significativas entre CD44, T14 y AChE, lo que sugiere fuertemente que T14 y AChE son buenos predictores del grado de metástasis del cáncer;

La Figura 12 muestra datos de cultivos celulares (es decir, actividad de acetilcolinesterasa) para el compuesto peptidomimético 1 (es decir, Trio2);

La Figura 13 muestra los datos del cultivo celular (es decir, la entrada de iones de calcio) para el compuesto peptidomimético 1 (es decir, Trio2);

La Figura 14 muestra los resultados de la formación de imágenes con colorantes sensibles al voltaje (VSDI) en cortes de cerebro para el péptido NBP-14 cíclico de control;

La Figura 15 muestra los resultados de la formación de imágenes con colorantes sensibles al voltaje (VSDI) en cortes de cerebro para el compuesto peptidomimético 1 (es decir, Trio2);

La Figura 16 muestra el análisis de correlación de los cambios inducidos por la adición de péptidos frente a la amplitud de respuesta de la línea de base respectiva utilizando imágenes de colorantes sensibles al voltaje (VSDI) en cortes de cerebro. Se encontró que los cambios en la amplitud de la respuesta inducidos por T30 estaban negativamente correlacionados con la amplitud de sus respectivas líneas de base (A). Por lo tanto, se realizaron análisis de correlación posteriores para cada experimento en el que se perfundieron péptidos exógenos: B) T15, C) NBP14, D) Trio2, E) T30 en presencia de NBP14 y F) T30 en presencia de Trio2. Unidades en el eje y = $\Delta F/Fo$; eje x = $\Sigma \delta F/Fo$;

La Figura 17 muestra la cuantificación de los efectos mediados por la adición de Trio2 y T30;

La Figura 18 muestra un gráfico que compara la aplicación conjunta de T30 y NBP14 con la de Trio2 y T30 para bloquear los efectos de T30 en la actividad dentro del prosencéfalo basal. La aplicación conjunta de NBP14 pudo bloquear totalmente los efectos inducidos por T30, mientras que T30 con Trio2 provocó una respuesta moduladora similar pero silenciada;

La Figura 19 muestra los datos del cultivo de células PC12 (es decir, la entrada de iones de calcio) para el compuesto peptidomimético 2 (es decir, Trio4);

La Figura 20 muestra (A) mapas de espacio-tiempo de los cambios en la actividad del prosencéfalo basal inducidos por la adición de péptidos (T30 y $Trio_4$) contra la amplitud de la respuesta de línea de base utilizando imágenes de colorantes sensibles al voltaje (VSDI) en cortes de cerebro. En (B) se muestra un gráfico que compara la actividad evocada del prosencéfalo basal para grabaciones con T30 y $Trio_4$ (2 µM) con la de T30 solo en el prosencéfalo basal;

La Figura 21 muestra el cambio fraccional de fluorescencia (respuesta serie temporal, n = 29) para registros realizados en presencia de T30 solo o después de la aplicación conjunta de T30 y su bloqueador $Trio_4$ en comparación con la condición de referencia;

La Figura 22 muestra un gráfico de barras de la actividad del prosencéfalo basal utilizando el bloqueador Trio4 a una concentración de 4 µM. la aplicación conjunta de $Tríо_4$ fue capaz de bloquear totalmente los efectos inducidos por T30 en el prosencéfalo basal de rata;

La Figura 23 muestra un gráfico de barras del intervalo de niveles de T14 medidos por ELISA en relación con una concentración conocida de T14 exógena. Los pacientes están ordenados concentraciones relativas de T14 en la cohorte de pacientes con CLL examinados;

La Figura 24 muestra una tabla de valores de T14 medidos por ELISA en relación con una concentración conocida de T14 exógena en la cohorte de pacientes con CLL examinada y una agrupación estadística;

La Figura 25 muestra la estimación de Kaplan Meier realizada en 100 muestras de suero con CLL separadas en el grupo gris oscuro (curva superior) por encima de la mediana y el grupo gris claro (curva inferior) por debajo de la mediana. La relación de riesgos, el valor de P y la mediana de TTFT prevista se indicaron más arriba;

La Figura 26 muestra la estimación de Kaplan Meier realizada en 100 muestras de suero con CLL separadas en cuatro grupos no diferentes. La relación de riesgo, el valor de P y la mediana de TTFT prevista se indicaron más arriba;

La Figura 27 muestra una tabla de valores de T14 de la cohorte de pacientes con CLL examinada y una agrupación estadística;

La Figura 28 muestra la estimación de Kaplan Meier realizada en 100 muestras de suero con CLL, separadas en el grupo gris oscuro (curva superior) por encima de la mediana y el grupo gris claro (curva inferior) por debajo de la mediana. La relación de riesgo, el valor de P y la mediana de TTFT prevista se indicaron más arriba; y

La Figura 29 muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular. Tanto T14 como T30 exhiben efectos tóxicos iguales a altas concentraciones (10 µM), el efecto trófico a bajas concentraciones sobre la astroglia es mayor con T30 (120 ± 4 % a 1 pM y 135 ± 9 % a 10 pM) que con T14 (96 ± 5 % a 1 pM y 121 ± 8 % a 10 pM).

Ejemplos

Materiales y Métodos

Síntesis de anticuerpo policlonal

El anticuerpo fue sintetizado por encargo de Genosphere Biotechnologies (París, Francia). Se usaron dos conejos de Nueva Zelanda con cuatro inmunizaciones con péptido de KLH ("Pep4": hapteno T14- CAEFHRWSSYMVHWK - SEQ ID No. 7) como inmunógeno durante 70 días. La C se incluyó para unir el péptido T14 a la KLH actuando como inmunógeno. Se sangró a los animales cuatro veces y se agruparon los sangrados. A continuación, el antisuero se pasó a través de una columna de gravedad con soporte de péptido unido covalentemente, después del lavado, los anticuerpos se eluyeron en tampón ácido y la solución se neutralizó. La diálisis adicional contra tampón de PBS y la liofilización completaron el proceso.

Optimización de las condiciones del anticuerpo T14

Se utilizó el informe del fabricante sobre el anticuerpo para realizar los experimentos de ELISA en las condiciones óptimas. En el informe, el fabricante especifica la densidad óptica relacionada con la concentración de anticuerpos (véase la tabla a continuación) y el protocolo de ELISA utilizado para este procedimiento (véase el protocolo a continuación).

Protocolo del fabricante:

Los antígenos se revistieron sobre tiras de EIA a razón de 10 µg por pocillo. Los pocillos se lavaron con 200 µl de tampón de PBS.

Resultados del ELISA del fabricante: Absorbancia 405 nm				
Dilución del anticuerpo	Conejo No. 1		Conejo No. 2	
	preinmune	purificado	preinmune	purificado
1:1,000	0.120	1.64	0.143	1.66
1:10,000	0.045	0.77	0.036	0.74
1:100,000	0.016	0.19	0.017	0.19

Los antisueros se diluyeron en serie, se añadieron en pocillos separados y se incubaron durante dos horas. Los anticuerpos no unidos se lavaron y se añadió el conjugado anti-IgG de conejo-HRP. Las placas se lavaron y se desarrolló el color durante 15 minutos con sustrato de TMB. La absorbancia se leyó a 405 nm (2.00 AUFS). La intensidad del color fue directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos. El anticuerpo era positivo si la absorbancia era > 2 veces sobre aquella del suero previamente inmune. La absorbancia de fondo para el suero previamente inmune podría llegar a 0.1 a 0.3.

Conclusión:

Para todos los experimentos descritos en el presente documento, la dilución de anticuerpo elegida fue 1:1000.

Transferencia Western

Fraccionamiento celular

Se resuspendieron sedimentos de células enteras de las líneas celulares de cáncer (JJN3, MDA-MB231, MCF-7, KG1a, MEC-1, H929, PC12) en 300 µL de tampón de fraccionamiento subcelular (Hepes-NaOH 10 mM, MgCl2 1.5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT imM, cóctel inhibidor de proteinasa 1x, Nonidet P-40 0.05 %) y se dejó en hielo

durante 10 min. A continuación, las mezclas se homogeneizaron utilizando un politrón para garantizar la lisis celular. Luego, las mezclas se centrifugaron a 500 g durante 5 min. El sobrenadante resultante contenía la porción de citosol y se retuvo. El sedimento resultante contenía las fracciones de membrana, que luego se resuspendió en otros 300 µL de tampón de fraccionamiento subcelular y se retuvo.

Preparación de lisado celular

Sedimentos de células enteras de siete líneas celulares de cáncer (MEC-1, CLL, KG1a, JJN3, H929, MCF-7 y MDA-MB) y linfocitos B normales fueron amablemente donados por el profesor Chris Pepper (School of Bioscience, Cardiff University). Los sedimentos de células enteras se solubilizaron en tampón de lisis 1x (base Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 al 1 %, EDTA 2 mM) que contenían cócteles de inhibidores de proteasa (fosfatasa 1:1, PMSF 1:1, aprotinina 1:1) con una proporción de 17 % v/v. Posteriormente, la mezcla se trituró utilizando un Polytron durante 10 segundos y se agitó a 4 °C durante 2 horas. Luego, las muestras se centrifugaron a 13,000 g durante 30 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se tomaron y almacenaron a -80 °C.

Medición de la concentración de muestra de proteína

Las concentraciones de proteína de las muestras anteriores se midieron usando el ensayo de proteínas a 660 nm Pierce^{MC} (Thermo Scientific). En resumen, se realizó una dilución seriada (0 a 2 mg/mL) a partir de un patrón de 10 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA). Se prepararon tres réplicas de cada concentración de BSA transfiriendo 10 µL de la proteína a una placa transparente de 96 pocillos (Greiner). Luego, las muestras se diluyeron con tres concentraciones (1:1, 1:2, 1:10) y se colocaron tres réplicas de cada concentración en la misma placa de 96 pocillos y cada réplica contenía 10 µL de muestra. Posteriormente, se añadieron 150 µL de reactivo de Pearce a los estándares y todas las muestras y la mezcla se dejó incubar durante 5 min con agitación suave. Finalmente, la placa se leyó en un espectrofotómetro (Molecular Devices) a 660 nm. Las concentraciones de proteína de las muestras se determinaron utilizando la pendiente y la intersección con el eje y de la curva estándar de BSA, ambas calculadas a través de Microsoft Excel.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de proteínas

Los geles de poliacrilamida (geles mini-PROTEAN® sin tinción TGX^{MC}, BIO-RAD) se colocaron en el tanque de electroforesis (BIO-RAD, sistema tetra mini-PROTEAN) y se agregó tampón de procesamiento (base TRIS 25 mM, pH 8.6, glicina 192 mM, SDS al 0.1 %) al gel y a los reservorios del tanque (BioRad). Las muestras de proteína se prepararon mezclándolas con agua destilada y tampón de muestra Laemmli 4x (concentraciones finales: TRIS-HCl 69.5 mM pH 6.8, LDS al 1.1 %, glicerol al 11.1 % (p/v), azul de bromofenol al 0.005 %, BIO-RAD) y mercaptoetanol al 2.5 % (BIO-RAD). Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarlas en hielo. Las muestras y el control positivo se cargaron en los geles y se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein^{MC} Dual Xtra Standards, BIO-RAD) a 35 mV durante 90 min. Se colocó un bloque de hielo dentro del tanque en funcionamiento para evitar cualquier sobrecalentamiento.

Transferencia de muestras de proteínas a la membrana de PVDF

Los geles de apilamiento se recortaron y se transfirieron los geles de separación a una membrana de transferencia de PVDF (Thermo Scientific) en una celda Mini Transblot (BIO-RAD). Brevemente, la membrana de transferencia de PVDF se activó sumergiéndola en metanol durante 1 min, seguida de remojo en agua destilada durante 2 min. Todas las capas se saturaron posteriormente con tampón de transferencia (base TRIS 20 mM, pH 8.6, glicina 154 mM, SDS al 0.8 % p/v y metanol al 20 %). El sándwich de transferencia, en orden de abajo hacia arriba, consiste en una esponja de transferencia, papel secante, el gel, la membrana de transferencia de PVDF, el papel secante y la esponja de transferencia se colocaron en un casete de transferencia, que se insertó en la celda Mini Transblot llena con tampón de transferencia. Finalmente, se realizó la transferencia electroforética durante 90 min a 200 mA. Se colocó un bloque de hielo dentro del tanque de transferencia para evitar cualquier sobrecalentamiento.

Tinción de la membrana de PVDF

Se usó BLOT-Fasttain^{MC} (G-Biosciences, EE. UU.) para teñir la proteína total, actuando como control de carga. Inmediatamente después de la transferencia electroforética, la membrana de transferencia de PVDF se tiñó con la solución fijadora BLOT-Faststain^{MC} diluida (10 veces) durante 2 min con agitación suave. A continuación, la membrana se incubó con solución desarrolladora BLOT-Faststain^{MC} diluida (4 veces) durante 1 min con agitación suave. Posteriormente, la membrana se almacenó a 4 °C en la oscuridad en la solución desarrolladora durante 30 min para permitir que las bandas de proteína alcanzaran la máxima intensidad. Finalmente, la membrana se lavó con agua fría para eliminar la tinción de fondo y se tomaron imágenes usando G Box (Syngene). A continuación, la membrana puede decolorarse con agua desionizada tibia (40 - 45 °C) y quedar lista para la etapa de bloqueo.

Detección de bandas de proteína

La membrana de transferencia de PVDF se bloqueó en TBS (solución salina tamponada con TRIS, base TRIS 20 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 mM) que contenía leche desnatada en polvo al 5 % durante 1 h, luego se lavó dos veces durante 7 min cada una en TTBS (TBS complementado con Tween-20 al 0.05 % v/v). La membrana se incubó durante la noche

a 4 °C con un anticuerpo primario diluido en TTBS que contenía leche desnatada en polvo al 1 %. Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo primario. La membrana se lavó tres veces durante 5 min cada vez en TTBS, luego se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario de elección depende del tipo de anticuerpo primario utilizado. Puede ser un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (a9309, Sigma), diluido en TTBS que contenía leche desnatada en polvo al 1 % (concentración de trabajo: 1:1000) o anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con HRP (ab6721, abeam) diluido en TTBS que contenía leche desnatada en polvo al 1 % (concentración de trabajo: 1:5000). Después de la incubación del anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces durante 5 min en TTBS antes de un lavado final de 10 min en TBS. Las bandas de proteínas se detectaron utilizando G Box (Syngene).

Tabla 1 - Anticuerpos primarios utilizados para la detección mediante transferencia Western.

Anticuerpo	Especie criada en	Compañía	Número de catálogo	Concentración de trabajo
Anti-T14	Conejo	Neuro-Bio	N/A	1:1000
Antinicotínico Acetilcolina Receptor alfa 7	Conejo	Abcam	Ab10096	1:1000
Anti-ACHE	Conejo	Abnova	AYUDA 5222	1:1000
Anti-CD44	Conejo	Sigma	HPA005785	1:1000

Imágenes de bandas de proteínas y análisis de datos

La membrana de PVDF se colocó en la caja G (Syngene). Los ajustes de foco y el correspondiente enfoque se ajustaron para garantizar que la membrana fuera más grande en el centro de la pantalla. Las soluciones de luminol y peróxido del sustrato Clarity^{MC} Western ECL (BIO-Rad) se mezclaron en partes iguales y se aplicó a la membrana. Las imágenes se tomaron en la oscuridad a intervalos de 1 min durante 5 min para obtener la señal óptima para las bandas de proteínas. A continuación, la membrana se expuso a luz blanca utilizando un ajuste automático para obtener una imagen a escala molecular. Las imágenes de transferencia analizadas luego usando ImageJ. Box de tamaños iguales se colocaron alrededor de bandas de proteína en cada carril, lo que permitió la medición de las intensidades de las bandas de proteínas. Luego se restó el fondo de las intensidades de las bandas y los resultados se analizaron en Microsoft Excel y el software Graphpad.

Extracción de anticuerpos para probar nuevamente

La señal de proteína de la membrana de transferencia de PVDF se puede eliminar y probar nuevamente para una proteína diferente. Brevemente, la membrana se lavó con tampón de extracción suave (glicina 200 mM, SDS 3.5 mM, Tween-20 al 1 % v/v, pH 2.2) dos veces durante 10 min cada vez. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con PBS durante 10 min cada vez y luego se lavó con TTBS dos veces durante 5 min cada vez. Se añadió sustrato Clarity^{MC} Western ECL (BIO-Rad) a la membrana y se tomaron imágenes usando G Box (Syngene) para verificar las señales de proteínas residuales. Si la señal residual era demasiado fuerte, se repetía todo el proceso de extracción. Luego, la membrana estaba lista para la etapa de bloqueo posterior y el sondeo de anticuerpos primarios (véase más arriba).

ELISA para el anticuerpo peptídico T14

Las curvas estándar y las muestras se corrieron por triplicado. Las muestras de medio de cultivo celular y lisado celular se diluyeron 1:10 en tampón de PBS. La curva estándar para la determinación del péptido T14 en muestras de tejido cerebral se diluyó en tampón de PBS. La curva estándar osciló entre 8 y 100 nM de T14 y el blanco fue tampón de PBS solo. Brevemente, se recubrieron inmunoplacas de 96 pocillos (NUNC) con 100 µL/pocillo de T14 de la muestra o estándar, se recubrieron con parafina y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente la muestra se retiró sacudiendo la placa sobre un fregadero con agua corriente, y se añadieron 200 µL de la solución de bloqueo que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBS-T) y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 100 µL de anticuerpo, diluidos en solución de bloqueo a razón de 1 µg/mL, y se incubó durante la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se retiró al día siguiente y los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µL de TBS-T. Después se añadieron 100 µL de anticuerpo secundario conjugado con enzima diluido en solución de bloqueo a razón de 0.1 µg/mL y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente; la placa se cubrió con Parafilm durante todas las incubaciones. Después de 2 horas, la placa se lavó 4 veces con TBS-T. La adición de 3,3,5,5-tetrametilbencidina inició la reacción de color. La reacción se detuvo 20 minutos más tarde con una solución de parada que contenía H_2SO_4 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Wokingham, RU).

Ejemplo 1

Los inventores se propusieron detectar los niveles del péptido tóxico T14 (AEFHRWSSYMVHWK - SEQ ID No: 3), el receptor nicotínico alfa-7 y las proteínas de acetilcolinesterasa (AChE) usando transferencia Western en lisado celular y medios de cultivo celular de siete líneas celulares de cáncer (MEC-1, KG1a, H929, MCF-7, MDA-MB 231, CLL,

JJN3), y linfocitos B normales actuando como control. Además, se detectaron los niveles del péptido T14 mediante ELISA.

Resultados de la Transferencia Western

Se llevó a cabo la transferencia Western (WB) para detectar los niveles de T14, AChE y receptor de acetilcolina nicotínico alfa 7 en lisado celular (CL) de siete líneas celulares de cáncer diferentes y linfocitos B normales como control. Los datos cualitativos mostraron que se detectaron todos T14, AChE y el receptor alfa 7 en el CL de todas las líneas celulares. Sorprendentemente, las tres proteínas tienen una movilidad prácticamente idéntica (véanse las Figuras 1A, B y C). Los inventores no consideran que esto sea reactividad cruzada de anticuerpos porque las tres proteínas mostraron una movilidad diferente en el homogeneizado de cerebro humano (datos no mostrados). Posteriormente, se cuantificaron los niveles de T14, AChE y receptor alfa 7 y se normalizaron frente a los niveles de proteína totales (Colins et al., 2015).

Los datos cuantitativos mostraron que los niveles de T14, receptor alfa 7 y AChE dentro de cada línea celular eran similares, con la excepción de que la línea MCF-7 tenía niveles bajos de T14 celular (véase la Figura 2). Sin embargo, los niveles de T14, receptor alfa 7 y AChE fueron variables entre líneas celulares (véase la Figura 2).

Curiosamente, dentro del lisado celular, se encontraron correlaciones positivas significativas entre los niveles de T14 y el receptor alfa 7 (véase la Figura 3A), el receptor alfa 7 y AChE (véase la Figura 3B), los niveles de T14 y AChE (véase la Figura 3C). Estas correlaciones y la movilidad idéntica de las bandas de proteínas sugieren que los T14, AChE y receptor alfa 7 existen como un complejo proteico dentro de las células cancerosas con una proporción de 1: 1: 1.

Posteriormente, se llevó a cabo Transferencia Western para detectar los niveles de T14 y posiblemente el receptor alfa-7 y AChE liberados en los medios de cultivo de células cancerosas (CCM) de las líneas celulares anteriores. Los datos cualitativos mostraron que solo se liberó T14 en los medios de cultivo celular (véase la Figura 4), pero no AChE (véase la Figura 4). Se liberó una pequeña cantidad de receptor alfa 7 en los medios de cultivo celular (véase la Figura 4), lo que sugiere que podrían provenir de células cancerosas flotantes muertas.

Los datos cuantitativos mostraron que T14 liberado en los medios de cultivo celular fue mayor que T14, receptor alfa 7 y AChE celulares en las líneas celulares MEC-1, KG1a, linfocitos B normales y MDA-MB-231 (véase la Figura 5). Sin embargo, T14 liberado en los medios de cultivo celular fue similar a los niveles de T14, el receptor alfa 7 y AChE en las líneas celulares primarias CLL, JJN3, H929 y MCF-7 (véase la Figura 5).

Posteriormente, los niveles de T14 dentro del medio de cultivo celular se correlacionaron con los niveles de T14, AChE y receptor alfa 7 dentro del lisado celular. Se encontró una correlación inversa significativa entre los niveles de T14 liberados en los medios de cultivo celular y los niveles del receptor alfa 7 en el lisado celular (véase la Figura 6a). Los inventores creen que esto podría ser un mecanismo patológico general ya que este efecto también ocurre en la corteza cerebral y el locus Coeruleus de los pacientes de Alzheimer (datos no mostrados). No se encontró una correlación evidente entre T14 dentro de los medios de cultivo celular y los niveles de T14 dentro del lisado celular, aunque hubo una correlación inversa significativa cuando solo se incluyeron cuatro líneas celulares en el análisis (véase la Figura 6B, grupo gris oscuro). Además, no se encontró una correlación evidente entre T14 dentro del medio de cultivo celular y los niveles de AChE dentro del lisado celular incluso cuando los grupos de células se analizaron por separado (véase la Figura 6C).

Resultados de ELISA

Niveles de T14 en lisado celular y medios de cultivo celular

El objetivo era determinar los niveles endógenos de T14 en células cancerosas de diversa propensión metastásica, proporcionados amablemente por el profesor Chris Pepper de Cardiff University, tanto en el material intracelular recuperado de las células lisadas como en los niveles de T14 liberados en el medio de crecimiento de las células (CCM) utilizando el método de ELISA. El método utilizó los resultados combinados de una proteína total (ensayo de Pierce) para proporcionar una medida de µg de T14 por cada mg de proteína en la muestra. Los resultados muestran un alto grado de variación en los niveles de T14 entre las líneas celulares y entre el lisado celular y los medios celulares dentro de las líneas celulares, como se muestra en la Figura 7.

T14 fue más alto en el lisado celular en la línea celular MDA-MB, pero la misma línea celular mostró niveles más bajos de T14 en los medios celulares comparativamente. Se demostró que los niveles de T14 eran más altos en la línea celular MCF-7, sin embargo, esta línea celular también tenía una de las concentraciones más bajas de T14 en el lisado celular, lo que sugiere que, aunque T14 se expresa mucho en esta línea celular, hay aproximadamente 5 veces más fuera de las células que dentro de las células. Solo JJN3 y KG1a tenían niveles significativamente diferentes de T14 al comparar los niveles intracelulares y extracelulares. En JJN3, se observa el mismo perfil que en la línea celular MDA-MB con niveles extracelulares de T14 significativamente más altos que los niveles intracelulares. La línea celular KG1a es la única línea celular que demuestra un nivel significativamente mayor de T14 en el lisado celular en comparación con los medios. T14 en los medios de la línea celular CLL estuvo por debajo del límite de detección para este ensayo.

Comparación de los datos de T14 por ELISA de la línea celular cancerosa con los datos de la línea celular cancerosa WB

Utilizando los resultados obtenidos del ELISA y los recogidos de las transferencias Western, los inventores compararon µg de T14/mg de proteína y T14/proteína total tanto en el lisado celular como en el medio celular. Se observó una correlación inversa significativa entre los niveles de T14 por WB y T14 por ELISA medidos en los medios celulares, así como en el lisado celular, como se puede observar en la Figura 8.

Tanto el medio celular como el lisado celular demuestran correlaciones inversas entre los niveles de T14 medidos por WB y ELISA ($P < 0.0001$, $R^2 = 0.4956$ y $P = 0.0315$, $R^2 = 0.1451$ respectivamente) después de realizar un análisis de regresión lineal, mostrando las líneas de mejor ajuste (líneas continuas) junto con el intervalo de confianza del 95 % (líneas punteadas).

Resumen

1) Dentro de las células cancerosas, se detectaron T14, receptores alfa 7 y AChE, aunque en cantidades variables. Sorprendentemente, las tres proteínas tienen una movilidad similar y sus niveles se correlacionan positivamente entre sí, lo que sugiere que forman complejos entre sí.
2) Fuera de las células cancerosas (es decir, dentro de los medios de cultivo celular), solo se detectó el péptido T14 tóxico, pero no se liberaron AChE ni alfa-7 en los medios externos. Además, los niveles de T14 fueron más altos fuera de las células que dentro de seis de las siete líneas celulares de cáncer, lo que sugiere que T14 se produce para ser liberado de la célula. Además, la movilidad de T14 fuera de la célula era diferente en comparación con la del interior de las células.
3) Curiosamente, los niveles de T14 fuera de las células cancerosas se correlacionaron significativamente negativamente con los niveles del receptor alfa-7 dentro de las células cancerosas. Los inventores postulan que esto podría ser la base de un mecanismo de enfermedad general como también es el caso dentro de la corteza cerebral y el locus coeruleus homogeneizado de pacientes con enfermedad de Alzheimer (pero no de pacientes de control), en la que existe una correlación positiva entre T14 y alfa-7. Los inventores creen que esto puede deberse a las altas concentraciones del péptido T14 que subregulan su receptor objetivo en individuos enfermos.
4) Los niveles de T14 dentro y fuera de las células cancerosas también se midieron mediante ELISA. Los niveles de T14 en los medios de células cancerosas y el lisado celular medidos por ELISA se correlacionaron inversamente de manera significativa con los de la transferencia Western. Esto sugeriría que ELISA puede estar midiendo monómeros T14, mientras que la transferencia Western mide niveles agregados de T14, por lo que los niveles son complementarios.

Ejemplo 2

El objetivo de este ejemplo fue investigar, mediante transferencia Western, la relación entre el marcador metastásico CD44 con el péptido tóxico T14, AChE, y el receptor alfa-7 en fracciones de membrana y citosol de seis líneas celulares de cáncer (JJN3, MDA-MB231, MCF-7, KG1a, MEC-1, H929) y una línea celular derivada de cáncer (PC12).

Resultados de transferencia Western

Los datos cualitativos mostraron que, en la fracción de membrana de todas las líneas celulares, CD44, AChE y T14 tienen una movilidad similar (como se muestra en la Figura 9A, C, E), pero que alfa-7 mostró una movilidad de proteína diferente (véase la Figura 9G). Se encontró la misma relación entre CD44, AChE y T14 en la porción de citosol de todas las líneas celulares (véanse las Figura 9B, D, F), siendo alfa-7 nuevamente la excepción (véanse la Figura 9H).

Posteriormente, los cuatro niveles de péptido/proteína (CD44, AChE, alfa-7 y T14) se cuantificaron y normalizaron frente a los niveles de proteína total (Colins et al., 2015). Los datos cuantitativos mostraron que las líneas celulares de cáncer fuertemente metastásico (KG1a, MDA-MB231, MEC-1) tienen más péptidos/proteínas en su membrana en comparación con el citosol, mientras que las líneas celulares de cáncer débilmente metastásico/línea celular derivada del cáncer (JJN3, H929, MCF -7 y PC12) mostraron relaciones variables entre la membrana y las proteínas/péptidos citosólicos (véase la Figura 10).

Lo que es más importante, los niveles del marcador metastásico CD44 se correlacionan significativa y positivamente con AChE tanto en la membrana (véase la Figura 11A) como en las fracciones de citosol (véase la Figura 11B), así como con T14 en las fracciones de membrana (Figura 11C) y citosol (Figura 11D). Además, los niveles de AChE y T14 están significativa y positivamente correlacionados entre sí tanto en la membrana (Figura 11E) como en las fracciones de citosol (Figura 11F). Este hallazgo sugiere fuertemente que AChE y T14 son buenos predictores del grado de metástasis del cáncer y quizás los intermediarios moleculares fundamentales. Por lo tanto, el bloqueo de las acciones de señalización de AChE y T14 se puede utilizar como terapia contra el cáncer.

Resumen

1) En seis líneas celulares de cáncer y células PC12, el marcador metastásico (CD_{44}) se correlaciona significativa y positivamente con la molécula T14 tóxica, así como con AChE.

2) Esta correlación es cierta tanto dentro de la membrana de la célula cancerosa como dentro del citosol de la célula cancerosa.
3) Este hallazgo sugiere fuertemente que T14 y AChE son buenos predictores del grado de metástasis del cáncer, y quizás los intermediarios moleculares fundamentales.

Ejemplo 3 - ELISA de T14 - cohorte de CLL

Dada la clara función de T14 en la metástasis del cáncer, los inventores exploraron mediante ELISA el potencial de T14 como biomarcador del cáncer y su relación con la tasa de supervivencia del paciente.

Materiales y Métodos

Anticuerpo T14*:* El anticuerpo fue sintetizado por Genosphere Biotechnologies (París, Francia). Se usaron dos conejos de Nueva Zelanda con cuatro inmunizaciones de péptido hemocianina de lapa californiana (KLH) (hapteno T14: CAEFHRWSSYMVHWK (SEQ ID No: 7); C se incluyó para enlazar con KLH como inmunógeno) durante 70 días. Se sangró a los animales cuatro veces y se agruparon los sangrados. A continuación, el antisuero se pasó a través de una columna de gravedad con soporte peptídico unido covalentemente y, tras el lavado, los anticuerpos se eluyeron en tampón ácido y la solución se neutralizó. La diálisis adicional contra el tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y la liofilización completaron el proceso.

ELISA para el anticuerpo peptídico T14: Las curvas estándar y las muestras se corrieron por triplicado. Las muestras de suero humano se diluyeron 1:10,000 y la curva estándar para la determinación del contenido relativo de T14 en las muestras se diluyó en tampón de PBS. La curva estándar osciló entre 3.3 y 40 nM de T14. Brevemente, se recubrieron inmunoplacas de 96 pocillos (NUNC) con 100 µL/pocillo de T14 de muestra o estándar, se cubrieron con Parafilm y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la muestra se retiró sacudiendo la placa sobre un fregadero con agua corriente, y se añadieron 200 mL de la solución de bloqueo que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % en solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBS-T) y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 100 µL de anticuerpo, diluidos en solución de bloqueo a razón de 1 µg/mL, y se incubó durante la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se retiró al día siguiente y los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µL de TBS-T. Después se añadieron 100 mL de anticuerpo secundario conjugado con enzima diluido en solución de bloqueo a razón de 0.1 mg/mL y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente; la placa se cubrió con Parafilm durante todas las incubaciones. Después de 2 h, la placa se lavó 4 veces con TBS-T. La adición de 3,3,5,5-tetrametilbencidina inició la reacción de color. La reacción se detuvo 30 minutos más tarde con una solución de parada que contenía H_2SO_4 2M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Versamax (Molecular Devices, Wokingham, RU).

Análisis*:* Los resultados del ensayo se registran en una unidad arbitraria de densidad óptica (DO). La DO del blanco se restó de la señal de cada muestra antes del análisis. La DO de cada muestra en el ensayo se comparó con una línea base de la concentración más baja conocida de T14 en la curva estándar. La densidad óptica podría entonces representarse en relación con una señal conocida y registrarse como una proporción de esta señal. Todas las muestras se compararon en cuanto a su nivel relativo de T14, ya que todavía no es posible obtener una lectura directa de la curva estándar con el método actual en muestras de sangre humana. La agrupación de las muestras en los grupos "alto", "medio alto", "medio bajo" y "bajo" se define por la distancia del valor relativo del valor medio de toda la cohorte. Como los valores se distribuyen normalmente, todos los valores de una desviación estándar de 1 de la media están en el intervalo medio y son "medio alto" si están por encima de la media, y "medio bajo" si están por debajo de la media. Los valores de T14 "bajo" son aquellos que están por debajo y más allá de la desviación estándar de la media. Por el contrario, "alto" son aquellos que están por encima y también más allá de la desviación estándar de la media.

Resultados y discusión

Con referencia a la Figura 23, se muestra un gráfico de barras del intervalo de niveles de T14 medidos por ELISA en relación con una concentración conocida de T14 exógeno. Los pacientes están ordenados por rangos según las concentraciones relativas de T14 en la cohorte de pacientes con CLL examinada.

Con referencia a la Figura 24, se muestra una tabla de valores de T14 medidos por ELISA en relación con una concentración conocida de T14 exógeno en la cohorte de pacientes con CLL examinada y un agrupamiento estadístico.

Con referencia a la Figura 25, se muestran los valores de ELISA en 2 grupos diferentes divididos por la concentración relativa de T14 analizada estadísticamente usando la estimación de Kaplan Meier realizada en 100 muestras de suero de CLL.

Con referencia a la Figura 26, se muestran los valores de ELISA en 4 grupos diferentes divididos por la concentración relativa de T14 analizada estadísticamente usando la estimación de Kaplan Meier realizada en 100 muestras de suero de CLL.

Ejemplo 4 - Datos de transferencia Western en las muestras de cáncer (cohorte de CLL)

Dada la función de T14 en la metástasis del cáncer, los inventores exploraron, mediante transferencia Western, el potencial de T14 como biomarcador del cáncer y su relación con la tasa de supervivencia del paciente.

Materiales y Métodos

Muestras*:* A un total de 100 pacientes con CLL se les tomó suero antes de su tratamiento y posteriormente fueron tratados y monitoreados durante 16 años.

Transferencia Western*:* Las concentraciones de proteína se determinaron en las muestras de suero anteriores utilizando el ensayo de proteínas a 660 nm de Pierce^{MC} (Thermo Scientific, 22660). Posteriormente, se realizó el análisis de transferencia Western de las muestras utilizando el método previamente establecido [Garcia Rates et al., 2016 - Garcia-Rates, S., Morrill, P., Tu, H., Pottiez, G., Badin, A., Tormo-Garcia, C., Heffner, C., Coen, C. and Greenfield, S. (2016) '(I) pharmacological profiling of a novel modulator of the α7 nicotinic receptor: Blockade of a toxic acetylcholinesterase-derived peptide increased in Alzheimer brains', Neuropharmacology. doi: 10.1016/j. neuropharm.2016.02.006.]. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpos anti-T14 (1:1000) [Garcia Rates et al., 2016]. El anticuerpo secundario utilizado fue anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Abcam, ab6721, 1:5000). Las bandas de proteína derivadas de los lisados celulares se cuantificaron utilizando Image J, midiendo la intensidad óptica total y, posteriormente, se normalizaron a los niveles de proteína total utilizando Blot FastStain para controlar el error de carga.

Análisis de los datos*:* Los valores de T1450 KDa/TP se clasificaron de menor a mayor y se calculó la mediana. Posteriormente, los valores se dividieron en dos grupos: el grupo gris claro contenía valores por debajo de la mediana y el grupo gris oscuro contenía valores por encima de la mediana (Figura 28). Finalmente, se realizó la estimación de Kaplan Meier en los dos grupos anteriores. El análisis puede evaluar el efecto de un tratamiento sobre el número de sujetos que sobrevivieron o se salvaron después de ese tratamiento durante un período de tiempo (TTFT: tiempo hasta el primer tratamiento). La curva de supervivencia se obtiene calculando las probabilidades de ocurrencia de un evento en un momento determinado y multiplicando estas probabilidades sucesivas por cualquier probabilidad calculada anteriormente para obtener la estimación final.

Resultados

Con referencia a la Figura 27, se muestra una tabla con valores sin procesar de T14 de 50 KDa normalizados a proteína total de 100 muestras de suero de pacientes con leucemia detectados por WB, grupos separados por debajo y por encima de la mediana.

Con referencia a la Figura 28, la estimación de Kaplan Meier realizada en los dos grupos mostró una alta significacia de pronóstico en esta cohorte. Los pacientes con valores de T14 de 50 KDa/TP en suero inferiores a la mediana (grupo gris claro) tenían 2.37 veces más probabilidades de requerir tratamiento en la unidad de tiempo que aquellos con valores de T14/TP en suero superiores a la mediana (grupo gris oscuro), como se ilustra en la relación de riesgo (HR = 2.37, P = 0.01, Figura 42). Además, este análisis de supervivencia mostró que los valores de T14 de 50 KDa/TP son TTFT predicativos. No se alcanzaron los tiempos medios de supervivencia estimados para el grupo de bajo riesgo y 8.05 años para el grupo de alto riesgo.

Discusión

Los inventores han demostrado previamente que T14 está implicado en el mecanismo del cáncer y es un buen biomarcador del cáncer. Por lo tanto, T14, junto con las herramientas de pronóstico convencionales, puede predecir la supervivencia del paciente y el tiempo hasta el primer tratamiento.

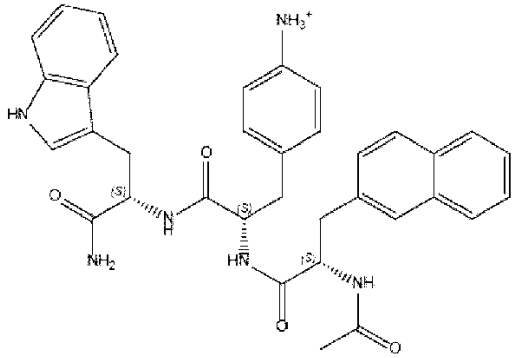
Conclusiones

En conclusión, la transferencia Western es un método sorprendentemente fiable para detectar el estado de la leucemia. Aunque, en la actualidad, los datos de ELISA pueden no utilizarse de forma fiable como indicación clínica, podrían mostrar el mecanismo subyacente que media en la migración celular.

Ejemplo 5 - Diseño y producción de inhibidores peptidomiméticos de T14

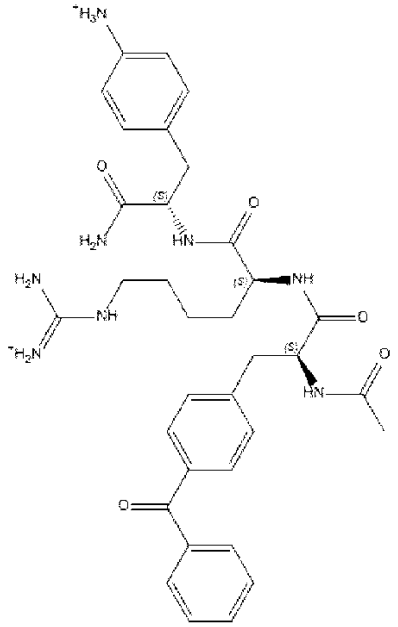
[Los inventores han diseñado y sintetizado compuestos peptidomiméticos que inhiben la actividad de T14 y, por lo tanto, y compiten con T30 por el sitio activo alostérico del receptor nicotínico.

Compuesto 1 - Tri02 (puntuación: -10.2)



4-((S)-2((S)-2-acetamido-3-(naftalen-2-il)propanamido)-3-(((S)-1-amino-3-(1H-indol-3-il)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-oxopropil)bencenaminio

Compuesto 2 – Trio 4 (puntuación: -9.4)



4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-acetamido-3-(4-benzoilfenil)propanamido)-6-((amino(iminio)metil)amino)hexanamido)-3-amino-3-oxopropil)bencenaminio

Ejemplo 6 - Síntesis de compuestos identificados

Materiales y métodos

Genosphere Biotechnologies sintetizó los compuestos 1 y 2 inhibidores de T14 (Tri 02 y Tri 04) del ejemplo 5 y analizó su pureza mediante RP-HPLC (>99 % de pureza) y masas por espectroscopia de masas (MS promedio 604.79 para Tri02 y 628.83 para Tri04).

Breve descripción etapa a etapa de la síntesis de TRI02 - Secuencia: [acetil]-[2Nal][4nh2-F]-Trp-[amida]

1) Boc-Trp-OH+ClooEt+NH3.H2O------Boc-Trp-NH2, reacción en THF, extraído con éter acético.

2) Boc-Trp-NH2, HCl 4 N, se eliminó Boc-, se obtuvo H-Trp-NH2.HCl, reacción de precipitación con éter dietílico.

3) (2-naftil)-Ala + anhídrido acético---Ac-(2-naftil)-Ala-OH, reacción en THF/H2O, extraído con éter acético.

4) Boc-(4-NH2)-Phe-OH + H-Trp-NH2.HCl----Boc-(4-NH2)-Phe-Trp-NH2, reacción en DMF, extraído con éter acético.

5) Boc-(4-NH2)-Phe-Trp-NH2, HCl 4 N, se eliminó Boc-, se obtuvo H-(4-NH2)-Phe-Trp-NH2.HCl, reacción de precipitación con éter dietílico.

6) Ac-(2-naftil)-Ala-OH + H-(4-NH2)-Phe-Trp-NH2.HCl--Ac-(2-naftil)-Ala-(4-NH2)-Phe-Trp-NH2, reacción en DMF, extraído con éter acético.

7) Purificación

Breve descripción etapa a etapa de la síntesis de TRI04 - Secuencia: [acetil]-[bpa]R[4NH2-F]-[amida]

1) Rink Amida MBHA. Se empapa nuevamente la resina en DCM durante 30 minutos, se bombea seco, se lava con DMF 3 veces, se seca con bomba.

2) Se añade Fmoc-(4-NH2)Phe-OH, DIEA, HBTU, DMF, N2, reacción durante 30 minutos, se bombea seco, se lava con DMF 6 veces, se bombea en seco.

3) Se añade piperidina/DMF para eliminar Fmoc-, reacción durante 20 minutos, se bombea seco, se lava con DMF 3 veces, se bombea seco.

4) Se añade Fmoc-Arg(Pbf)-OH, DIEA, HBTU, DMF, N2, reacción durante 30 minutos, se bombea seco, se lava con DMF 6 veces, se bombea seco.

5) Se repite la etapa 3.
6) Se añade Fmoc-Bpa-OH, DIEA, HBTU, DMF, N2, reacción durante 30 minutos, se bombea seco, se lava con DMF seis veces, se bombea seco.

7) Se repite la etapa 3.

8) Se añade anhídrido acético/DMF, N2, reacción durante 30 minutos, se bombea seco, se lava con DMF 3 veces, se bombea seco, lavar con DCM 3 veces, se bombea seco, se lava con MeOH 3 veces, se bombea seco.

9) El péptido se escinde de la resina, se bombea seco, reacción de precipitación con éter dietílico, obtención del péptido crudo, secado centrífugo.

10) Purificación

Ejemplo 7 - T30 frente a T14:

Con referencia a la Figura 43, el trabajo inicial de los inventores se realizó con T14 de 14 mer, demostrando ser trófico-tóxico en una variedad de preparaciones. Si bien la secuencia activa del péptido AChE se puede atribuir a una secuencia específica de 14 aminoácidos que se origina en la cola del extremo terminal C de AChE (T14) (Greenfield, 2013 -Greenfield, S.A. (2013) 'Discovering and targeting the basic mecanismo of neurodegeneration: The role of peptides from the c-terminus of acetylcholinesterase: Non-hydrolytic effects of ache: The actions of peptides derived from the c-terminal and their relevance to neurodegeneration', Chemico-biological interactions. 203(3), pp. 543-6. doi: 10.1016/j.cbi.2013.03.015), el tratamiento con péptido AChE exógeno en investigaciones ha involucrado más recientemente un péptido de 30 aminoácidos (T30) que incluye el motivo activo T14: el T30 más grande tiene menos probabilidades de formar fibrillas cuando está en solución, por lo que posee una mayor estabilidad y una mayor eficacia que T14 (Bond et al., 2009; Bond, C., Zimmermann, M. and Greenfield, S. (2009) 'Upregulation of alpha7 Nicotinic receptors by Acetylcholinesterase c-terminal peptides', PloS one., 4(3). doi: 0.1371/journal.pone.0004846).

Por lo tanto, el péptido T30 se utilizó a lo largo de este estudio (Badin, AS, Morrill, P., Devonshire, I., Greenfield, SA, 2016 Jan 7. (II) Physiological profiling of an endogenous acetylcholinesterase-derived peptide in the basal forebrain: age-related bioactivity and blockade with a novel modulator. Neuropharmacology. 105, 47e60). Los 15 residuos de aminoácidos en el extremo terminal C de T30, 'T15', se ha utilizado como control, ya que resultó ser inerte por sí solo y, por lo tanto, no contribuyó a la bioactividad de T14. Además, la eficacia de T14 en sí se ha demostrado en la necesidad de que el anticuerpo se una a una lisina terminal en el extremo terminal C que no estaría expuesta dentro de la secuencia más larga de T30. Por lo tanto, T30 es útil para explorar los efectos del péptido exógeno o su contraparte endógena.

En resumen, T30 es una herramienta experimental conveniente para explorar los efectos trófico-tóxicos, proporcionando un control inerte y permitiendo que el anticuerpo detecte T14 endógeno sin contaminación cruzada con la sonda peptídica exógena (T30). Por consiguiente, cualquier dato que muestre que se inhibe la actividad de T30 es una demostración de que también se inhibe la actividad de T14.

Ejemplo 8 - Evaluación del compuesto 1 (Tri02) y el compuesto 3 (Tri04) en cultivos celulares

Los inventores probaron T30, NBP-14 y Tri02 en estudios de cultivos celulares para determinar sus efectos sobre la actividad de la acetilcolinesterasa y la entrada de calcio, y los efectos de Tri04 sobre la entrada de calcio.

Materiales y métodos

1. Ensayo de actividad de AChE

La actividad de AChE se midió usando el reactivo de Ellman que mide la presencia de grupos tiol como resultado de la actividad de AChE. En el caso del experimento G4, la actividad de AChE (G4) se probó sola y también junto con NBP14 o Tripéptidos. Las células PC12 se sembraron en placas el día anterior al experimento en cuanto al ensayo de viabilidad celular. Las células se trataron con T30 (1 µM) solo o combinado con NBP14 o Tripéptido (0.5 µM). Después del tratamiento, se recolectó el sobrenadante (perfundido) de cada tratamiento y se agregaron 25 µL de cada condición a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano, seguido de la adición de 175 µL de reactivo de Ellman (Solución A: KH2PO4 139 mM y K2HPO4 79.66 mM, pH 7.0; solución B (sustrato): yoduro de acetiltiocolina 11.5 mM; Solución C (Reactivo): 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) 8 mM y NaHCO3 15 mM). El reactivo de Ellman se preparó como una mezcla de las 3 soluciones en una proporción de 33(A):3(B):4(C). Se tomaron medidas de absorbancia durante un intervalo de 60 minutos entre experimentos a 405 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Wokingham, RU).

2. Fluorometría de calcio

Las células PC12 se sembraron en placa en 200 µL de medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) más 2 mM de medio de L-glutamina el día antes del experimento en placas de 96 pocillos. El día del experimento, la solución Fluo-8 (Abcam) se preparó según lo descrito por el proveedor agregando 20 µL de Fluo-8 en el tampón de ensayo que contiene 9 mL de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y 1 mL de Pluronic F127 Plus. Posteriormente, se retiraron 100 µL de medio de crecimiento y se añadieron 100 µL de solución Fluo-8. Se añadieron tratamientos con T30 junto con NBP14 o Tripéptidos y se incubaron durante 30 minutos en la incubadora y 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 1 h, la placa se colocó en el lector de placas de fluorescencia (Fluostar, Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Antes de leer la fluorescencia, se preparó PNU282987 1 µM, un agonista específico de alfa 7 de los receptores nicotínicos, y se colocó en el inyector Fluostar. Para cada pocillo, la lectura se formó mediante una lectura de fluorescencia basal seguida de una inyección de PNU282987 que indujo un aumento de calcio a través de los receptores nicotínicos.

3. Análisis de los datos

En cada una de las diferentes técnicas celulares, el análisis estadístico se realizó con el promedio de los valores porcentuales de 3 o más experimentos. Las comparaciones entre múltiples grupos de tratamiento y el mismo control se realizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y pruebas post-hoc de Tukey utilizando GraphPAD Instat (software GraphPAD, San Diego, CA). Se tomó significación estadística a un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Los resultados para Tri02 se muestran en las Figuras 12 y 13, en las que los valores de n que se muestran en los gráficos posteriores se refieren al número de experimentos repetidos. Como puede verse, T30 1 µM aumenta la entrada de calcio y la actividad de AChE y, como se muestra en trabajos previos (véase el documento WO 2005/004430), NBP14 1 µM protege contra estos efectos tóxicos.

Además, como se puede observar en las figuras, Tri02 también protege claramente contra los efectos tóxicos de T30 al reducir tanto la entrada de calcio como la actividad de AChE. Como tal, los inventores están convencidos de que Tri02 actúa como un inhibidor de la actividad de T14 y puede usarse para tratar el cáncer o la metástasis.

Los resultados para Tri04 en cultivo de células PC12 se muestran en la Figura 19. Las células se derivaron de una línea de células PC12, que provienen de un tumor de la glándula suprarrenal y actúan como neuronas (Bornstein y al., Mol. Psychiatry (2012), 17, 354-358). Como puede verse, Tri04 también protege los efectos tóxicos de T30 al reducir la entrada de calcio en estas células, lo que indica que actúa como un inhibidor de T14 y, por lo tanto, puede usarse para tratar el cáncer o la metástasis.

Ejemplo 9 - Evaluación del compuesto 1 en cortes de cerebro

Los inventores probaron NBP-14 y Tri02 en estudios de cortes de cerebro utilizando imágenes de colorantes sensibles al voltaje (VSDI).

Materiales y métodos

1. Preparación de cortes de cerebro

Se anestesiaron ratas Wistar macho (14 días de edad) usando isoflurano (~15 mL, 100 % p/p). Se aplicó isoflurano a la cama de algodón en el fondo de una cámara de anestesia (caja de vidrio de 20 × 15 × 15 cm) donde luego se colocaron las ratas durante aproximadamente 45 s hasta que se alcanzó la anestesia completa. Se pellizcó la pata trasera de cada rata anestesiada para comprobar la profundidad adecuada de la anestesia. Tras la confirmación de la anestesia, las ratas se decapitaron rápidamente, y el cerebro se extrajo rápidamente y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial para "cortes" oxigenado enfriado con hielo (aCSF en mmol: 120 NaCl, 5 KCL, 20 NaHCO3, 2.4 CaCl2, 2 MgSO4, 1.2 KH2PO4, 10 glucosa, 6.7 sal de HEPES y 3.3 HEPES ácido; pH = 7.1). A continuación, se

tomaron cortes coronales (400 µm de espesor) de un bloque de cerebro que contenía el prosencéfalo basal, es decir, el complejo MS-dBB (entre +9.20 y +9.48 mm Interaural y +0.48 y +0.2 mm Bregma, Figura 4A) y la corteza de campo somatosensorial en barril (SiBF, entre +8.08 y +7.20 mm Interaural y -0.92 mm y -1.80 mm Bregma) (Paxinos y Watson, 1998) utilizando un Vibratome (Leica VT1000S). Luego, se transfirieron los cortes a un burbujeador que contenía aCSF oxigenado a temperatura ambiente (registrando aCSF en mmol: 124 de NaCl, 5 de KCL, 20 de NaHCO3, 2.4 de CaCl2, 2 de MgSO4, 1.3 de KH2PO4, 10 de glucosa; pH = 7.4) que era idéntico al utilizado en el registro de VSDI (imágenes de colorantes sensibles al voltaje). A continuación, los cortes se dejaron durante aproximadamente 1 - 1.5 horas antes de prepararlos para la tinción con VSD.

2. Configuración de VSD

Los cortes se colocaron en una cámara oscura de alta humedad llena de aCSF burbujeado con 95 % de O2, 5 % de CO2. Una vez allí, se aplicó la solución de colorante (colorante estirilo 4-[2-[6-(dibutilamino)-2-naftalenil]-etenil]-1-(3-sulfopropil hidróxido de piridinio 0.2 mM) (Di-4-NEPPS) al 4 %, Invitrogen, Paisley, RU en 48 % de aCSF, 48 % de suero bovino fetal, 3.5 % de DMSO y 0.4 % de cremóforo EL) (Tominaga et al., 2000) a los cortes durante 20-25 minutos antes de volver a transferirlas a un recipiente de burbujeo que contenía aCSF oxigenado mantenido a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Al iniciar los registros VSDI, los cortes se colocaron en el baño de registro sobre un pequeño trozo de papel de filtro para permitir el flujo de aCSF oxigenado en la parte inferior del corte y para mantenerlo vivo. Luego, el corte se pesó con una rejilla de plástico hecha en casa que se colocó encima del corte. La solución del baño de perfusión se calentó a 30 ± 1 °C mediante un calentador de etapas. Se colocó un electrodo de estimulación bipolar concéntrico (FHC, Maine, EE. UU.) en la banda diagonal ventral del prosencéfalo basal con estimulación a 30 V. Para la adquisición de datos de VSD, se registraron imágenes bidimensionales, equivalentes a 88x60 píxeles, utilizando la cámara de alta resolución MiCam02 (Brain Vision, Japón) con el software de imágenes BV_Analyze. La adquisición de imágenes se acopló al software Spike2 V4.23 (CED Ltd, Cambridge, RU) para alinear la captura de imágenes con el protocolo de estimulación (cada 28 s con 30 repeticiones) a través del Micro 1401 MkII. (CED Ltd, Cambridge, RU). La luz se generó utilizando una lámpara de visualización/óptica Osram halógena xenophot 64634 HLX EFR y se filtró para emitir luz verde (530 ± 10 nm) utilizando un MHF-G150LR (Moritex Corporation) acoplado al sistema de imágenes de alta resolución MiCam02 y filtró la fluorescencia emitida a través de un filtro de paso alto de >590 nm.

3. Preparación y aplicación de fármacos.

Acetilcolinesterasa (AChE) péptido de 30 aminoácidos del extremo terminal C (T30; secuencia: 'N'-KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL - SEQ ID No: 2), la versión cíclica de la región activa de 14 aminoácidos de T30 (NBP14; secuencia: c[AEFHRWSSYMVHWK] - SEQ ID No: 3; c[] = cíclico, del extremo terminal N al extremo terminal C) y el péptido de 15 aminoácidos inerte contenido dentro de la secuencia de T30 (T15; secuencia: 'N' - NQFDHYSKQDRCSDL - SEQ ID No: 4) se sintetizaron a medida y se adquirieron a través de Genosphere Biotechnologies (París, Francia) con una pureza >99 %. El peptidomimético lineal, Tri02 fue diseñado *in silico* por Iproteos (Barcelona, España) y sintetizado y adquirido a través de Genosphere Biotechnologies con una pureza >99 %. Todos los patrones de fármacos y péptidos se prepararon en alícuotas congeladas antes de los experimentos. Para la producción de soluciones de perfusión, las soluciones patrón se descongelaron y se agregaron al registro aCSF según corresponda y se aplicó un baño a una velocidad constante de 1.5 mL/min de perfusión utilizando la bomba peristáltica Minipulse 3 (Gilson Scientific Ltd., Bedfordshire, RU). Cada ensayo experimental duró 52 minutos, con 20 minutos para establecer un registro de referencia (perfusión con registro de aCSF solamente), 12 minutos para permitir que la solución del fármaco se perfundiera en el baño y para permitir que las moléculas de colorante se asentaran en las membranas celulares y finalmente, un período de registro de 20 minutos que mide la respuesta en presencia de la solución del fármaco.

4. Análisis de datos y estadística

A partir de las imágenes bidimensionales generadas con cada condición del fármaco, se extrajeron los datos críticos, tales como el transcurso del tiempo de activación, la intensidad y la propagación de la señal fluorescente general. Estos datos se procesaron con un script personalizado para convertirlos en archivos utilizables de MatLab (Mathworks Inc. Massachusetts, EE. UU.) y luego se analizaron con una caja de herramientas de Matlab creada específicamente para el análisis de datos de VSDI (Bourgeois et al., 2014). Esta caja de herramientas permite la selección de una geometría de región de interés (ROI) fija que se puede aplicar a cada corte, para extraer y cotejar los datos de una ROI idéntica en todos los sectores utilizados en cada experimento. Para los cortes del prosencéfalo basal, la ROI que se utilizará es el complejo MSdBB, elegido porque abarca el MS (núcleos septales mediales), VDB (banda diagonal ventral) y HDB (banda diagonal horizontal). Más importante aún, esta ROI se eligió para incluir la totalidad de la respuesta evocada. Esta respuesta se puede graficar como una única serie de tiempo promediada o sobre el espacio y el tiempo en un 'mapa de espacio-tiempo' para proporcionar una descripción cualitativa de los datos. Sin embargo, para producir valores cuantificables, se calculó el área bajo la curva de la serie temporal (cambio fraccional de fluorescencia sumado) entre el momento de la estimulación (t = 0) y 156 ms después. Debido a la variabilidad de las respuestas observadas entre cada corte individual, los datos sin procesar generados de cada experimento se normalizaron con respecto a su propia línea de referencia para dar valores de fluorescencia normalizados. Este método de cuantificación se eligió para tener en cuenta los múltiples componentes de la señal generada por VSDI (ChemLa y

Chavane, 2010), a saber, el pico inmediato y la respuesta de latencia prolongada (Badin et al., 2016). Las estadísticas se realizaron en Prism Graphpad 6.

5. Análisis de péptidos moduladores

A lo largo de los experimentos en los que se utilizó T30, se observó un aumento o una disminución de la señal. Por lo tanto, al promediar estos resultados juntos, no se detectó ningún cambio. Sin embargo, dados los efectos moduladores observados en el pasado de este péptido en varias preparaciones (Bon and Greenfield, 2003, Day and Greenfield, 2004, Greenfield et al., 2004, Badin et al., 2013) y el hecho de que los cambios inducidos por la aplicación de T30 en este tipo de preparación están moderadamente correlacionados negativamente (r = -0.4286, p = 0.0257, correlación de rangos de Spearman, n = 27, Figura 13A) con la amplitud de respuesta de línea de referencia, se decidió que estos resultados deberían dicotomizarse según se observara un aumento o una disminución.

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación similar para cada experimento en el que se añadió un compuesto exógeno (Figura 16). Tras la determinación de una correlación significativa, los datos se clasificaron en función de si se observó un aumento o una disminución.

Resultados

Con referencia a las Figuras 14 y 15, la adición de TriO2 4 µM recapitula los resultados observados con la aplicación de NBP14 4 µM.

Con referencia a la Figura 14, la adición de NBP14 (4 µM) al perfundido indujo pequeñas alteraciones no significativas en la magnitud (fluorescencia sumada) de las respuestas evocadas. Aunque insignificantes, se encontró que estos pequeños cambios inducidos estaban inversamente correlacionados con la magnitud de la respuesta de la línea de referencia; como resultado, los datos se dividieron en ensayos que causaron disminuciones leves (histogramas de la izquierda) y aquellos que causaron un aumento (histogramas de la derecha), tanto en formato de datos reales (arriba) como normalizados (abajo). Si se consideraran juntos, el conjunto de datos no mostraría ningún cambio con respecto a la línea de referencia (ya que los aumentos y las disminuciones se cancelarían entre sí), sin embargo, era crucial verificar que NBP14 no indujera efectos significativos, incluso cuando los cambios de fluorescencia se consideraron por separado.

Como se muestra en la Figura 15, la adición de TriO2 (4 µM) al perfundido indujo pequeñas alteraciones en la magnitud (fluorescencia sumada) de las respuestas provocadas, con disminuciones inducidas (n = 8 de 11 en total) que muestran una desviación significativa del nivel de referencia normalizado (histograma inferior izquierdo, p < 0.05). También se encontró que estos cambios estaban inversamente correlacionados con la magnitud de la respuesta de línea base; como resultado, los datos se dividieron en ensayos que causaron disminuciones (histogramas de la izquierda) y aquellos que causaron aumentos (histogramas de la derecha), tanto en formato de datos reales (arriba) como normalizados (abajo). Si se consideraran juntos, el conjunto de datos no mostraría ningún cambio con respecto a la línea base (ya que los aumentos y las disminuciones se cancelarían entre sí), sin embargo, era crucial verificar que NBP14 no indujera efectos significativos, incluso cuando los cambios de fluorescencia se consideraron por separado.

Análisis de peptidomiméticos moduladores

Con referencia a la Figura 16, se muestra un análisis de correlación para los datos de Tri02 (4 µM) y T30 (2 µM) (n = 15) que muestra que su perfusión conjunta induce algunos cambios en la magnitud de las respuestas evocadas, con algunos cortes presentando ligeros aumentos en actividad (n=6) mientras que la mayoría mostró ligeras disminuciones (n=9). Se encontró que esta correlación era significativa (p = 0.0405; r^2 = -0.534), proporcionando justificación para dividir los datos en aquellos que mostraron aumentos y disminuciones en la actividad evocada como resultado de la aplicación de Tri02 y T30, tal como se hizo para la adición de NBP14 y Tri02 (Figura 14 y 15, respectivamente).

Con referencia a la Figura 17, se muestra la cuantificación de los efectos mediados por la adición de Tri02 y T30: tanto en el caso de aumentos como de disminuciones inducidas, no se encontró que Tri02 protegiera contra las desviaciones inducidas por T30 con respecto al valor de línea base, con disminuciones significativas (panel izquierdo, p <0.01, n = 9) y aumentos (panel derecho, p <0.05, n = 6) informados en los efectos generales.

Como se muestra en la Figura 18, todo el gráfico lineal de efectos normalizados con respecto a la línea de base para experimentos que prueban los efectos de aCSF normal (línea negra), T30 2 µM (líneas rojas), T30 (2 µM) y NBP14 4 µM (líneas azules), T30 (2 µM) y TriO2 4 µM, experimentos de control con NBP14 (4 µM) (Figura 11, líneas anaranjadas), experimentos de control con TriO2 (4 µM) (Figura 15, líneas moradas). Este gráfico muestra las disminuciones normalizadas en relación con el valor de línea base y entre sí, con T30 solo induciendo la mayor desviación, y Tri02 mostrando cierta eficacia en el bloqueo de las desviaciones inducidas por T30, aunque todavía se producen cambios significativos en su perfusión conjunta (líneas verdes).

Ejemplo 10 - Evaluación del compuesto 2 en cortes de cerebro

Los inventores probaron Tri04 en estudios de cortes de cerebro utilizando imágenes de colorantes sensibles al voltaje (VSDI).

Materiales y métodos

1. Preparación de cortes de cerebro

Se prepararon cortes de cerebro como en el Ejemplo 8.

2. Configuración de VSD

Los cortes se colocaron en una cámara oscura de alta humedad llena de aCSF burbujeando con 95 % de O2 y 5% de CO_2. Una vez allí, la solución de colorante (colorante estidilo 4-[2-[6-(dibutilamino)-2-naftalenil]-etenil]-1-(3-sulfopropil)hidróxido de piridinio (Di-4-ANEPPS, Invitrogen, Paisley, RU) 0.2 mM al 4 % (Tominaga et al., 2000) en 48 % de aCSF, 48 % de suero bovino fetal, 3,5 % de DMSO y 0,4 % de cremóforo EL) se aplicó a los cortes durante 20 a 25 minutos antes de transferirlas a un recipiente burbujeador de aCSF (temperatura ambiente, 22 C+/ - 1.5 C) durante 1 h para lavar el exceso de colorante y recuperarlo.

Al comenzar los registros de VSD, los cortes se colocaron en el baño de registro en un pequeño trozo de papel de filtro para mantener viva el corte y se pesaron adecuadamente utilizando una rejilla de plástico hecha en casa colocada encima del corte. La solución del baño de perfusión se calentó a 30 +/- 1 C mediante un calentador de etapas. Se colocó un electrodo de estimulación bipolar concéntrico (FHC, Maine, EE. UU.) en la banda diagonal ventral del prosencéfalo basal con una estimulación de 30 V. Para la adquisición de datos de VSD, se registraron imágenes de 16 bits con una resolución de 1 ms con una cámara digital (Brain Vision MiCAM Ultima R3- V20 Master) con el software de imágenes Ultima 2004/08 (Brain Vision) acoplado a Spike 2 V6.0 (CED Ltd, Cambridge, RU) que se usó para activar estimulaciones con respecto al ISI apropiado. La luz se generó usando una lámpara de visualización/óptica Osram halógena xenophot 64634 HLX EFR y se filtró para emitir luz verde (530 +/- 10 nm) usando un MHF-G150LR (Moritex Corporation) acoplado al sistema de imágenes ultrarrápidas MiCAM Ultima y se filtró la fluorescencia emitida a través de un filtro de paso alto > 590 nm.

3. Preparación y aplicación de fármacos.

El peptidomimético lineal, Tri04, fue diseñado *in silico* por Iproteos (Barcelona, España) y sintetizado y adquirido a través de Genosphere Biotechnologies con una pureza >99 %. Todos los patrones de fármacos y péptidos se prepararon en alícuotas congeladas antes de los experimentos. Para la producción de soluciones de perfusión, las soluciones patrón se descongelaron y se agregaron al registro de aCSF según corresponda y se aplicó un baño a una velocidad constante de 1.5 mL/min de perfusión utilizando la bomba peristáltica Minipulse 3 (Gilson Scientific Ltd., Bedfordshire, RU). Cada ensayo experimental duró 52 minutos, con 20 minutos para establecer un registro de referencia (perfusión con registro de aCSF solamente), 12 minutos para permitir que la solución del fármaco se perfundiera en el baño y para permitir que las moléculas de colorante se asentaran en las membranas celulares y finalmente, un período de registro de 15 minutos que mide la respuesta en presencia de la solución del fármaco.

5. Análisis de péptidos moduladores

A lo largo de la mayoría de los experimentos en los que se utilizó T30, se observó una disminución de la señal. T30 indujo una inhibición neta (n = 21) en la señal de VSDI registrada en el prosencéfalo basal de ratas p14; este valor en realidad incluye una minoría de casos en los que se observaron efectos insignificantes o marginalmente positivos durante la perfusión de T30 (Badin et al., 2016).

Resultados y discusión

Con referencia a las Figuras 20, 21 y 22, la adición de TriO4 4 µM recapitula los resultados observados anteriormente con la aplicación de NBP14 4 µM, mientras que TriO4 2 µM en la solución de perfusión determina un efecto significativo en la actividad de la población del prosencéfalo basal.

Análisis de peptidomiméticos moduladores

Con referencia a la Figura 20A, se muestra que los mapas de espacio-tiempo exhiben una recuperación en la actividad del prosencéfalo basal debido a la presencia de TriO4 2 µM en el perfundido que contiene 2 µM de T30 (n = 29). Más específicamente, Tri04 2 µM determina una inversión del efecto inhibitorio de T30 sobre la actividad medida por estimulación directa del prosencéfalo basal de rata.

Con referencia a la Figura 20B, los gráficos de barras relativos a las 3 épocas de registro muestran cambios en la respuesta evocada después de la aplicación de Tri04, lo que confirma que la perfusión conjunta de Tri04 2 µM induce un aumento en la actividad de la red (n = 29, p = 0.06, prueba t pareada de dos colas) causado por una inhibición de los efectos inducidos por T30.

Con referencia a la Figura 21, se muestra que las series temporales de respuesta en las tres condiciones de registro (línea base, aplicación de T30 al líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) y aplicación conjunta de T30 y Tri04 al aCSF

muestran un perfil de activación similar para registros de T30 y T30+Tri04 para los primeros 100 ms, mientras que posteriormente se detecta una mayor actividad en los registros realizados en presencia de Tri04, lo que confirma un papel protector de Tri04 sobre T30.

Con referencia a la Figura 22, se muestran gráficos de barras relativos a tres condiciones de registro. La perfusión conjunta de Tri04 4 µM en el líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) que contiene T30 2 µM determina un efecto significativo que invierte la actividad de T30. En particular, se ha encontrado que Tri04 protege contra las desviaciones inducidas por T30 desde la línea base con un aumento significativo ($n = 20$, $p < 0.05$, prueba t pareada de dos colas) en la actividad del prosencéfalo basal en comparación con los registros en presencia de T30 solo. Por lo tanto, Tri04 muestra cierta eficacia bloqueando los efectos tóxicos de T30 en la actividad de la red a escala meso.

Conclusiones

Tratamiento para el cáncer

Los inventores han demostrado en este documento que el anticuerpo y los dos peptidomiméticos, Tri02 y Tri04, actúan como inhibidores de la actividad del péptido T14, debido a los claros efectos inhibidores sobre T30 en los datos mostrados en este documento. Por consiguiente, estos compuestos se pueden usar para tratar, mejorar o prevenir el cáncer, y especialmente la enfermedad metastásica.

Diagnóstico/pronóstico de cáncer

Los inventores también han demostrado que T14, o variantes del mismo, tales como sus truncamientos, pueden usarse como marcador de diagnóstico o pronóstico de cáncer, y especialmente de enfermedad metastásica. Los niveles bajos de T14 medidos mediante transferencias Western en la sangre son indicativos de tasas de supervivencia más bajas y un tiempo más largo correspondiente al primer tratamiento (es decir, estado clínico).

Listado de Secuencias

<110> Neuro-Bio Ltda.

<120> Cancer

<130> AXH/78632PCT1

<150> GB1601585.1
<151> 2016-01-28

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 614
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Arg Pro Pro Gln Cys Leu Leu His Thr Pro Ser Leu Ala Ser Pro
1               5                  10                  15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp Leu Leu Gly Gly Gly Val Gly Ala Glu
            20                  25                  30

Gly Arg Glu Asp Ala Glu Leu Leu Val Thr Val Arg Gly Gly Arg Leu
        35                  40                  45

Arg Gly Ile Arg Leu Lys Thr Pro Gly Gly Pro Val Ser Ala Phe Leu
    50                  55                  60

Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Met Gly Pro Arg Arg Phe Leu Pro
65                  70                  75                  80

Pro Glu Pro Lys Gln Pro Trp Ser Gly Val Val Asp Ala Thr Thr Phe
                85                  90                  95

Gln Ser Val Cys Tyr Gln Tyr Val Asp Thr Leu Tyr Pro Gly Phe Glu
            100                 105                 110

Gly Thr Glu Met Trp Asn Pro Asn Arg Glu Leu Ser Glu Asp Cys Leu
        115                 120                 125

Tyr Leu Asn Val Trp Thr Pro Tyr Pro Arg Pro Thr Ser Pro Thr Pro
    130                 135                 140

Val Leu Val Trp Ile Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Gly Ala Ser Ser
145                 150                 155                 160

Leu Asp Val Tyr Asp Gly Arg Phe Leu Val Gln Ala Glu Arg Thr Val
```

```
                165                 170                 175

Leu Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Gly Ala Phe Gly Phe Leu Ala Leu
            180                 185                 190

Pro Gly Ser Arg Glu Ala Pro Gly Asn Val Gly Leu Leu Asp Gln Arg
        195                 200                 205

Leu Ala Leu Gln Trp Val Gln Glu Asn Val Ala Ala Phe Gly Gly Asp
    210                 215                 220

Pro Thr Ser Val Thr Leu Phe Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ala Ser Val
225                 230                 235                 240

Gly Met His Leu Leu Ser Pro Pro Ser Arg Gly Leu Phe His Arg Ala
                245                 250                 255

Val Leu Gln Ser Gly Ala Pro Asn Gly Pro Trp Ala Thr Val Gly Met
            260                 265                 270

Gly Glu Ala Arg Arg Arg Ala Thr Gln Leu Ala His Leu Val Gly Cys
        275                 280                 285

Pro Pro Gly Gly Thr Gly Gly Asn Asp Thr Glu Leu Val Ala Cys Leu
    290                 295                 300

Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val Leu Val Asn His Glu Trp His Val Leu
305                 310                 315                 320

Pro Gln Glu Ser Val Phe Arg Phe Ser Phe Val Pro Val Val Asp Gly
                325                 330                 335

Asp Phe Leu Ser Asp Thr Pro Glu Ala Leu Ile Asn Ala Gly Asp Phe
            340                 345                 350

His Gly Leu Gln Val Leu Val Gly Val Val Lys Asp Glu Gly Ser Tyr
        355                 360                 365

Phe Leu Val Tyr Gly Ala Pro Gly Phe Ser Lys Asp Asn Glu Ser Leu
    370                 375                 380

Ile Ser Arg Ala Glu Phe Leu Ala Gly Val Arg Val Gly Val Pro Gln
385                 390                 395                 400

Val Ser Asp Leu Ala Ala Glu Ala Val Val Leu His Tyr Thr Asp Trp
                405                 410                 415
```

```
Leu His Pro Glu Asp Pro Ala Arg Leu Arg Glu Ala Leu Ser Asp Val
            420                 425                 430

Val Gly Asp His Asn Val Val Cys Pro Val Ala Gln Leu Ala Gly Arg
        435                 440                 445

Leu Ala Ala Gln Gly Ala Arg Val Tyr Ala Tyr Val Phe Glu His Arg
    450                 455                 460

Ala Ser Thr Leu Ser Trp Pro Leu Trp Met Gly Val Pro His Gly Tyr
465                 470                 475                 480

Glu Ile Glu Phe Ile Phe Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Arg Asn Tyr
                485                 490                 495

Thr Ala Glu Glu Lys Ile Phe Ala Gln Arg Leu Met Arg Tyr Trp Ala
            500                 505                 510

Asn Phe Ala Arg Thr Gly Asp Pro Asn Glu Pro Arg Asp Pro Lys Ala
        515                 520                 525

Pro Gln Trp Pro Pro Tyr Thr Ala Gly Ala Gln Gln Tyr Val Ser Leu
    530                 535                 540

Asp Leu Arg Pro Leu Glu Val Arg Arg Gly Leu Arg Ala Gln Ala Cys
545                 550                 555                 560

Ala Phe Trp Asn Arg Phe Leu Pro Lys Leu Leu Ser Ala Thr Asp Thr
                565                 570                 575

Leu Asp Glu Ala Glu Arg Gln Trp Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser
            580                 585                 590

Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln
        595                 600                 605

Asp Arg Cys Ser Asp Leu
    610
```

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Lys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys Asn
1               5                   10                  15

    Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu
                20                  25                  30
```

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Gln Phe Asp His Tyr Ser Lys Gln Asp Arg Cys Ser Asp Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Tyr Met Val His Trp Lys
1 5

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Val His Trp Lys
1

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 7

Cys Ala Glu Phe His Arg Trp Ser Ser Tyr Met Val His Trp Lys
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar a un individuo que padece cáncer o enfermedad metastásica, o tiene una predisposición a ello, o para proporcionar un pronóstico de una afección de un individuo, comprendiendo el método detectar, en una muestra obtenida del individuo, la presencia de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, significa que el individuo sufre de cáncer o enfermedad metastásica, o tiene predisposición a padecerla, o la afección del individuo tiene un pronóstico negativo.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende detectar la presencia de un péptido de la SEQ ID No:3.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el individuo es un vertebrado, un mamífero o un animal doméstico.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo es un ser humano, opcionalmente un niño o un adulto.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, saliva, lágrimas, aspirado de mama, líquido prostático, líquido seminal, líquido vaginal, heces, raspado cervical, citos, líquido amniótico, fluido intraocular, mucosidad, humedad en el aliento, tejido animal, lisados celulares, tejido tumoral, cabello, piel, raspados bucales, linfa, fluido intersticial, uñas, médula ósea, cartílago, priones, polvo óseo, cerumen o combinaciones de los mismos.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra comprende una muestra de sangre, opcionalmente sangre venosa o sangre arterial.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la muestra de sangre comprende suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende usar un inmunoensayo para detectar la SEQ ID No: 3.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el inmunoensayo comprende el uso de un anticuerpo, opcionalmente en el que el ensayo comprende el uso de transferencia Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo fluorométrico, ensayo quimioluminiscente o análisis de radioinmunoensayo.

10. Un kit para usar en el diagnóstico de un sujeto que padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a la misma, o para proporcionar un pronóstico de la afección del sujeto, comprendiendo el kit medios de detección para determinar la concentración de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, presente en una muestra de un sujeto de prueba, en el que la presencia del péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tenga al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, en la muestra sugiere que el sujeto padece cáncer o enfermedad metastásica, o una predisposición a ello.

11. Un kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra es sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, saliva, lágrimas, aspirado de mama, líquido prostático, líquido seminal, líquido vaginal, heces, raspado cervical, citos, líquido amniótico, líquido intraocular, moco, humedad en el aliento, tejido animal, lisados celulares, tejido tumoral, cabello, piel, raspados bucales, linfa, líquido intersticial, uñas, médula ósea, cartílago, priones, polvo óseo, cerumen o combinaciones de los mismos, preferiblemente en el que la muestra comprende una muestra de sangre.

12. Un kit para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que los medios de detección comprenden un ensayo adaptado para detectar la presencia y/o ausencia de células positivas de la SEQ ID No: 3 en la muestra, en el que el ensayo comprende una prueba basada en un inmunoensayo.

13. Un kit para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el ensayo comprende un anticuerpo.

14. Un kit para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el ensayo comprende el uso de transferencia Western.

15. Uso de un péptido de la SEQ ID No: 3, o un fragmento o variante del mismo que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID No: 3, como biomarcador de diagnóstico o pronóstico de cáncer o enfermedad metastásica.

Figura 1

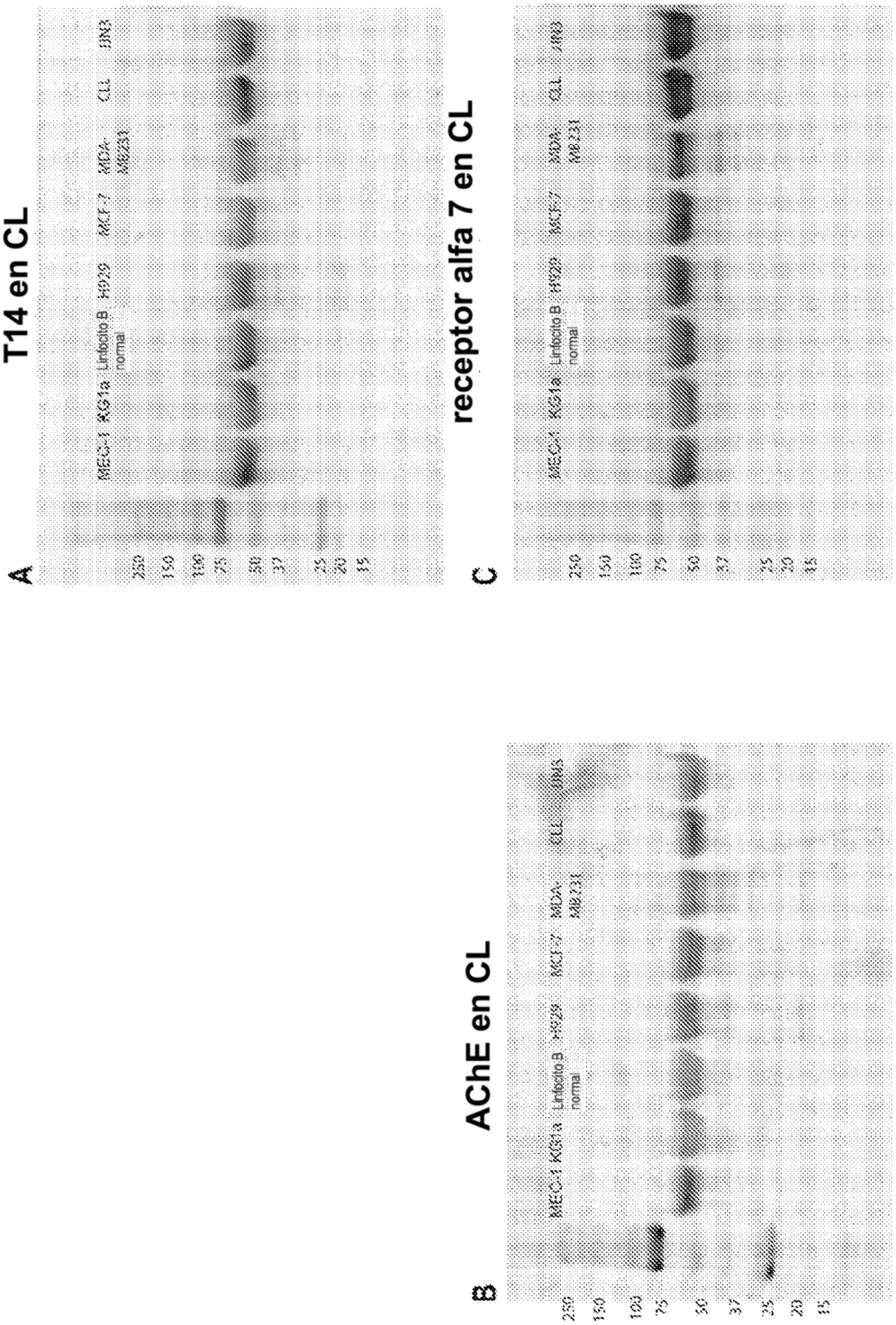

A
T14 en CL
MEG-1
KG1a
Linfocito B normal
H929
MCF-7
MDA-MB231
CLL
RAJI
250
150
100
75
50
37
25
20
15
C
receptor alfa 7 en CL
B
AChE en CL

Figura 2

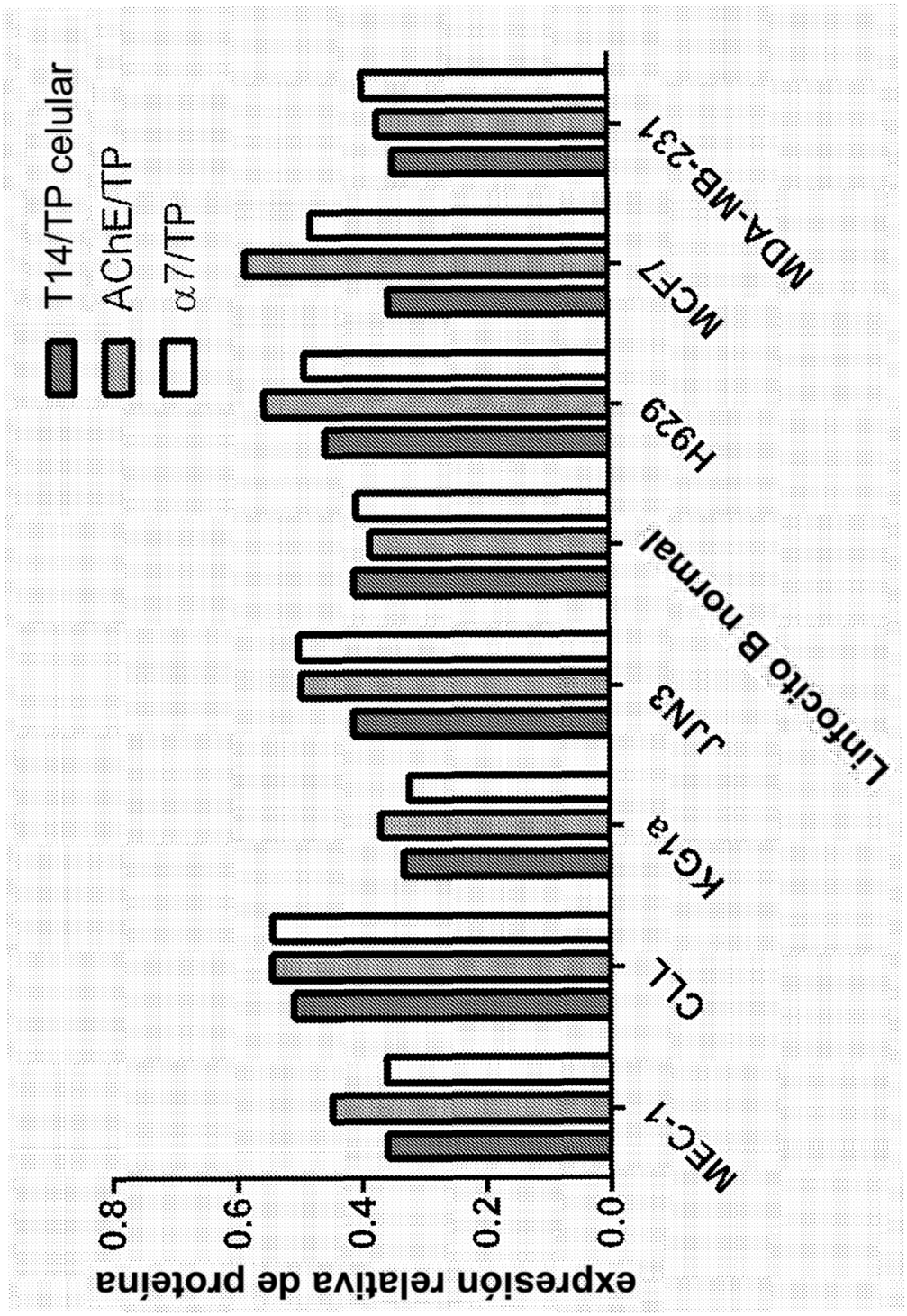

T14/TP celular
AChE/TP
α7/TP
expresión relativa de proteína
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
MEC-1
CLL
KG1a
JJN3
Linfocito B normal
H929
MCF7
MDA-MB-231

Figura 3

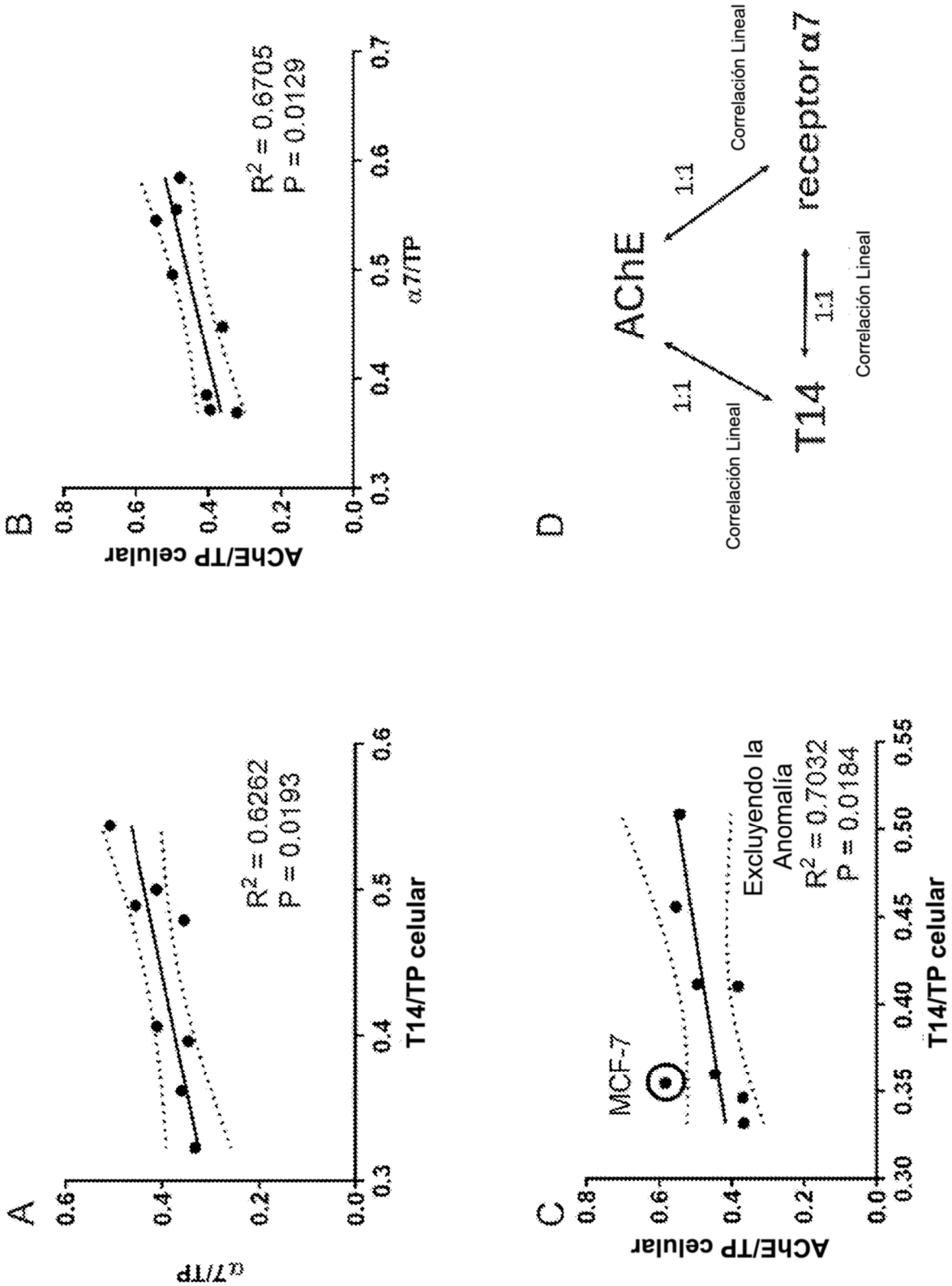

A
α7/TP
T14/TP celular
R² = 0.6262
P = 0.0193
B
AChE/TP celular
α7/TP
R² = 0.6705
P = 0.0129
C
AChE/TP celular
T14/TP celular
MCF-7
Excluyendo la Anomalía
R² = 0.7032
P = 0.0184
D
AChE
receptor α7
T14
1:1
Correlación Lineal
1:1
Correlación Lineal
1:1
Correlación Lineal

Figura 4

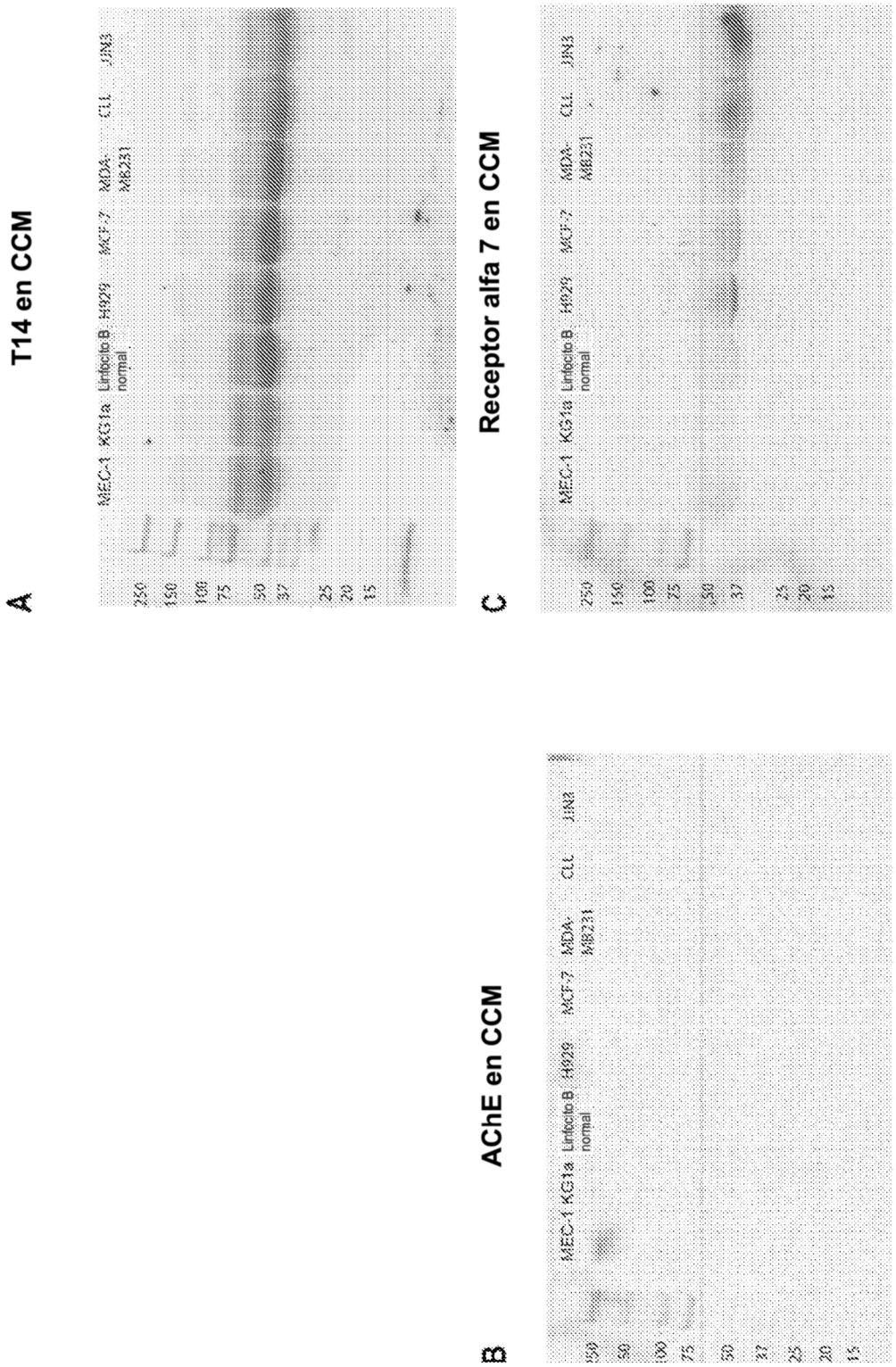

A
T14 en CCM
MEC-1
KG1a
Linfocito B normal
H929
MCF-7
MDA-MB231
CLL
JIN3
250
150
100
75
50
37
25
20
15
C
Receptor alfa 7 en CCM
B
AChE en CCM

Figura 5

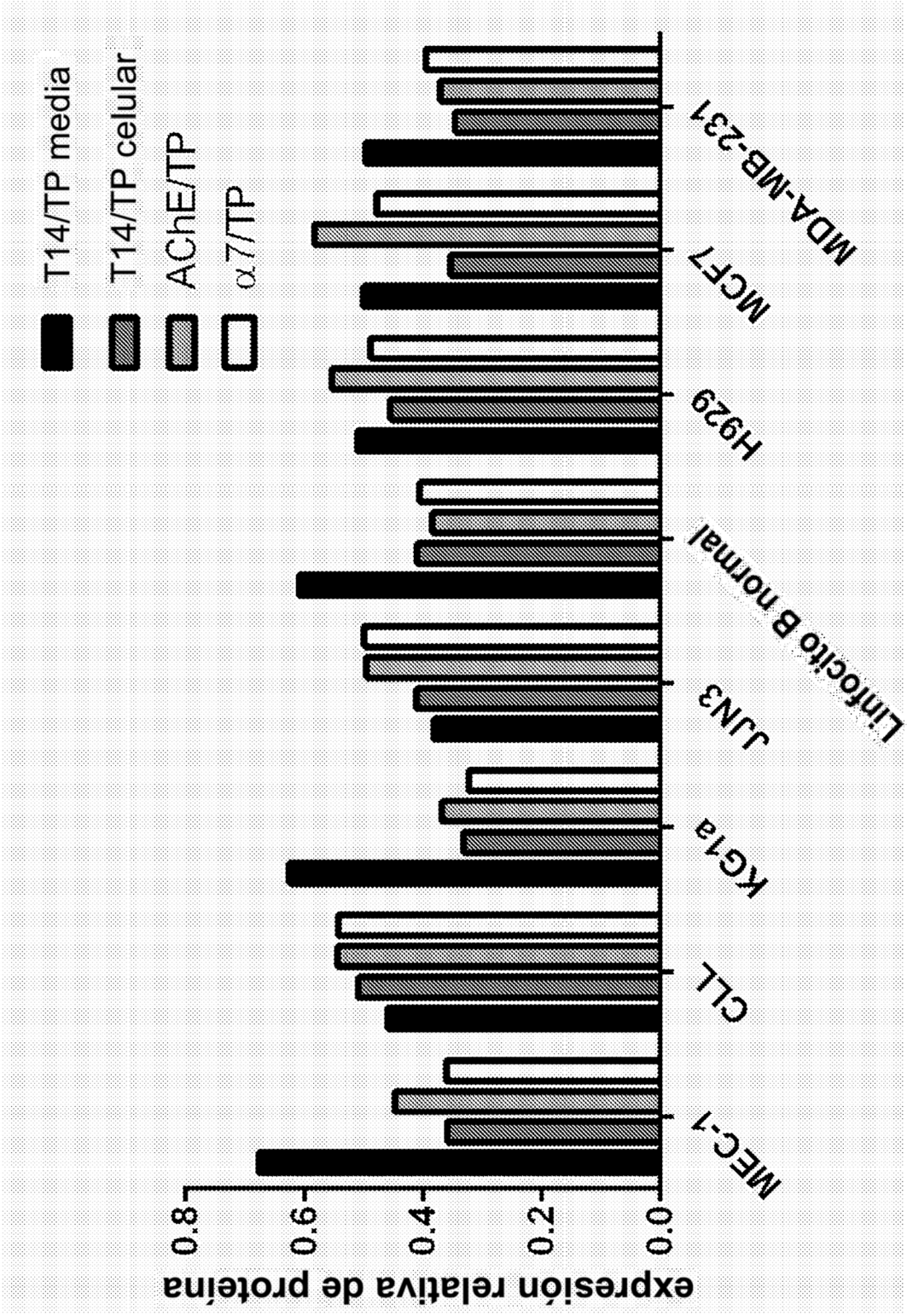

T14/TP media
T14/TP celular
AChE/TP
α7/TP
expresión relativa de proteína
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
MEC-1
CLL
KG1a
JJN3
Linfocito B normal
H929
MCF7
MDA-MB-231

Figura 6

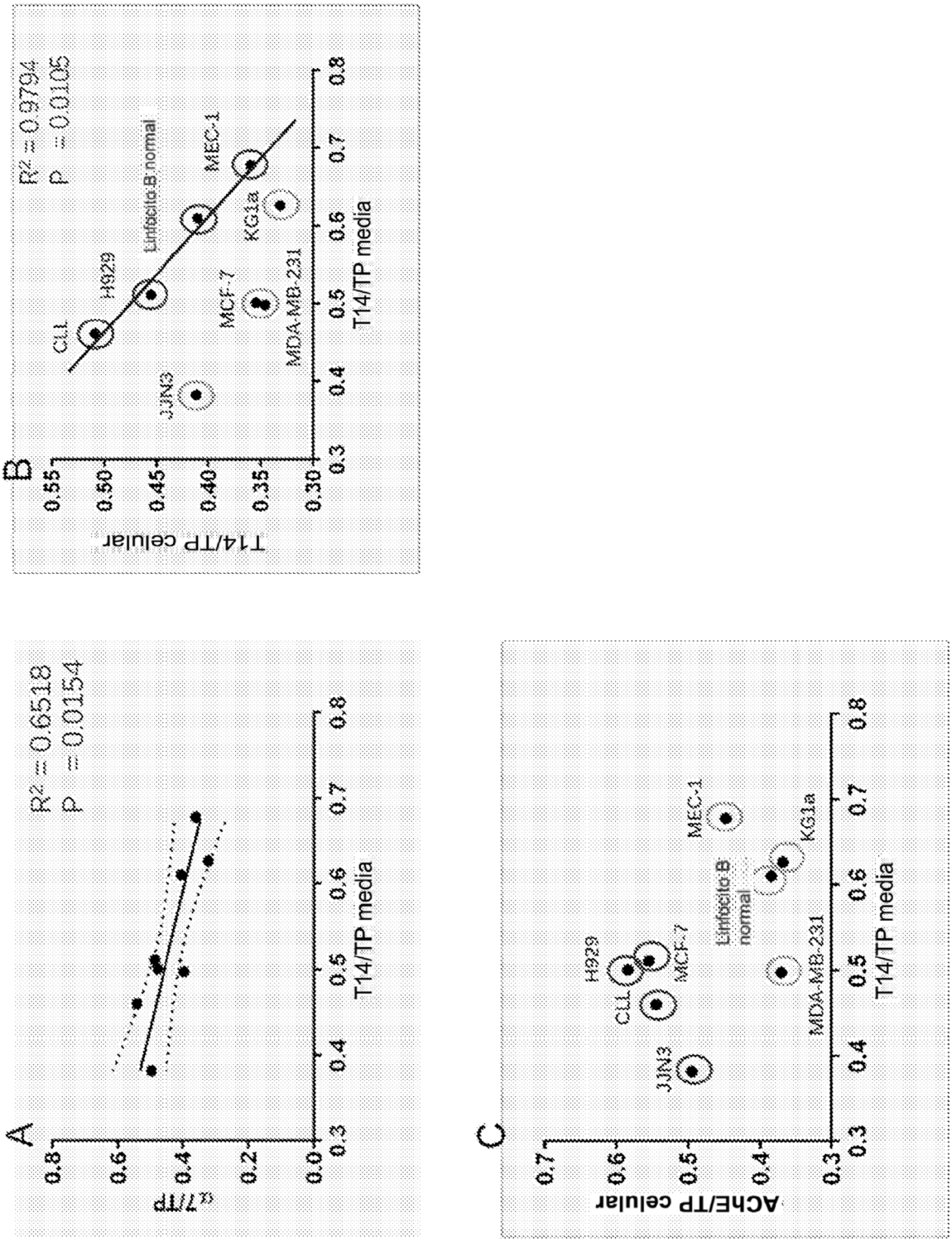

A
R² = 0.6518
P = 0.0154
α7/TP
T14/TP media
B
R² = 0.9794
P = 0.0105
T14/TP celular
T14/TP media
CLL
H929
Linfocito B normal
JJN3
MCF-7
MEC-1
KG1a
MDA-MB-231
C
AChE/TP celular
T14/TP media

Figura 7

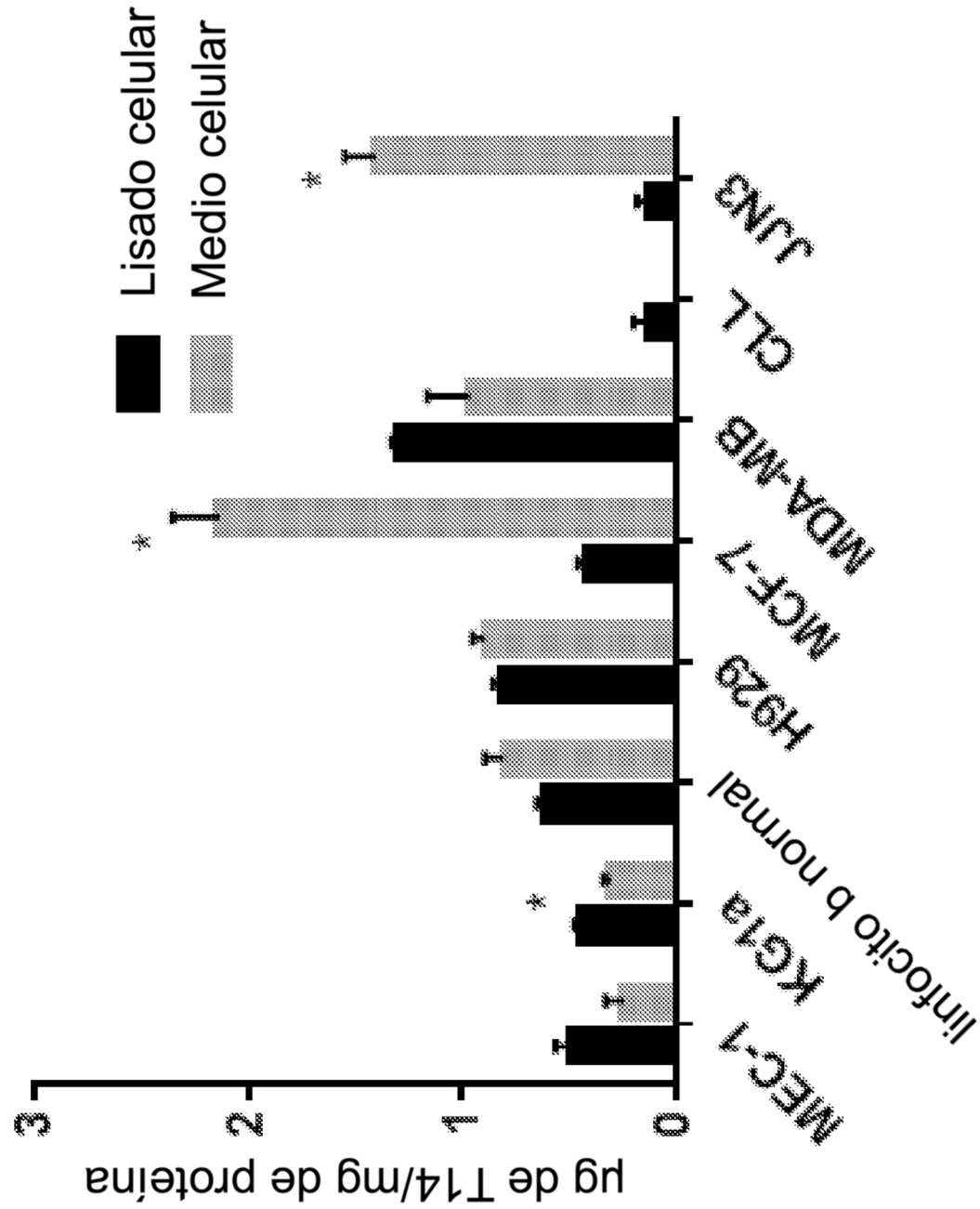

Lisado celular
Medio celular
µg de T14/mg de proteína
0
1
2
3
MEC-1
KG1a
linfocito b normal
H929
MCF-7
MDA-MB
CLL
JJN3
*
*
*

Figura 8

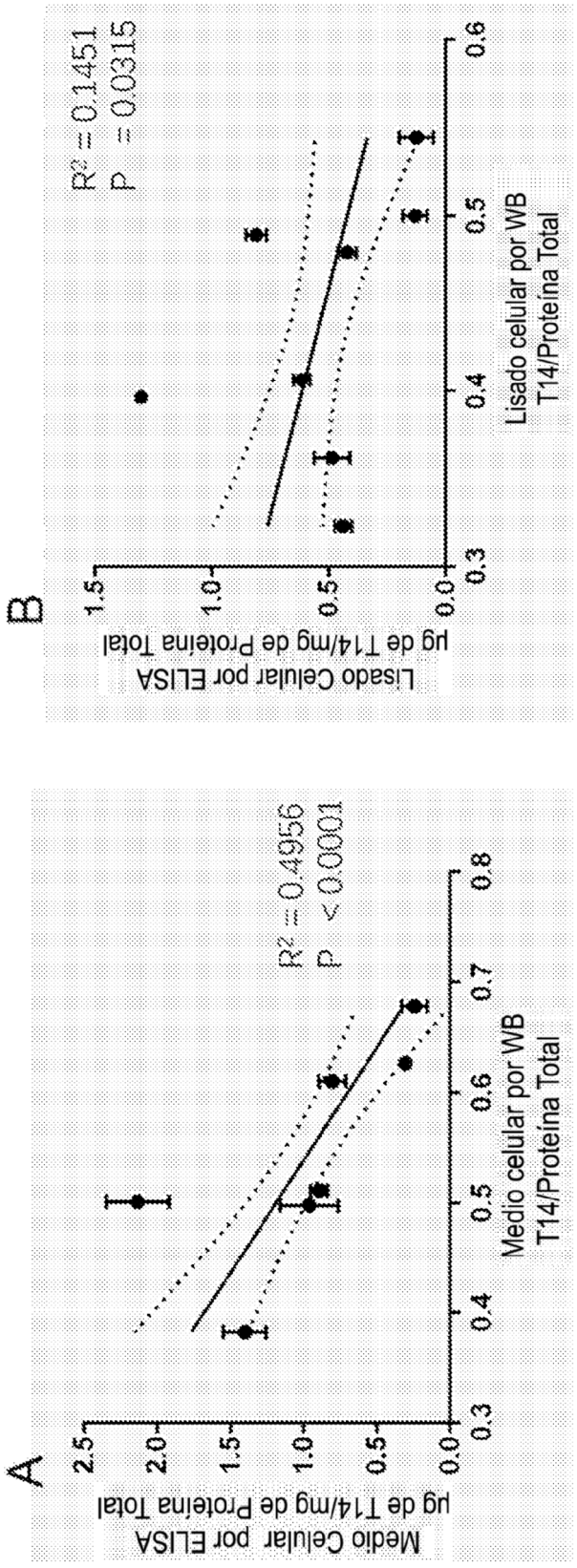

A
Medio Celular por ELISA
µg de T14/mg de Proteína Total
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
Medio celular por WB
T14/Proteína Total
R² = 0.4956
P < 0.0001
B
Lisado Celular por ELISA
µg de T14/mg de Proteína Total
1.5
1.0
0.5
0.0
0.3
0.4
0.5
0.6
Lisado celular por WB
T14/Proteína Total
R² = 0.1451
P = 0.0315

Figura 9

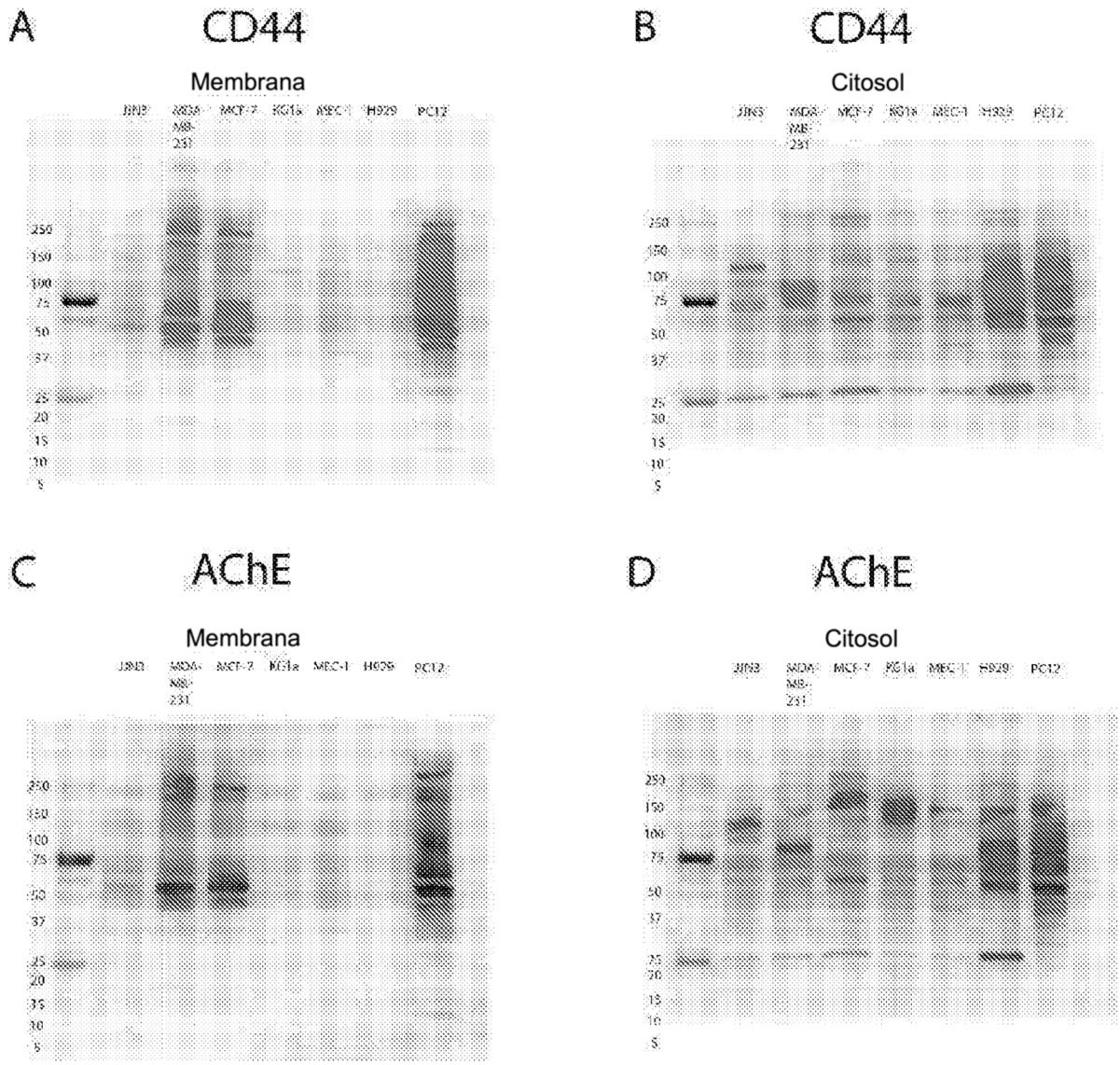

A
CD44
Membrana
B
CD44
Citosol
C
AChE
Membrana
D
AChE
Citosol

Figura 9

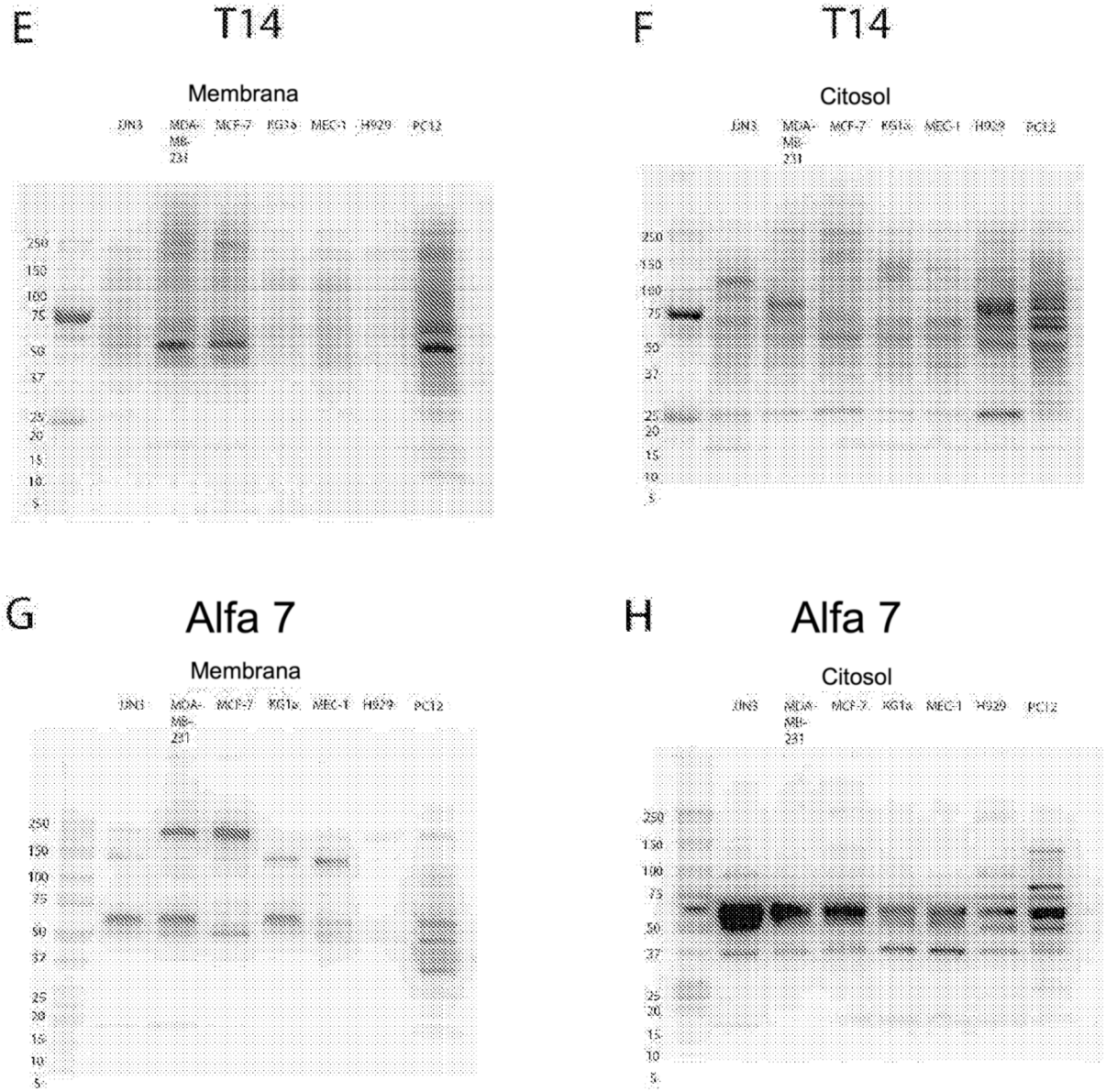

E
T14
Membrana
JJN3
MDA-MB-231
MCF-7
KG1a
MEC-1
H929
PC12
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
5
F
T14
Citosol
G
Alfa 7
Membrana
H
Alfa 7
Citosol

Figura 10

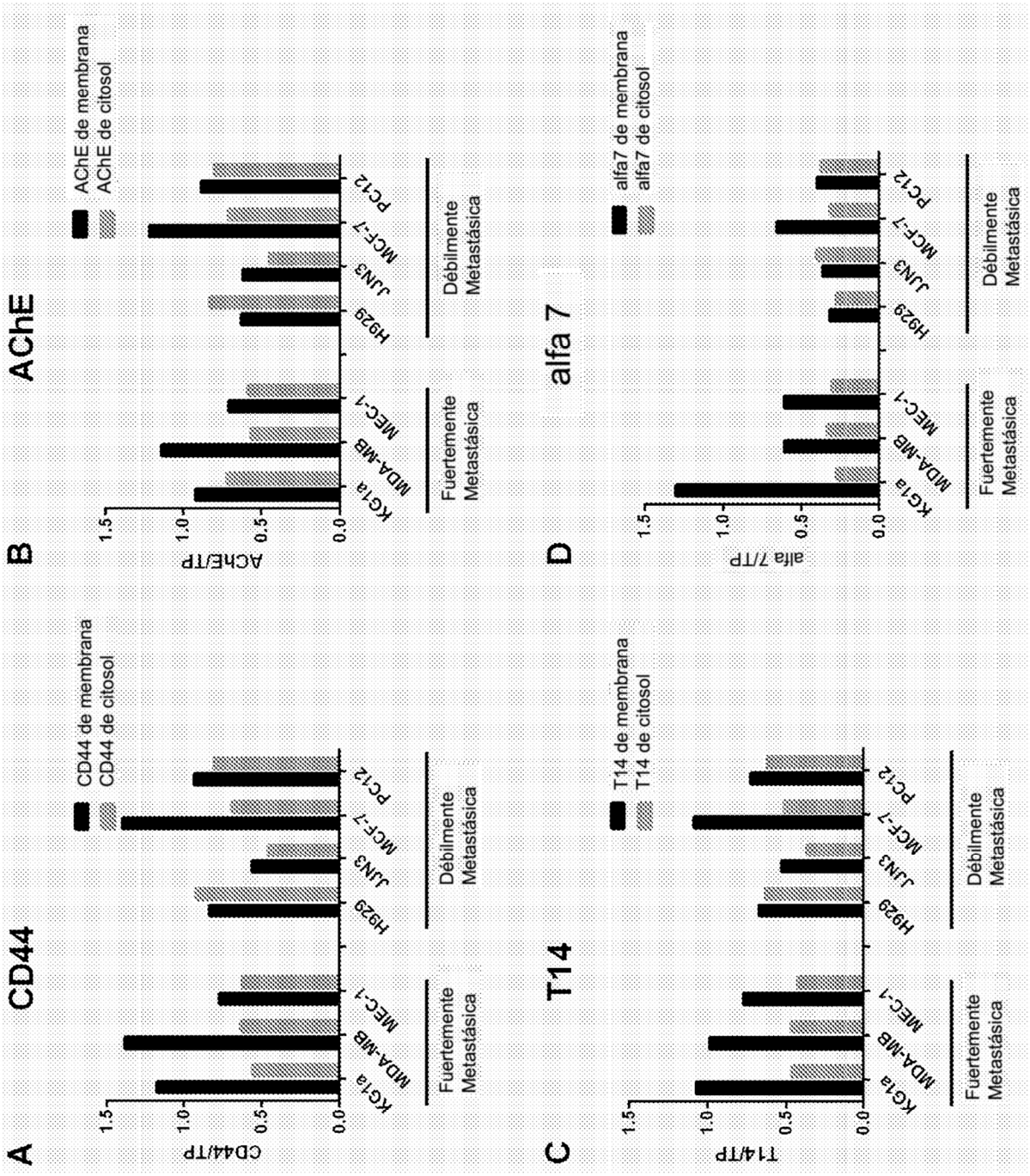

A
CD44
CD44 de membrana
CD44 de citosol
CD44/TP
1.5
1.0
0.5
0.0
KG1a
MDA-MB
MEC-1
H929
JJN3
MCF-7
PC12
Fuertemente Metastásica
Débilmente Metastásica
B
AChE
AChE de membrana
AChE de citosol
AChE/TP
C
T14
T14 de membrana
T14 de citosol
T14/TP
D
alfa 7
alfa7 de membrana
alfa7 de citosol
alfa 7/TP

Figura 11

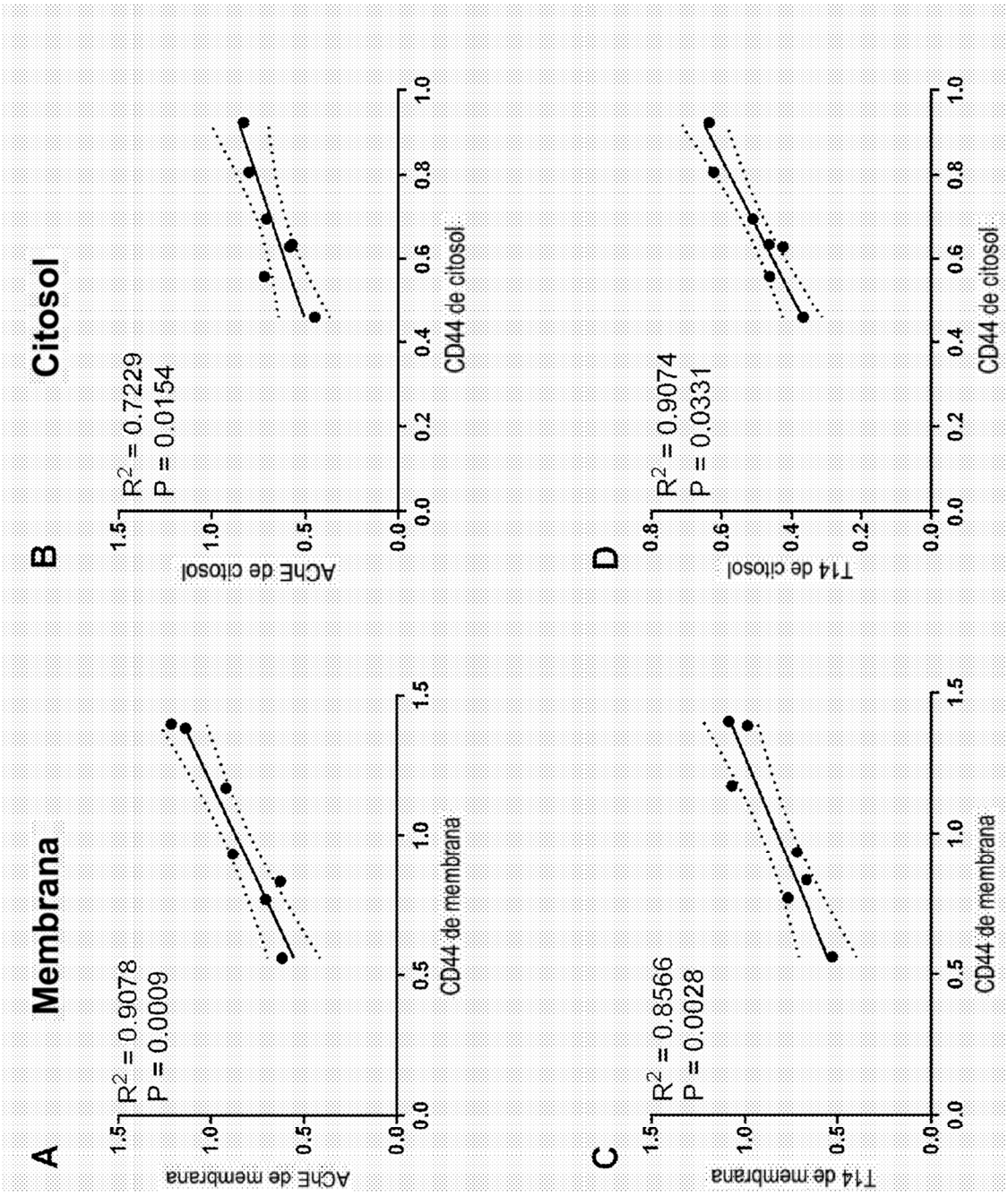

A
Membrana
R2 = 0.9078
P = 0.0009
AChE de membrana
CD44 de membrana
B
Citosol
R2 = 0.7229
P = 0.0154
AChE de citosol
CD44 de citosol
C
R2 = 0.8566
P = 0.0028
T14 de membrana
CD44 de membrana
D
R2 = 0.9074
P = 0.0331
T14 de citosol
CD44 de citosol

Figura 11

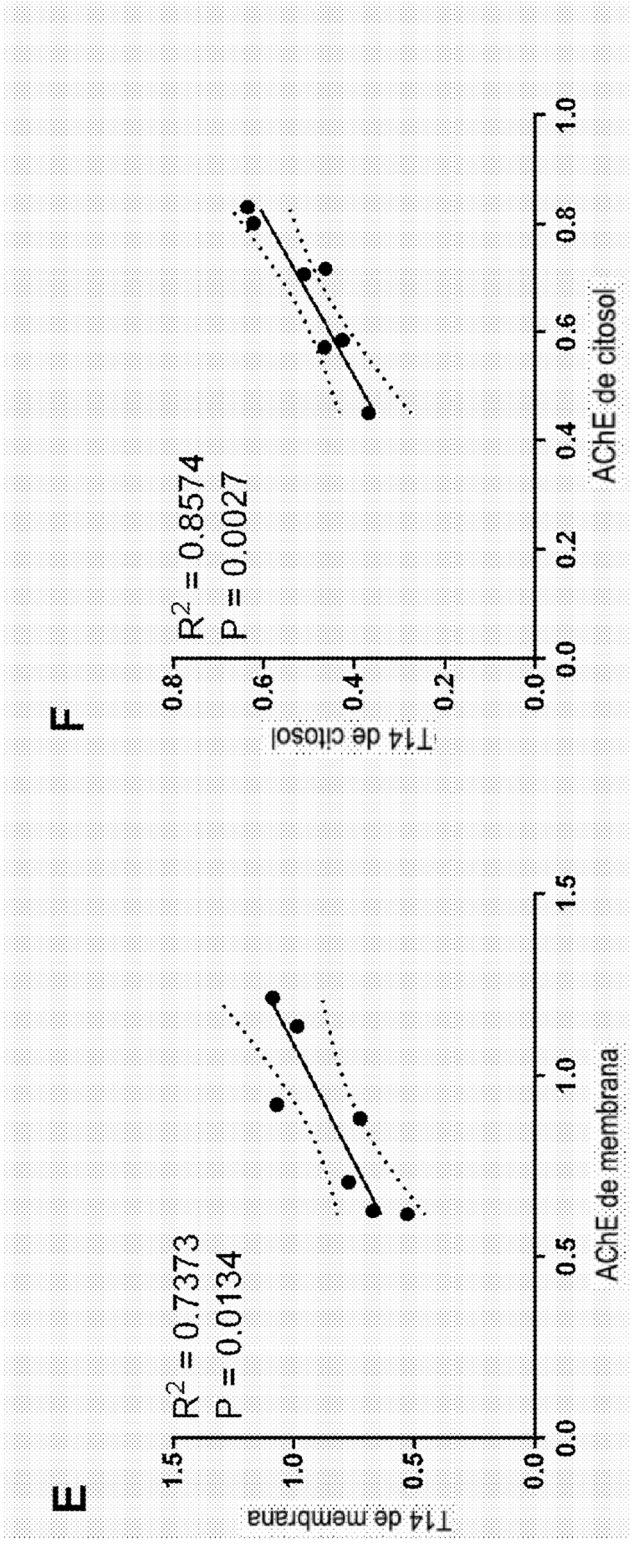

E
T14 de membrana
AChE de membrana
R^2 = 0.7373
P = 0.0134
0.0
0.5
1.0
1.5
F
T14 de citosol
AChE de citosol
R^2 = 0.8574
P = 0.0027
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

Figura 12

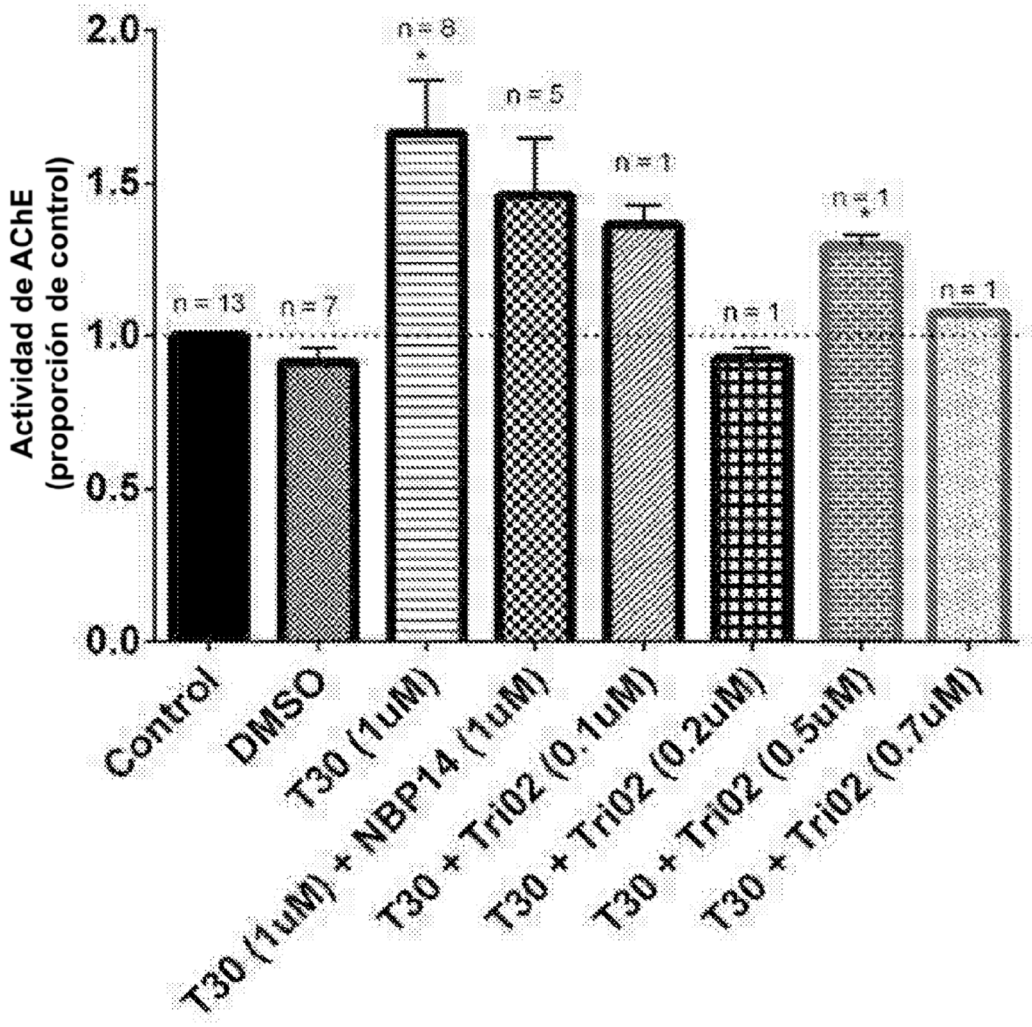

Actividad de AChE
(proporción de control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
n = 13
n = 7
n = 8
*
n = 5
n = 1
n = 1
n = 1
*
n = 1
Control
DMSO
T30 (1uM)
T30 (1uM) + NBP14 (1uM)
T30 + Tri02 (0.1uM)
T30 + Tri02 (0.2uM)
T30 + Tri02 (0.5uM)
T30 + Tri02 (0.7uM)

Figura 13

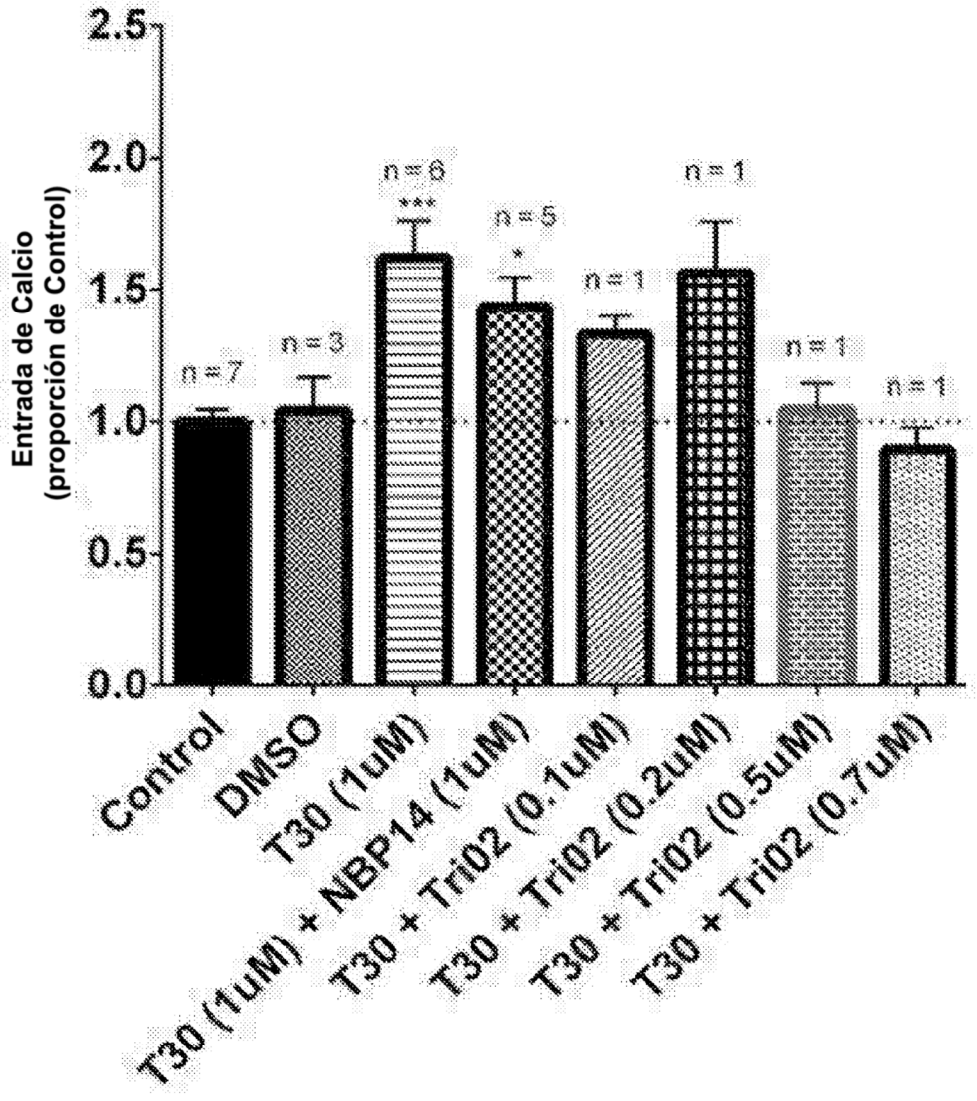
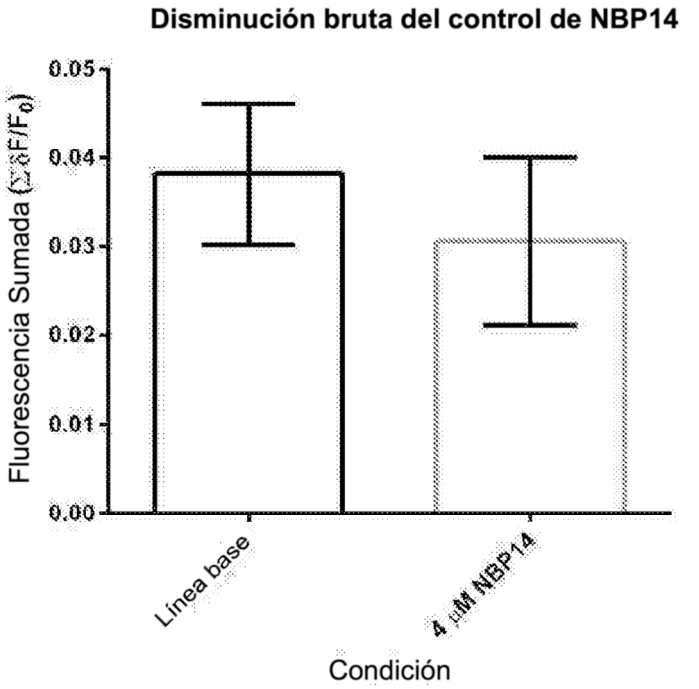

Entrada de Calcio (proporción de Control)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
n = 7
n = 3
n = 6
***
n = 5
*
n = 1
n = 1
n = 1
n = 1
Control
DMSO
T30 (1uM)
T30 (1uM) + NBP14 (1uM)
T30 + Tri02 (0.1uM)
T30 + Tri02 (0.2uM)
T30 + Tri02 (0.5uM)
T30 + Tri02 (0.7uM)

Figura 14


Disminución bruta del control de NBP14
Fluorescencia Sumada (∑ΔF/F0)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Línea base
4 µM NBP14
Condición

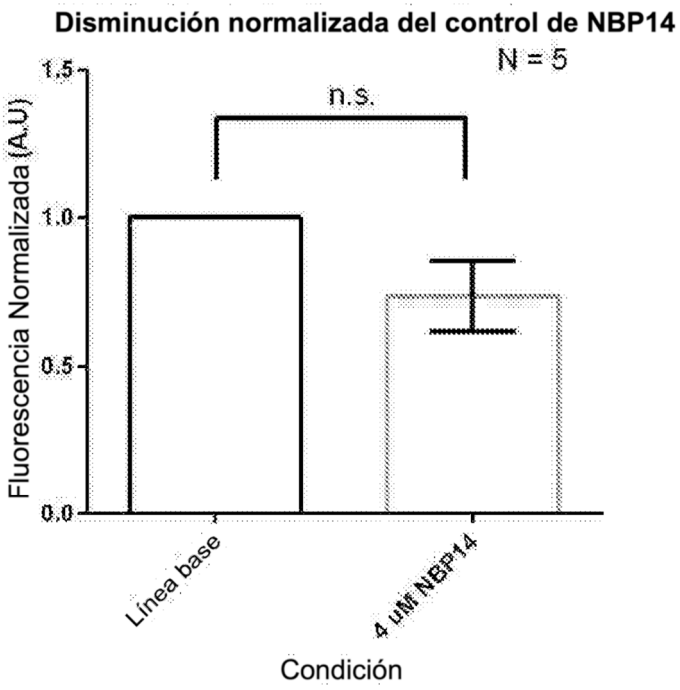
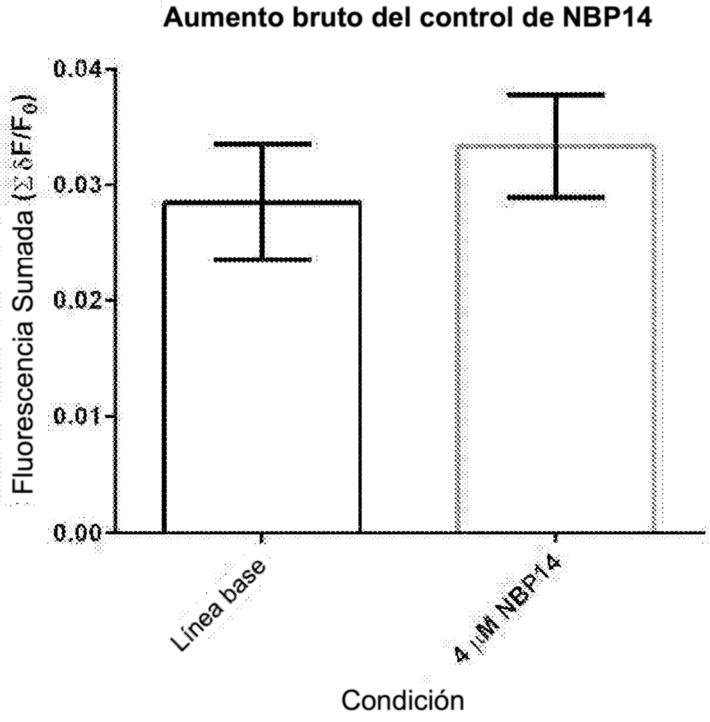

Disminución normalizada del control de NBP14
N = 5
n.s.
Fluorescencia Normalizada (A.U)
1.5
1.0
0.5
0.0
Línea base
4 µM NBP14
Condición

Figura 14 (cont)



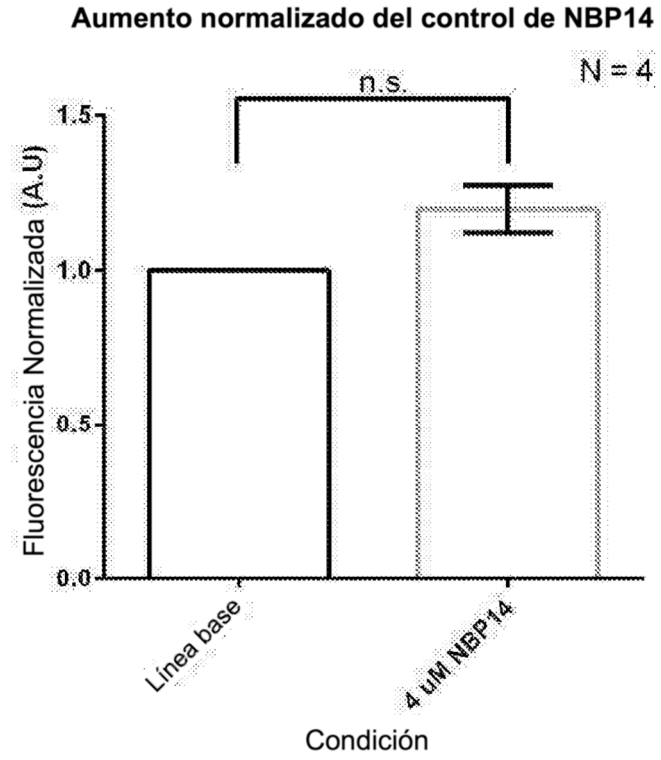
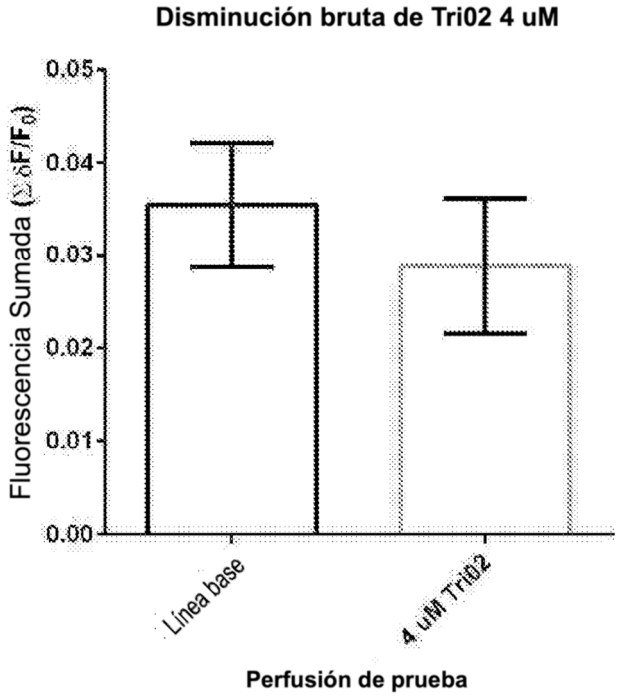


Figura 15


Disminución bruta de Tri02 4 uM
Fluorescencia Sumada (Σ δF/F0)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Línea base
4 uM Tri02
Perfusión de prueba

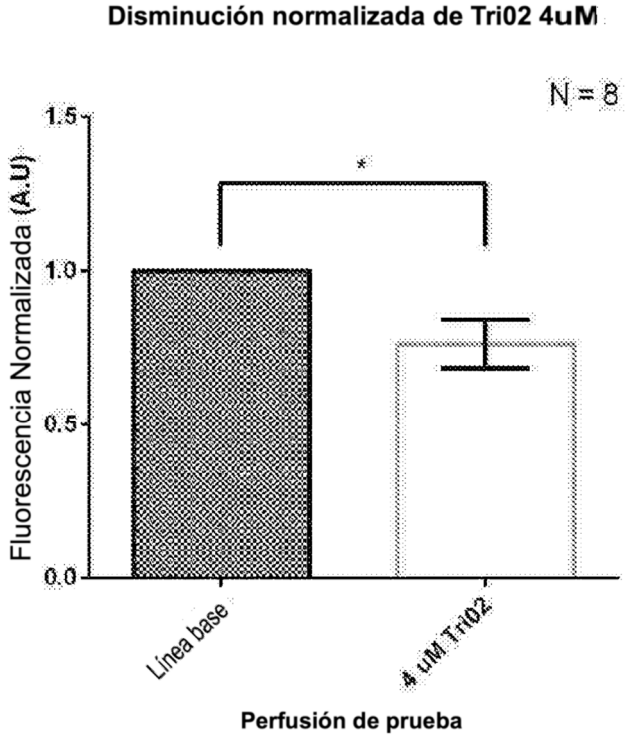
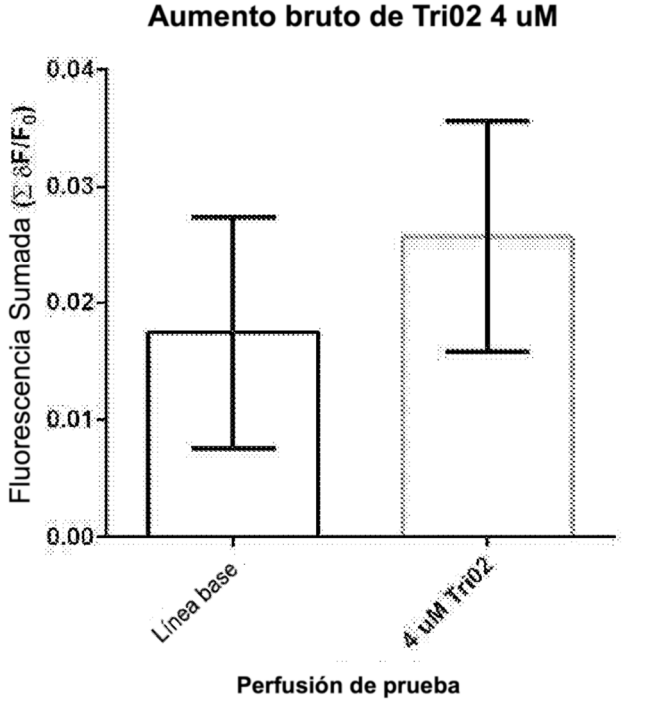

Disminución normalizada de Tri02 4uM
N = 8
*
Fluorescencia Normalizada (A.U)
1.5
1.0
0.5
0.0
Línea base
4 uM Tri02
Perfusión de prueba

Figura 15 (cont)



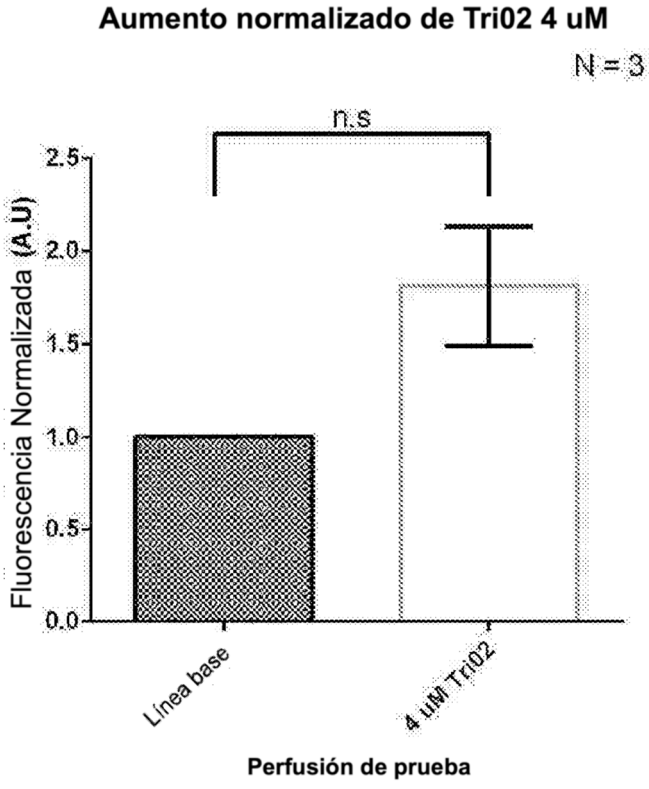


Figura 16

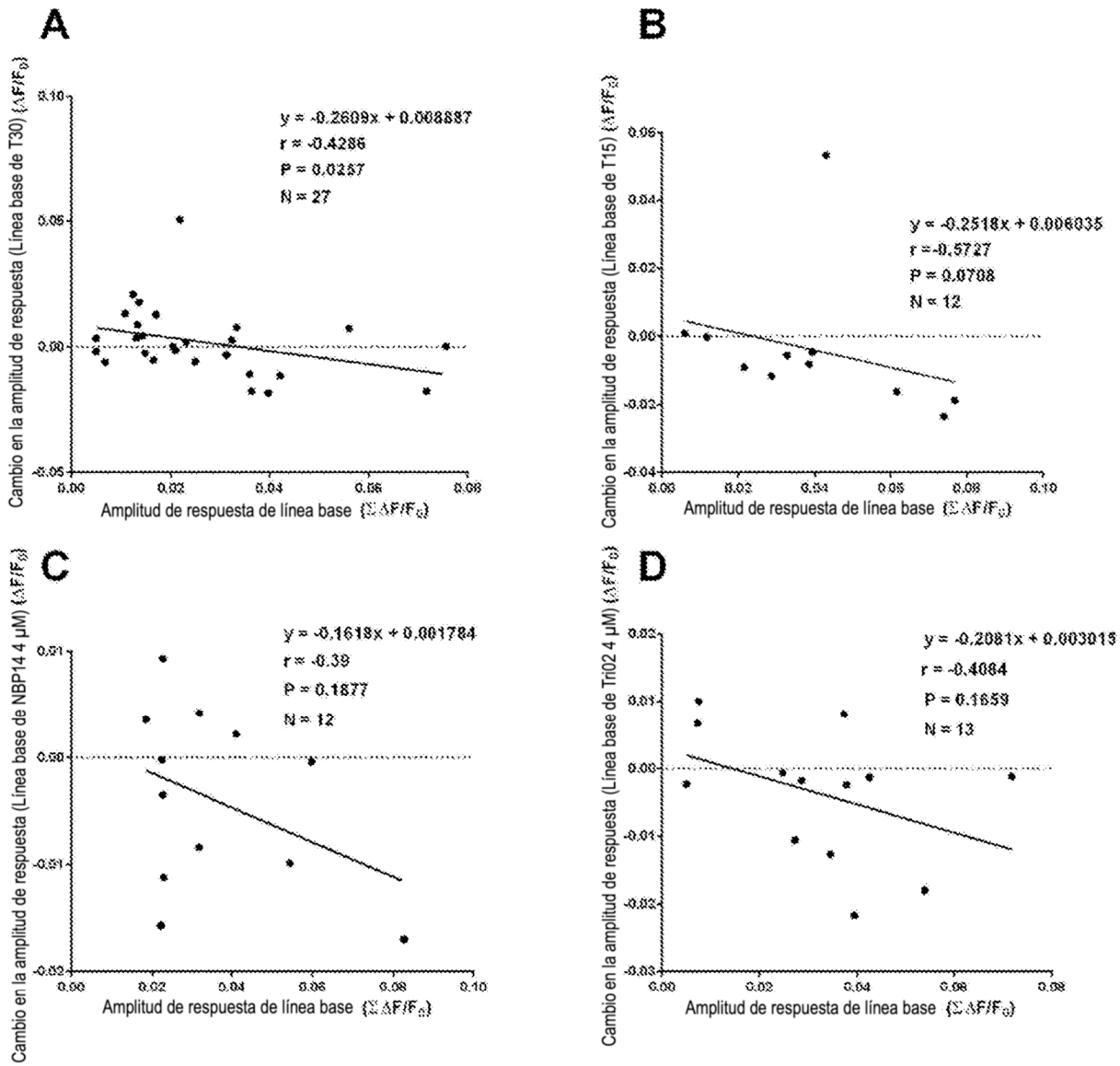
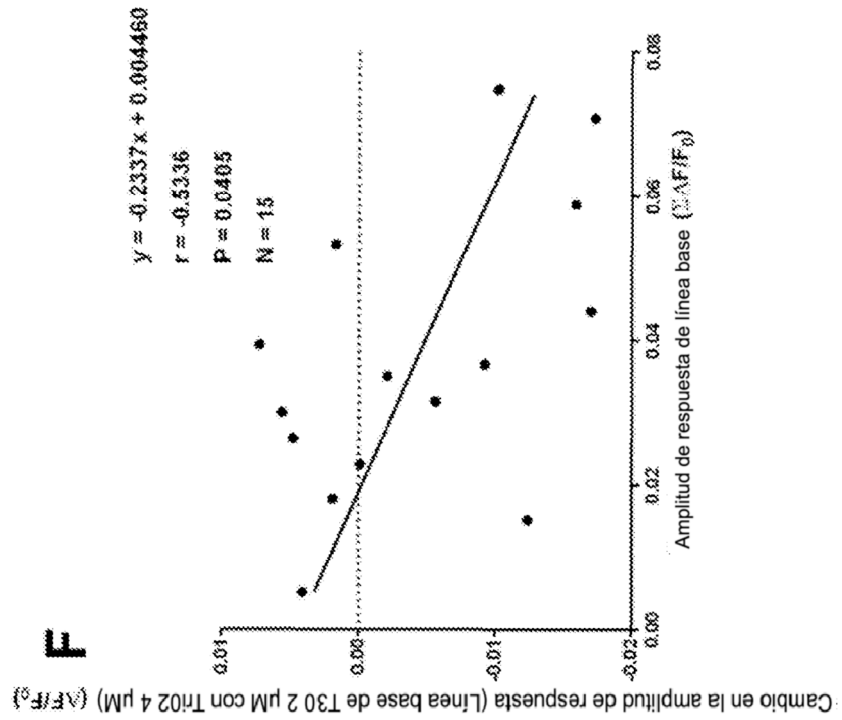

A
y = -0.2609x + 0.008887
r = -0.4286
P = 0.0257
N = 27
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de T30) {ΔF/F0}
Amplitud de respuesta de línea base {ΣΔF/F0}
B
y = -0.2518x + 0.006035
r = -0.5727
P = 0.0708
N = 12
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de T15) {ΔF/F0}
Amplitud de respuesta de línea base {ΣΔF/F0}
C
y = -0.1618x + 0.001784
r = -0.39
P = 0.1877
N = 12
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de NBP14 4 µM) {ΔF/F0}
Amplitud de respuesta de línea base {ΣΔF/F0}
D
y = -0.2081x + 0.003015
r = -0.4084
P = 0.1659
N = 13
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de Tri02 4 µM) {ΔF/F0}
Amplitud de respuesta de línea base {ΣΔF/F0}

Figura 16


F
y = -0.2337x + 0.004460
r = -0.5336
P = 0.0405
N = 15
0.01
0.00
-0.01
-0.02
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
Amplitud de respuesta de línea base (ΣΔF/F0)
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de T30 2 µM con Tri02 4 µM) (ΔF/F0)

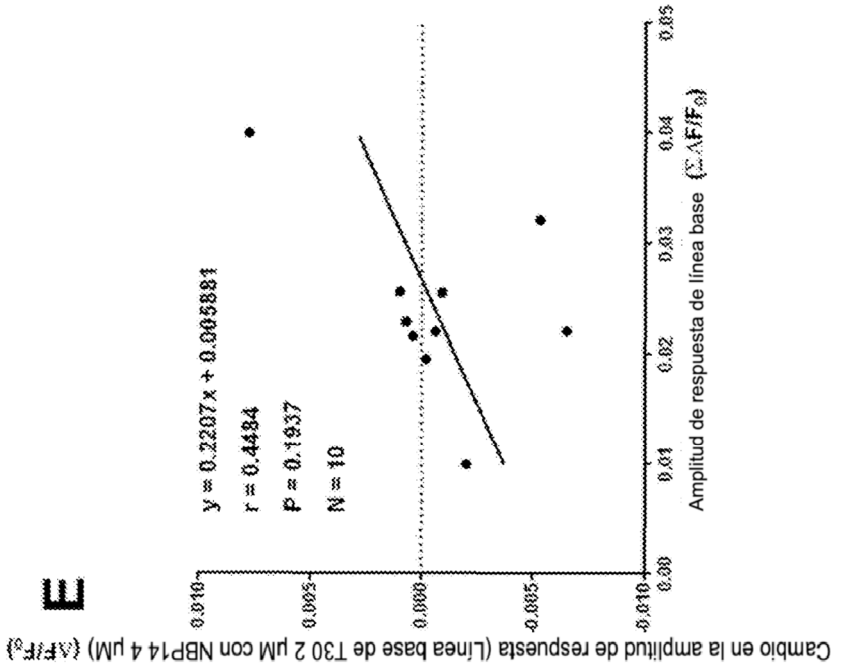

E
y = 0.2207x + 0.005881
r = 0.4484
P = 0.1937
N = 10
0.010
0.005
0.000
-0.005
-0.010
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
Amplitud de respuesta de línea base (ΣΔF/F0)
Cambio en la amplitud de respuesta (Línea base de T30 2 µM con NBP14 4 µM) (ΔF/F0)

Figura 17

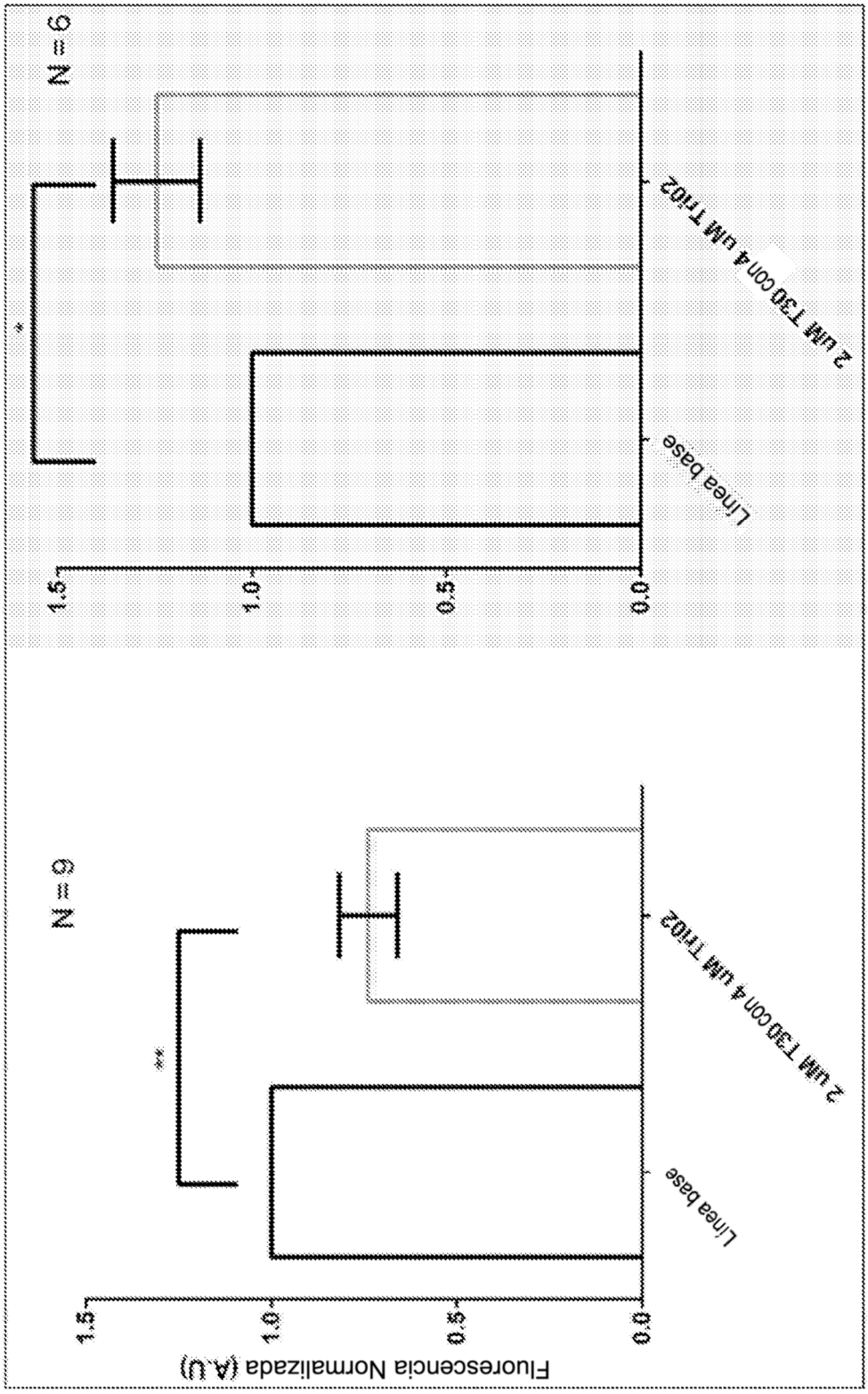

N = 6
*
2 uM T30 con 4 uM Tri02
Línea base
1.5
1.0
0.5
0.0
N = 6
**
2 uM T30 con 4 uM Tri02
Línea base
1.5
1.0
0.5
0.0
Fluorescencia Normalizada (A.U)

Figura 18

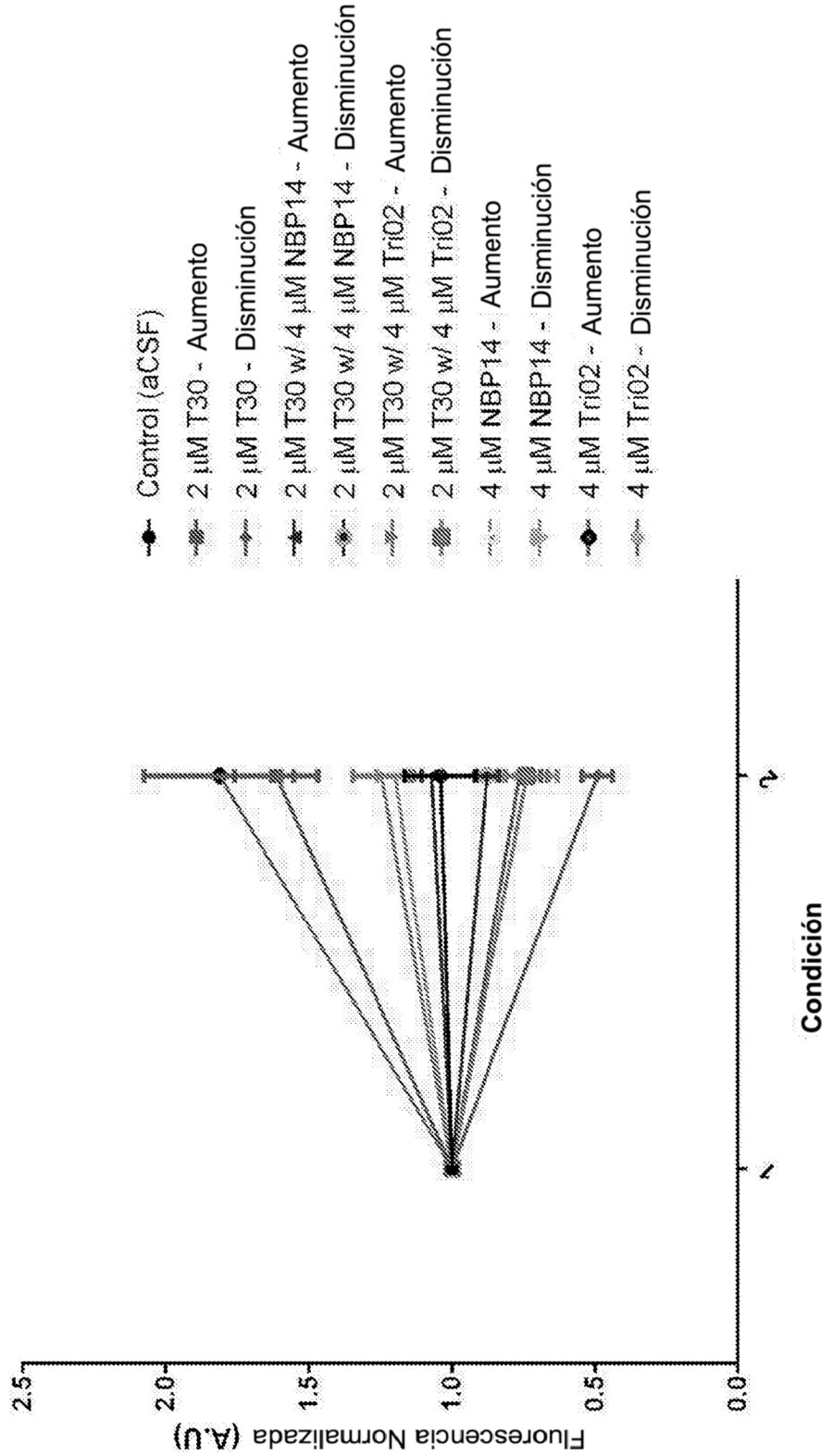

Control (aCSF)
2 µM T30 - Aumento
2 µM T30 - Disminución
2 µM T30 w/ 4 µM NBP14 - Aumento
2 µM T30 w/ 4 µM NBP14 - Disminución
2 µM T30 w/ 4 µM Tri02 - Aumento
2 µM T30 w/ 4 µM Tri02 - Disminución
4 µM NBP14 - Aumento
4 µM NBP14 - Disminución
4 µM Tri02 - Aumento
4 µM Tri02 - Disminución
Fluorescencia Normalizada (A.U)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
Condición

Figura 19

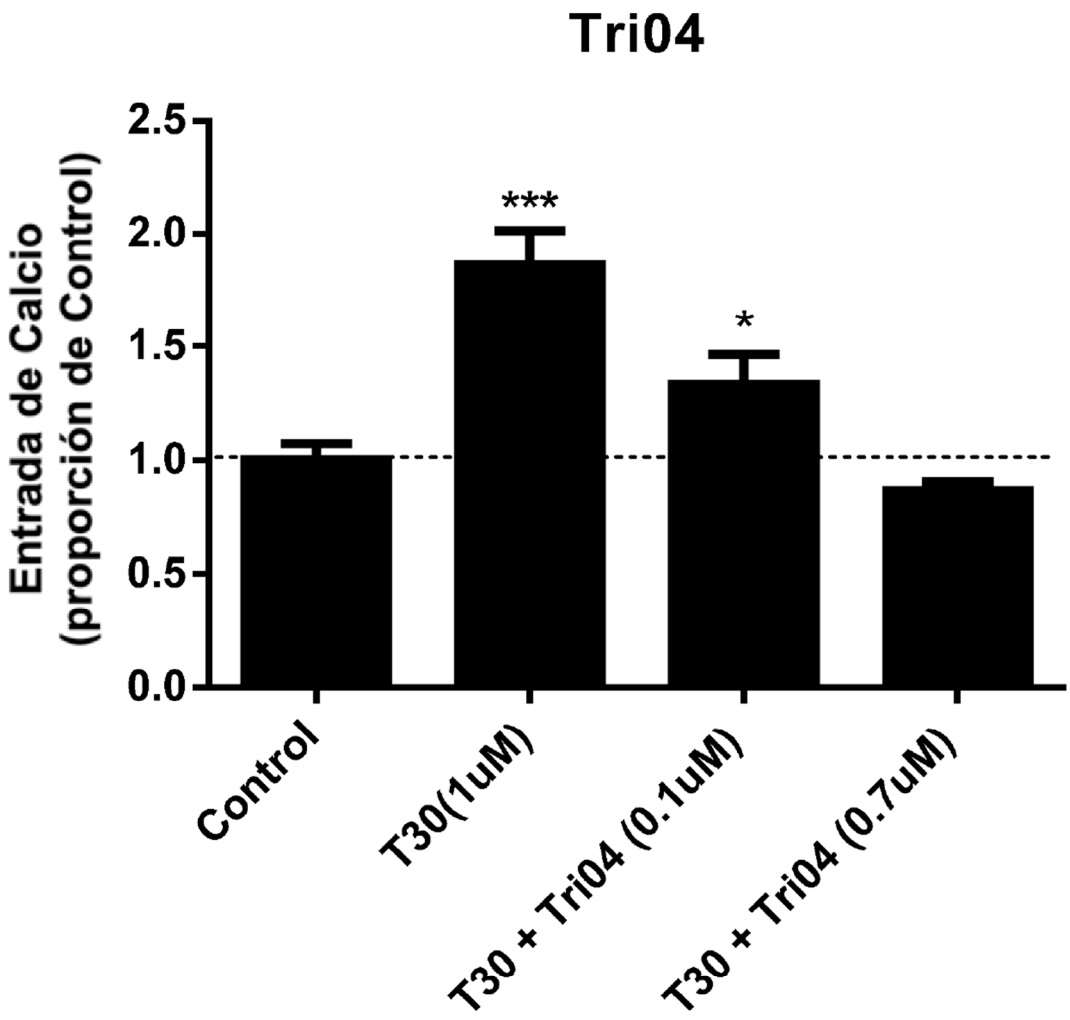

Tri04
Entrada de Calcio
(proporción de Control)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
Control
T30(1uM)
T30 + Tri04 (0.1uM)
T30 + Tri04 (0.7uM)

Figura 20A

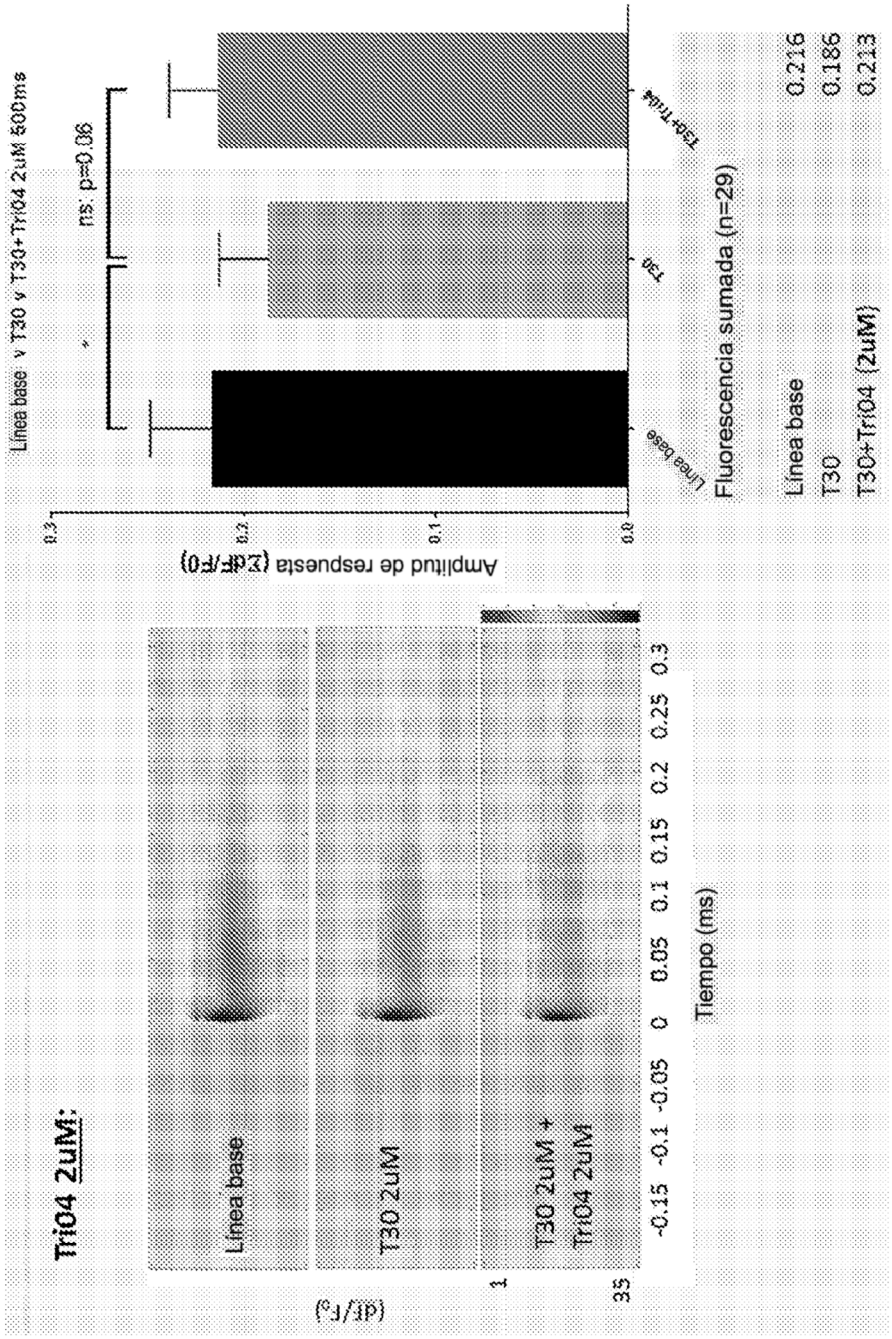


Figura 20B

Figura 21

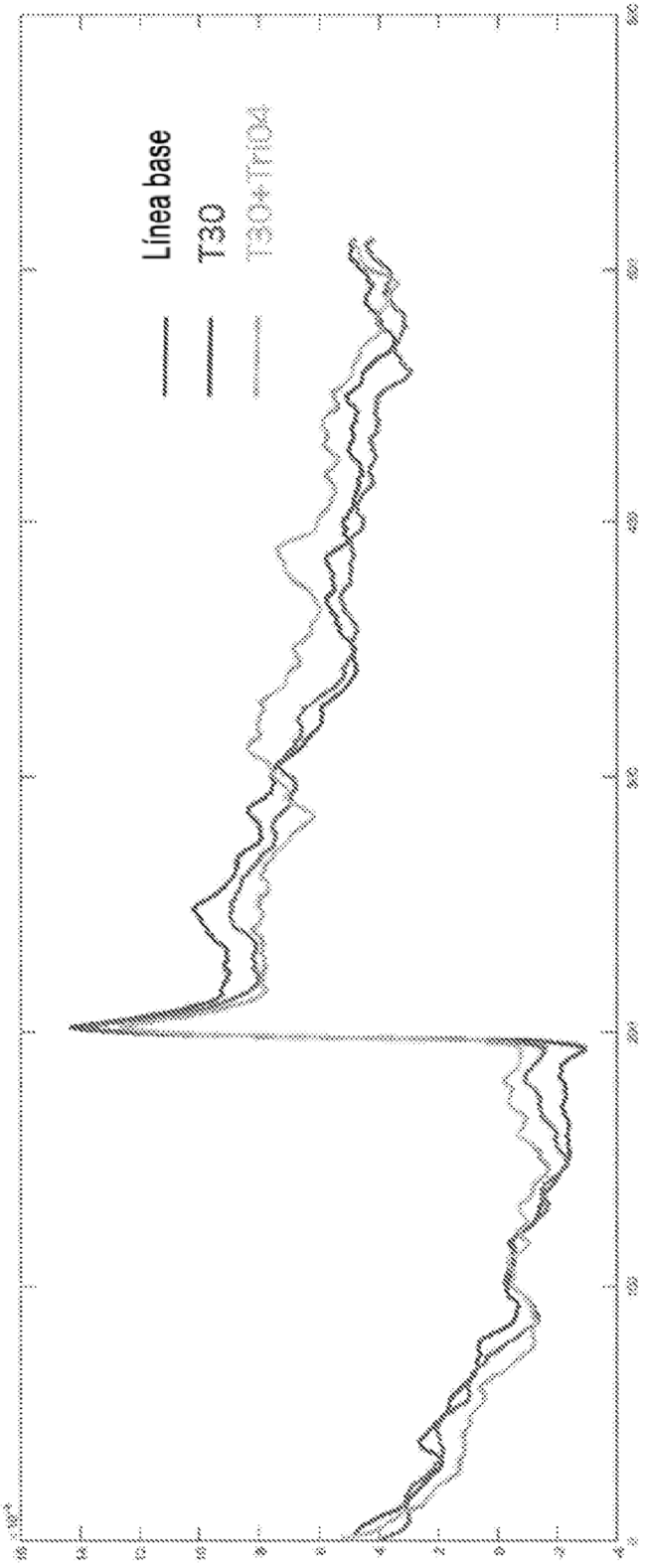
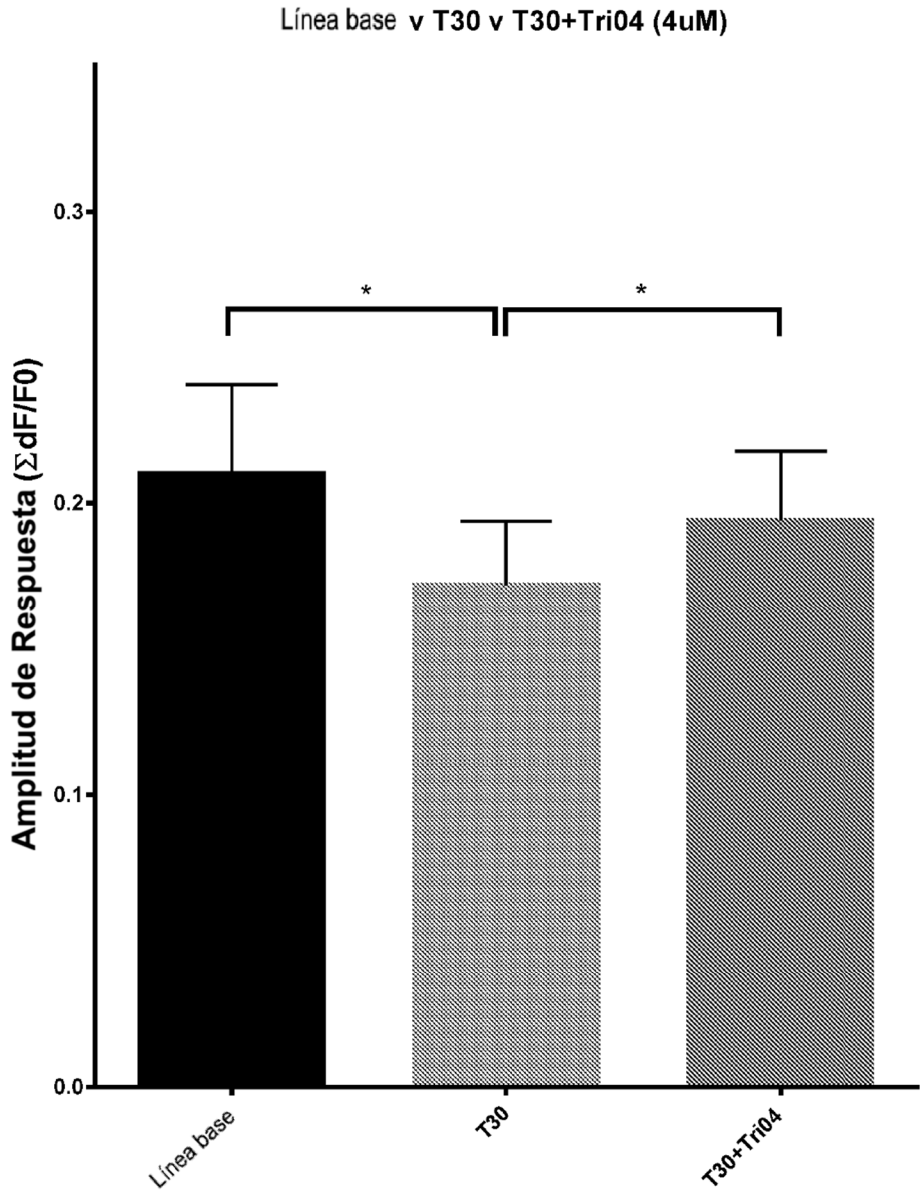


Figura 22



Fluorescencia sumada (n=20)	
Línea base	0.209
T30	0.171
T30+Tri04 (4uM)	0.193

Figura 23

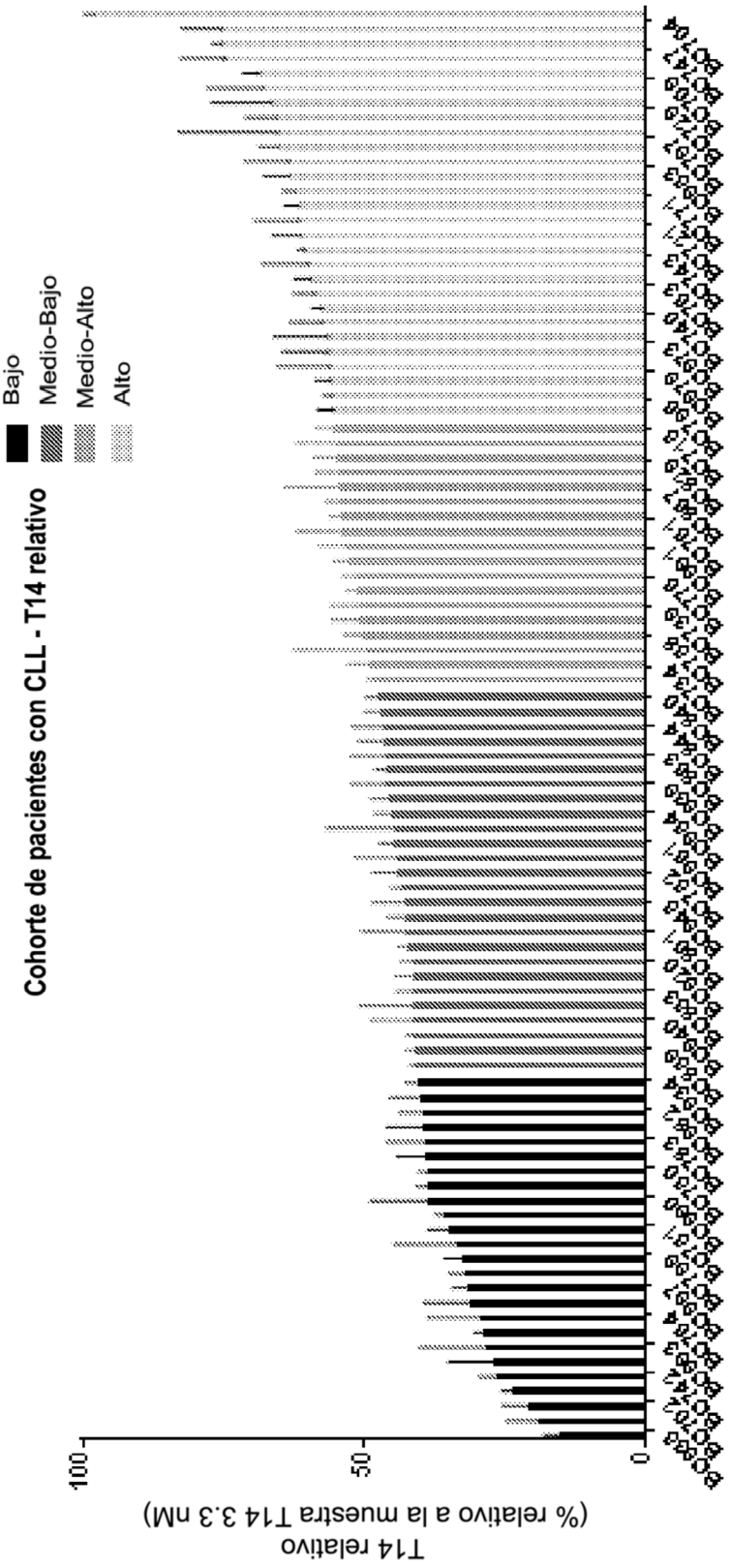

Cohorte de pacientes con CLL - T14 relativo
Bajo
Medio-Bajo
Medio-Alto
Alto
T14 relativo
(% relativo a la muestra T14 3.3 nM)
100
50
0

Figura 24

Media =	47.76995
EST = S =	15.02168
S/2 =	7.510838

Valores Relativos (%)							
Muestra de Suero		Promedio	Desviación Estándar	Número de mediciones repetidas	Media Promedio	Grupo T14	
Neuro-Bio	Chris Pepper						
CPS 21	BO935	14.667	3.173	6	-33.103		
CPS 19	BO903	18.550	6.027	6	-29.220		
CPS 38	BO702	20.215	5.075	6	-27.555		
CPS 86	BO865	23.170	2.285	6	-24.600		
CPS 23	BO742	25.813	3.482	6	-21.957		
CPS 29	BO824	26.237	8.684	6	-21.533		
CPS 89	BO993	27.730	12.495	6	-20.040		
CPS 03	BO837	28.062	2.351	6	-19.707		
CPS 08	BO764	28.637	9.814	6	-19.133		
CPS 62	BO875	30.594	8.730	6	-17.176		
CPS 37	BO997	31.008	3.257	6	-16.762		
CPS 33	BO707	31.391	3.278	6	-16.379		
CPS 100	BO799	32.017	3.723	6	-15.753	BAJO	
CPS 58	BO866	33.066	11.533	6	-14.704		
CPS 79	BO751	34.599	3.878	6	-13.171		
CPS 96	BO724	35.355	1.877	6	-12.414		
CPS 01	BO990	37.887	10.976	6	-9.883		
CPS 70	BO711	37.958	2.685	6	-9.812		
CPS 06	BO750	38.180	2.189	6	-9.590		
CPS 05	BO864	38.714	5.437	6	-9.055		
CPS 73	BO783	38.815	7.109	6	-8.955		
CPS 50	BO929	38.886	7.025	6	-8.884		
CPS 51	BO982	39.199	4.527	6	-8.571		
CPS 46	BO992	39.310	6.169	6	-8.460		
CPS 74	BO934	40.167	2.486	6	-7.603		-1/2*S
CPS 31	BO772	40.359	1.347	6	-7.411	MEDIO-BAJO	
CPS 15	BO859	40.480	1.958	6	-7.290		
CPS 90	BO831	40.772	1.698	6	-6.998		
CPS 09	BO940	40.782	8.022	6	-6.988		
CPS 59	BO714	40.924	9.717	6	-6.846		

CPS 52	BO853	40.984	3.262	6	-6.786		
CPS 67	BO966	41.105	3.371	6	-6.665		
CPS 54	BO920	41.156	2.391	6	-6.614		
CPS 95	BO948	42.033	1.809	6	-5.737		
CPS 56	BO801	42.225	8.136	6	-5.545		
CPS 34	BO839	42.346	3.406	6	-5.424		
CPS 91	BO945	42.386	6.098	6	-5.384		
CPS 55	BO732	42.951	2.325	6	-4.819		
CPS 65	BO752	43.657	4.838	6	-4.113		
CPS 68	BO926	43.718	7.851	6	-4.052		
CPS 11	BO961	44.252	2.974	6	-3.518		
CPS 98	BO769	44.262	12.278	6	-3.508		
CPS 92	BO954	44.545	3.485	6	-3.225		
CPS 84	BO880	45.291	3.549	6	-2.479		
CPS 63	BO939	45.574	6.914	6	-2.196		
CPS 71	BO775	45.604	2.293	6	-2.166		
CPS 69	BO863	45.735	6.720	6	-2.035		
CPS 47	BO745	45.907	4.961	6	-1.863		
CPS 60	BO844	45.907	6.143	6	-1.863		
CPS 64	BO986	46.381	3.536	6	-1.389		
CPS 72	BO840	46.835	2.963	6	-0.935		Media
CPS 25	BO825	48.005	1.486	6	0.235		
CPS 61	BO734	48.287	4.727	6	0.517		
CPS 88	BO757	48.913	13.751	6	1.143		
CPS 43	BO758	50.042	3.485	6	2.272		
CPS 97	BO962	50.224	5.593	6	2.454		
CPS 10	BO739	50.436	5.457	6	2.666		
CPS 85	BO976	50.617	2.498	6	2.847		
CPS 13	BO776	50.769	2.990	6	2.999		
CPS 42	BO944	52.019	3.275	6	4.249	MEDIO-ALTO	
CPS 57	BO991	52.675	5.210	6	4.905		
CPS 07	BO950	53.422	8.776	6	5.652		
CPS 02	BO761	53.724	2.204	6	5.954		
CPS 40	BO868	53.875	2.789	6	6.106		
CPS 99	BO867	53.997	10.182	6	6.227		
CPS 44	BO737	54.168	4.421	6	6.398		
CPS 93	BO829	54.531	4.390	6	6.761		
CPS 12	BO904	54.672	7.481	6	6.902		
CPS 80	BO715	55.207	3.507	6	7.437		+1/2*S
CPS 66	BO971	55.318	2.840	6	7.548	ALTO	
CPS 14	BO796	55.439	1.741	6	7.669		
CPS 26	BO756	55.752	2.871	6	7.982		
CPS 78	BO979	55.873	9.611	6	8.103		

CPS 30	BO716	56.296	8.265	6	8.526
CPS 48	BO973	56.387	9.690	6	8.617
CPS 76	BO738	57.174	6.071	6	9.404
CPS 35	BO740	57.265	2.005	6	9.495
CPS 20	BO792	58.556	4.094	6	10.786
CPS 53	BO763	59.343	3.076	6	11.573
CPS 82	BO790	59.716	8.480	6	11.946
CPS 24	BO743	60.503	1.482	6	12.733
CPS 87	BO765	61.098	5.339	6	13.328
CPS 18	BO721	61.491	8.139	6	13.721
CPS 77	BO780	61.612	2.694	6	13.842
CPS 04	BO771	62.238	2.342	6	14.468
CPS 22	BO712	63.176	4.773	6	15.406
CPS 16	BO953	63.287	7.890	6	15.517
CPS 45	BO967	65.092	3.600	6	17.322
CPS 49	BO797	65.123	17.909	6	17.353
CPS 81	BO810	65.435	5.612	6	17.665
CPS 28	BO729	66.414	10.677	6	18.644
CPS 39	BO722	67.715	10.186	6	19.945
CPS 36	BO709	68.462	3.173	6	20.692
CPS 75	BO988	74.524	8.145	6	26.754
CPS 94	BO747	75.220	1.838	6	27.450
CPS 27	BO731	75.240	7.081	6	27.470
CPS 17	BO704	97.956	10.974	6	50.186

Figura 25

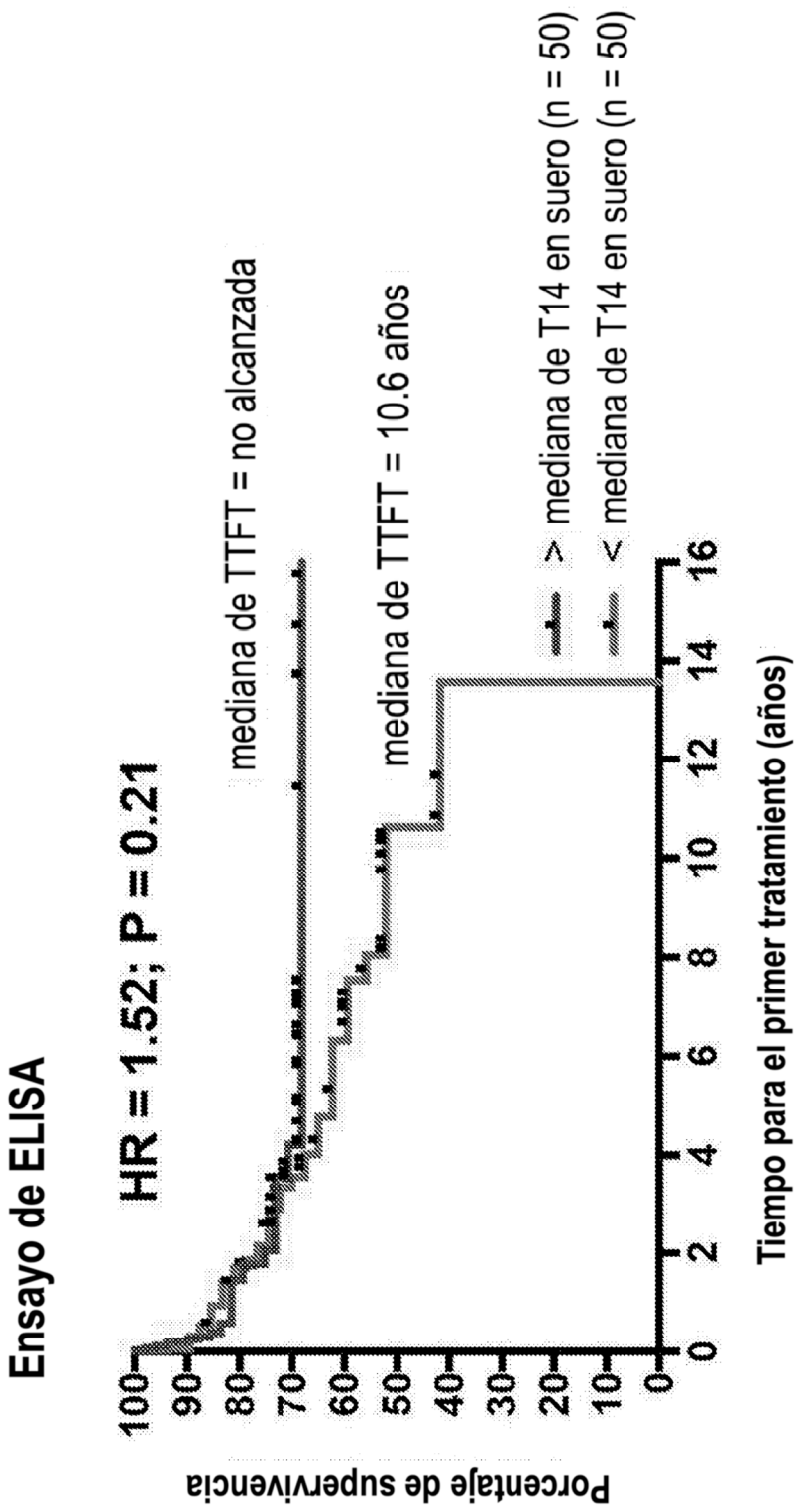

Ensayo de ELISA
HR = 1.52; P = 0.21
mediana de TTFT = no alcanzada
mediana de TTFT = 10.6 años
> mediana de T14 en suero (n = 50)
< mediana de T14 en suero (n = 50)
Porcentaje de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tiempo para el primer tratamiento (años)

Figura 26

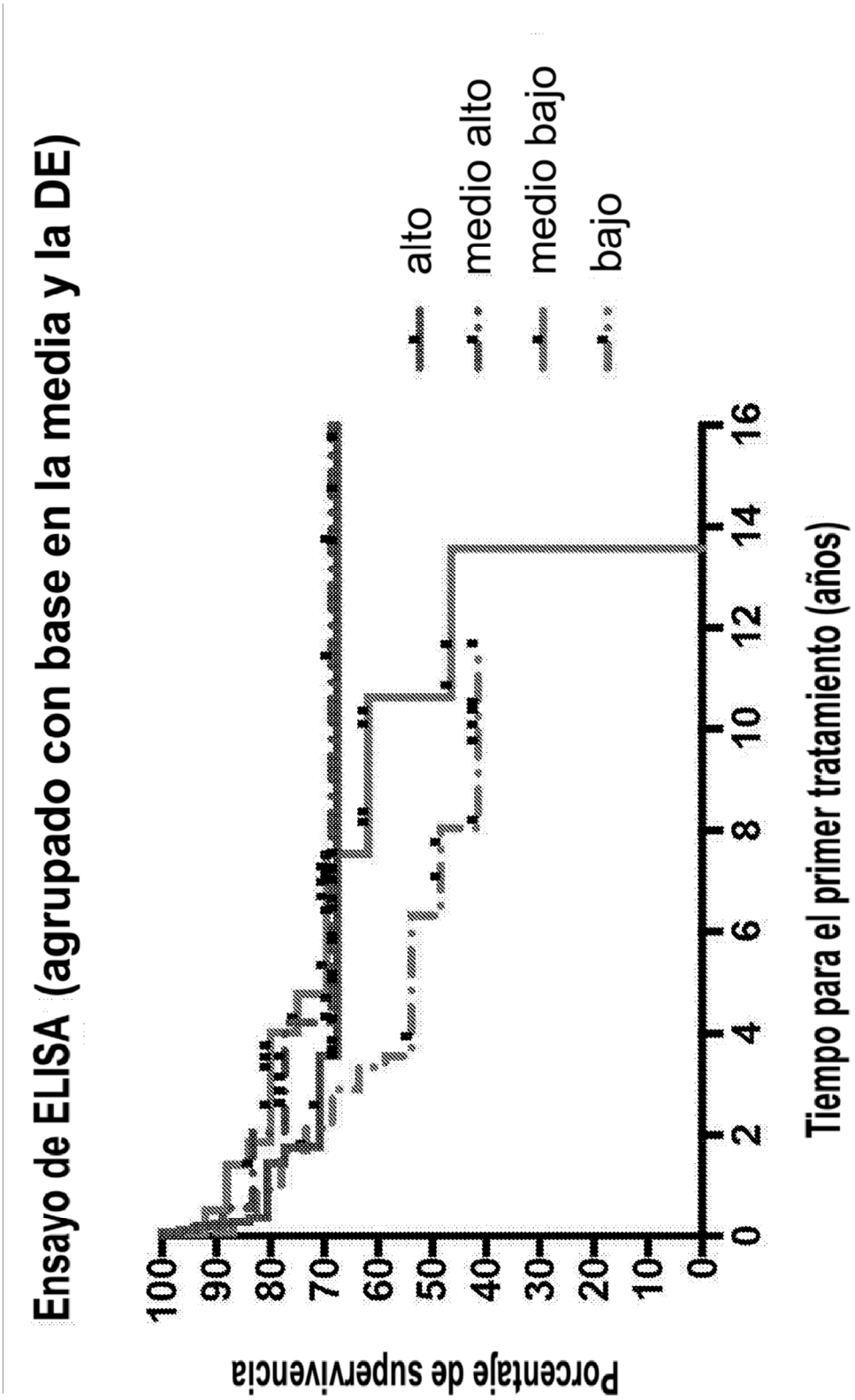

Ensayo de ELISA (agrupado con base en la media y la DE)
alto
medio alto
medio bajo
bajo
Porcentaje de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tiempo para el primer tratamiento (años)

Figura 27

Tabla 1. Valores brutos de T14 de 50 KDa/TP de 100 muestras de suero de pacientes con leucemia detectados por WB, grupos separados por debajo y por encima de la mediana

Grupo gris claro < Mediana			Grupo gris oscuro > Mediana		
Referencia de NB	Referencia de tubo	T14 50 kDa/TP	Referencia de NB	Referencia de tubo	T14 50 kDa/TP
CPS01	**BO990**	0.161699061	CPS40	**BO868**	0.875507073
CPS89	**BO993**	0.174602077	CPS10	**BO739**	0.905317237
CPS21	**BO935**	0.188430854	CPS13	**BO776**	0.912010868
CPS51	**BO982**	0.218839404	CPS45	**BO967**	0.912777387
CPS95	**BO948**	0.236814882	CPS23	**BO742**	0.950061693
CPS06	**BO750**	0.25045659	CPS76	**BO738**	0.960638794
CPS14	**BO796**	0.256609897	CPS65	**BO752**	0.980894332
CPS38	**BO702**	0.256710327	CPS19	**BO903**	0.99791595
CPS64	**BO986**	0.269818722	CPS93	**BO829**	1.01021687
CPS12	**BO904**	0.286831782	CPS59	**BO714**	1.017028699
CPS09	**BO940**	0.350899354	CPS42	**BO944**	1.034984758
CPS37	**BO997**	0.384202865	CPS20	**BO792**	1.043190175
CPS86	**BO865**	0.411267653	CPS44	**BO737**	1.072372342
CPS100	**BO799**	0.415646302	CPS28	**BO729**	1.129882247
CPS33	**BO707**	0.426683394	CPS43	**BO758**	1.144859688
CPS73	**BO783**	0.427410005	CPS85	**BO976**	1.171341584
CPS91	**BO945**	0.438600343	CPS27	**BO731**	1.195429419
CPS61	**BO734**	0.449024365	CPS75	**BO988**	1.220902806
CPS17	**BO704**	0.463262396	CPS56	**BO801**	1.222480974
CPS46	**BO992**	0.472848022	CPS70	**BO711**	1.305662632
CPS79	**BO751**	0.500011094	CPS58	**BO866**	1.32401572
CPS11	**BO961**	0.508362847	CPS16	**BO953**	1.35616638
CPS53	**BO763**	0.511087397	CPS57	**BO991**	1.38509208
CPS78	**BO979**	0.518055834	CPS90	**BO831**	1.40943126
CPS81	**BO810**	0.539183244	CPS32	**BO978**	1.431265646
CPS62	**BO875**	0.541310938	CPS35	**BO740**	1.436627543
CPS96	**BO724**	0.551257463	CPS83	**BO720**	1.465130533
CPS47	**BO745**	0.564976291	CPS74	**BO934**	1.532815843
CPS25	**BO825**	0.575754249	CPS97	**BO962**	1.577371822
CPS41	**BO766**	0.591162636	CPS05	**BO864**	1.663410075
CPS04	**BO771**	0.599006303	CPS88	**BO757**	1.702962816
CPS80	**BO715**	0.600399502	CPS67	**BO966**	1.731763336

CPS29	**BO824**	0.602249975	CPS18	**BO721**	1.764296136
CPS36	**BO709**	0.624766582	CPS87	**BO765**	1.777437922
CPS60	**BO844**	0.626769354	CPS98	**BO769**	1.875072249
CPS48	**BO973**	0.632283636	CPS92	**BO954**	1.93980376
CPS49	**BO797**	0.635924863	CPS99	**BO867**	2.121789963
CPS66	**BO971**	0.65391734	CPS84	**BO880**	2.160466939
CPS15	**BO859**	0.660255508	CPS02	**BO761**	2.177740673
CPS30	**BO716**	0.660973725	CPS08	**BO764**	2.225280123
CPS50	**BO929**	0.67432876	CPS34	**BO839**	2.267113767
CPS31	**BO772**	0.682906184	CPS03	**BO837**	2.347675716
CPS55	**BO732**	0.700204877	CPS82	**BO790**	2.372391337
CPS52	**BO853**	0.701115977	CPS94	**BO747**	2.438942282
CPS72	**BO840**	0.736716148	CPS63	**BO939**	2.543884304
CPS26	**BO756**	0.758025464	CPS24	**BO743**	2.618966695
CPS68	**BO926**	0.758307578	CPS22	**BO712**	2.660249606
CPS39	**BO722**	0.771825496	CPS69	**BO863**	2.801469228
CPS71	**BO775**	0.80108958	CPS54	**BO920**	2.934273694
CPS77	**BO780**	0.814959243	CPS07	**BO950**	3.685907851

Figura 28

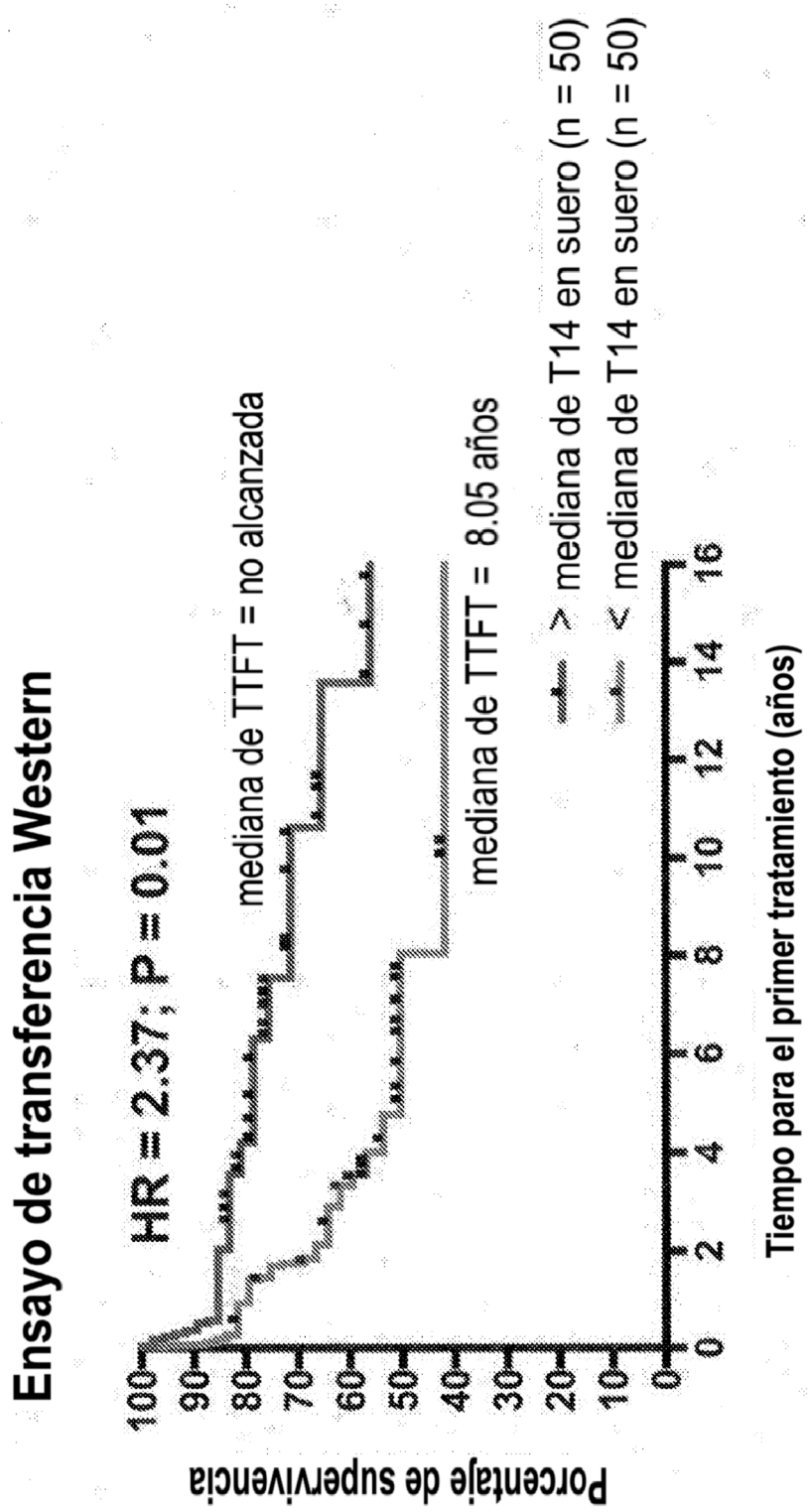
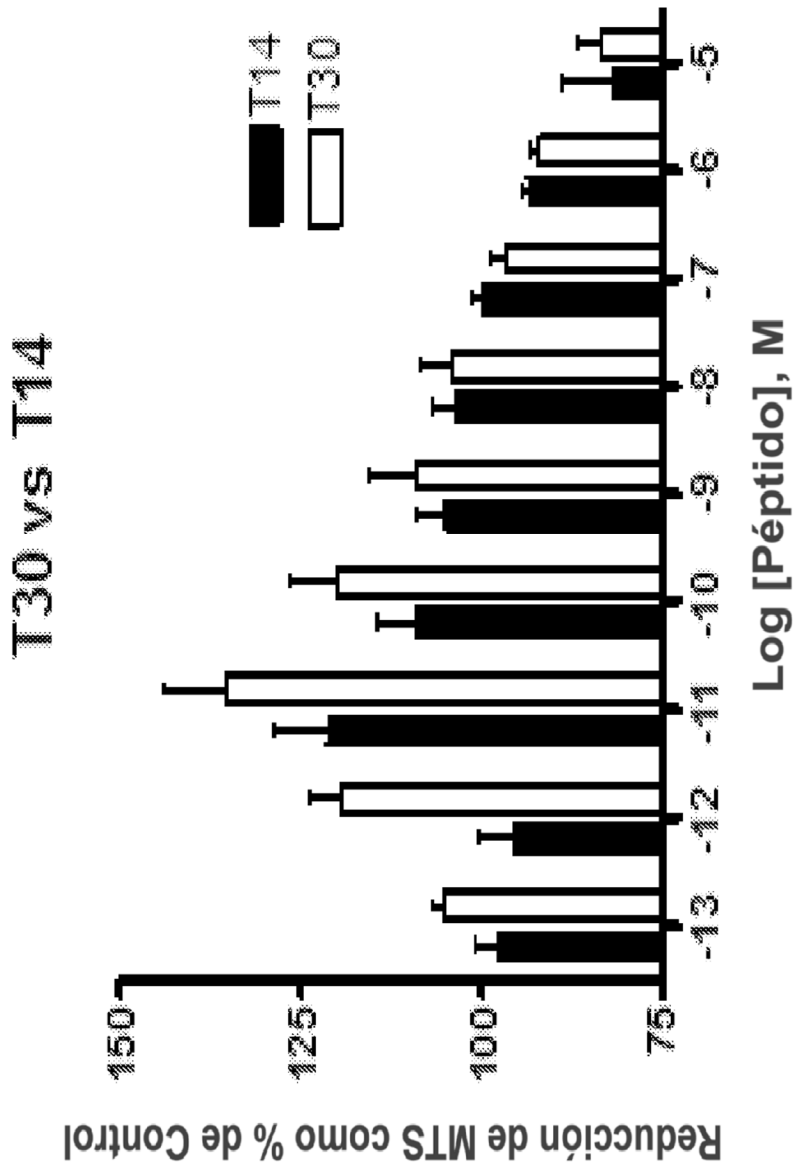

Ensayo de transferencia Western
HR = 2.37; P = 0.01
mediana de TTFT = no alcanzada
mediana de TTFT = 8.05 años
> mediana de T14 en suero (n = 50)
< mediana de T14 en suero (n = 50)
Porcentaje de supervivencia
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Tiempo para el primer tratamiento (años)

Figura 29


T30 vs T14
T14
T30
Reducción de MTS como % de Control
150
125
100
75
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Log [Péptido], M