

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 917 605**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2019 PCT/EP2019/051889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19145496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2019 E 19701524 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2022 EP 3746789**

54 Título: **Método de cribado para la identificación de productos terapéuticos contra el cáncer**

30 Prioridad:

29.01.2018 EP 18153933

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

11.07.2022

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**ROSENSTIEL-GOIDS, VIOLAINE;
BETHKE, FREDERIC;
BALSS, JÖRG y
PHILLIPS, EMMA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 917 605 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de cribado para la identificación de productos terapéuticos contra el cáncer

La presente invención se refiere a un método para identificar compuestos anticancerígenos. La invención se basa en el hallazgo de que una interacción directa proteína-proteína entre la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 4 (PFKFB₄) y la proteína F-box 28 (FBXO28) silencia una actividad ubiquitina E3 ligasa de FBXO28 hacia HIF1α. Interferir con esta interacción proteína-proteína conduce a una fuerte inducción de la degradación proteasomal de HIF1α y a la muerte celular en los tumores, y por lo tanto, los compuestos cribados según la presente invención albergan un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades proliferativas como el cáncer. La invención proporciona un método de cribado para productos terapéuticos contra el cáncer basado en la interacción de PFKFB₄ y FBXO28, así como aplicaciones médicas de la misma.

Descripción

El cáncer es una de las principales enfermedades mortales para los seres humanos y está causado por una proliferación celular fisiológicamente descontrolada que afecta a las condiciones fisiológicas normales del cuerpo humano y que da lugar a graves reacciones patológicas que a menudo conducen a la muerte. Aunque se han realizado enormes esfuerzos en los estudios y tratamientos del cáncer, en la actualidad, el cáncer sigue siendo la principal causa de muerte de los seres humanos. Existen múltiples enfoques para tratar a los pacientes con cáncer, como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

Las células neoplásicas utilizan preferentemente la glucólisis para satisfacer sus mayores necesidades de energía y precursores biosintéticos. Las enzimas PFKFB (PFKFB1-4) sintetizan fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP). La F2,6BP activa la 6-fosfofructo-1-cinasa (PFK-1), un punto de control fundamental en la vía glucolítica. Hasta hace poco, la isoenzima PFKFB3 se consideraba la fuente principal del aumento de F2,6BP observado en las células cancerosas. Sin embargo, nuevas pruebas indican la coexpresión de varias isozimas de PFKFB en tejidos transformados y no transformados, así como una mayor expresión de la isoforma PFKFB4 en varias líneas celulares neoplásicas y en tumores.

El documento WO 2008/073382A2 divulga métodos *in vivo* e *in vitro* para identificar agentes y compuestos que inhiben la unión de HSP90 e IP6K2, en los que se puede controlar cualquier fenómeno asociado a la unión o inhibición, incluyendo la muerte celular, la localización subcelular, la actividad catalítica de IP6K2 y la formación de IP7.

El documento US8283332B2 divulga métodos para reducir la expresión de PFKFB4 y tratar el cáncer en una célula, en los que los métodos incluyen el contacto de una célula con una cantidad eficaz de un inhibidor de PFKFB4 que comprende ARN de horquilla corta (ARNhc) e inhibidores de ARN interferente pequeño (ARNip), y sus métodos de uso.

Por lo tanto, sigue siendo necesario en la técnica poder identificar agentes con potencial terapéutico para el tratamiento de trastornos proliferativos. La identificación de compuestos es una necesidad urgente para permitir el desarrollo de tratamientos desde el laboratorio hasta la práctica clínica. Cuantos más agentes se conozcan en la técnica que sean potencialmente útiles en tratamientos, mayor será la probabilidad de nuevas opciones de tratamiento exitosas en el futuro.

A continuación, se describirán los elementos de la invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, aunque debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las realizaciones preferidas no deben interpretarse como una limitación de la presente invención a las realizaciones descritas explícitamente. Esta descripción debe entenderse que apoya y abarca realizaciones que combinan dos o más de las realizaciones explícitamente descritas o que combinan una o más de las realizaciones explícitamente descritas con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, todas las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse divulgadas por la descripción de la presente solicitud, a menos que el contexto indique lo contrario.

Este problema se resuelve en un primer aspecto mediante un método para la identificación de un compuesto que es útil como medicamento para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar un compuesto candidato,

(b) proporcionar un complejo de proteínas que comprenda PFKFB4 y FBXO28, o fragmentos o derivados de las mismas, en el que PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas estén en interacción directa de proteína a proteína entre sí (como por ejemplo, uniéndose entre sí),

(c) poner en contacto dicho compuesto candidato con el complejo de proteínas que comprende PFKFB4 y FBXO28, o fragmentos o derivados de las mismas, y

(d) determinar si el contacto en (c) produce un cambio en la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas, opcionalmente por comparación con un control,

en el que, en el caso de una reducción de la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas, como se determina en la etapa (d), el compuesto candidato es útil como medicamento para el tratamiento del cáncer.

En el contexto de la presente invención, el término "PFKFB4" se refiere a la enzima 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 4. El término abarcará la versión humana de esta proteína, pero también sus homólogos, en particular en el ratón o la rata. La información sobre PFKFB4 puede obtenerse de la página web de nombres de genes humanos (<https://www.genenames.org/>) cuyo número de registro es HGNC:8875. Puede accederse a la proteína PFKFB4 en la página web de UniProt bajo el número de registro Q16877, y además, al menos la versión humana, se muestra en la SEQ ID NO: 1 (isoforma 1). Todas las demás isoformas de la proteína también estarán comprendidas en la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término "FBXO28" se refiere a la proteína F-box 28. El término abarcará la versión humana de esta proteína, pero también sus homólogos, en particular en el ratón o la rata. La información sobre FBXO28 puede obtenerse de la página web de nombres de genes humanos (<https://www.genenames.org/>) cuyo número de registro es HGNC:29046. Puede accederse a la proteína FBXO28 en la página web de UniProt bajo el número de registro Q9NVF7, y además, al menos la versión humana, se muestra en la SEQ ID NO: 2 (isoforma 1). Todas las demás isoformas de la proteína también estarán comprendidas en la presente invención.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el derivado o fragmento de PFKFB4 se caracteriza por su capacidad de estar en interacción proteína-proteína con una proteína FBXO28 de longitud completa.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el derivado o fragmento de FBXO28 se caracteriza por su capacidad de estar en interacción proteína-proteína con una proteína PFKFB4 de longitud completa.

En este contexto, la capacidad de estar en interacción proteína-proteína es preferentemente la capacidad de dicho derivado o fragmento de proteína para formar una interacción que imita la interacción proteína-proteína nativa entre PFKFB4 y FBXO28. Dicha interacción nativa se describe aquí en la sección de ejemplos. En algunas realizaciones preferidas, la interacción proteína-proteína de PFKFB4 y FBXO28 está mediada y/o localizada en el dominio fosfatasa de PFKFB4 y/o en un dominio que está en proximidad espacial al dominio fosfatasa, en el que la proximidad espacial está dentro de no más de 50 (preferentemente 40, 30, 20 o 10) restos aminoácidos N o C separados terminalmente de al menos un resto aminoácido localizado dentro del dominio fosfatasa de PFKFB4. Por lo tanto, preferentemente, cualquier derivado o fragmento de PFKFB4, preferentemente en las realizaciones, conserva el dominio fosfatasa que media en la interacción y/o un dominio que está en proximidad espacial al dominio fosfatasa, en el que la proximidad espacial está dentro de no más de 50 (preferentemente 40, 30, 20 o 10) restos aminoácidos N o C separados terminalmente de al menos un resto aminoácido localizado dentro del dominio fosfatasa de PFKFB4, y en el que dicho dominio está mediando en la interacción. Más preferentemente, en todos los aspectos y realizaciones, el derivado o fragmento de PFKFB4, por lo tanto, es una PFKFB4 que carece de cualquier dominio o secuencia excepto el dominio fosfatasa, o más ejemplarmente, carece del dominio cinasa de PFKFB4.

En otras realizaciones preferidas, el ensayo de cribado de la invención es un ensayo NanoBiT® como se describe en detalle en Dixon *et al.* (2016), "NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells" (ACS Chem. Biol., 11, 400-408;). Sin embargo, también pueden ser objeto de la presente invención otros ensayos conocidos por los expertos en la materia y adecuados para determinar las interacciones proteína-proteína.

Todas las referencias a las bases de datos en el contexto de la invención se refieren a sus respectivas versiones del 26 de enero de 2018.

En el contexto de la invención también se englobará cualquier variante o fragmento de PFKFB4 y FBXO28 si tiene un aminoácido con una identidad de secuencia de al menos 50, 60, 70, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % en comparación con la secuencia de aminoácidos de PFKFB4 y FBXO28 humana, respectivamente, por lo tanto, SEQ ID NO: 1 o, respectivamente, 2, tal y como se describe en el presente documento. Los fragmentos o PFKFB4 y FBXO28 o sus variantes tendrán preferentemente una longitud de al menos 30, 40, 50, 80, 100, 150, 200, 300 o más aminoácidos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", cuando se utilizan en cualquier lugar del presente documento en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas/polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen (o tienen al menos) un porcentaje especificado de restos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, al menos un 60 % de identidad, preferentemente al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 % o 94 % de identidad, y más preferentemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad en una región específica, preferentemente en sus secuencias completas, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia en la ventana de comparación o región designada), según se mide utilizando algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI). En particular, para la identidad de aminoácidos, se utiliza BLASTP 2.2.28+ con los siguientes parámetros:

matriz: BLOSUM62; penalizaciones de hueco: existencia: 11, extensión: 1; umbral de palabras vecinas: 11; ventana para múltiples aciertos: 40.

5 Los fragmentos o derivados o variantes de PFKFB4 y/o FBX028 pueden ser fácilmente probados para la capacidad de tener una interacción proteína-proteína. Por lo tanto, la presente invención también divulga un método para determinar si un derivado de proteína, variante y/o fragmento de PFKFB4 mantiene la capacidad de interactuar (unirse) directamente a FBX028 (preferentemente en versión de longitud completa). El método comprende una etapa de poner en contacto el derivado, variante y/o fragmento candidato de PFKFB4 con la proteína FBX028 (por ejemplo, de longitud completa), y la detección de su interacción, por ejemplo, mediante coimmunoprecipitación. También
10 comprende un método para determinar si un derivado de proteína, variante y/o fragmento de FBX028 mantiene la capacidad de interactuar (unirse) directamente a PFKFB4 (preferentemente en versión de longitud completa). El método comprende una etapa de poner en contacto el derivado, variante y/o fragmento candidato de FBX028 con la proteína PFKFB4 (por ejemplo, de longitud completa), y detectar su interacción, por ejemplo, mediante coimmunoprecipitación.

15 El método anterior para probar variantes/derivados y/o fragmentos de proteínas puede, en algunas realizaciones, formar parte del método descrito anteriormente para la identificación de un compuesto que sea útil como medicamento para el tratamiento del cáncer, preferentemente si el método abarca el uso de cualquier derivado, variante y/o fragmento de proteína de PFKFB4 y/o FBX028.

20 El método de la invención puede, en algunas realizaciones, comprender el suministro del complejo (de proteínas) dentro de una célula de ensayo biológico, o se proporciona en un sistema sin células. Si el cribado se realiza en contacto con una célula de ensayo biológico, se utilizan preferentemente células humanas, tales como las células HEK.

25 En general no hay límites a la naturaleza del compuesto candidato utilizable en el cribado de la invención. En las realizaciones preferidas, el compuesto candidato se selecciona de un compuesto molecular pequeño ("molécula pequeña"), un polipéptido, un péptido, una glicoproteína, un peptidomimético, una construcción de unión a un antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, una molécula similar a un anticuerpo u otro derivado de unión a un antígeno, o un fragmento de unión a un antígeno del mismo), un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, por ejemplo, un ADN o ARN antisentido o inhibidor, una ribozima, un aptámero de ARN o ADN, ARNi, ARNip, ARNhc y similares, incluidas sus variantes o derivados, TAL como un ácido nucleico peptídico (ANP), una construcción genética para la edición de genes dirigida, TAL como una construcción CRISPR/Cas9 y/o un ácido nucleico guía (ARNg o ARNg) y/o ARNcrtra.

30 La expresión "molécula pequeña", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas orgánicas o inorgánicas sintetizadas o naturales, que generalmente tienen un peso molecular igual o inferior a 1000 D, sin embargo la definición de molécula pequeña no está limitada en algunas realizaciones a este número.

35 En la técnica se conocen diversos métodos para ensayar las interacciones proteína-proteína (unión) cualitativa o cuantitativamente. La presente invención abarcará todos los métodos conocidos de la técnica anterior que sean aplicables por los expertos en la materia. Sin embargo, en algunas realizaciones, se pueden preferir los siguientes enfoques:

- (i) la coimmunoprecipitación de las proteínas que interactúan,
- (ii) una transferencia de energía de resonancia Förster (FRET),
- (iii) un ensayo de dos híbridos de levadura, (iv) la reticulación covalente proteína-proteína,
- 40 (v) la espectroscopia de masas,
- (vi) la cromatografía de afinidad,
- (vii) la inmunotransferencia de afinidad,
- (viii) los reconstrucción de dos híbridos
- (ix) los ensayos de genes indicadores (NanoBiT™),
- 45 (x) la detección de la ubiquitilación de HIF1a,
- (xi) la detección de la degradación de HIF1a,
- (xii) los ensayos basados en la inmunofluorescencia,
- (xiii) la detección de la viabilidad celular del ensayo.

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "interacción proteína-proteína" o cualquier variante gramatical de esta expresión, se refiere a la asociación estrecha y estable entre proteínas. Suele implicar la formación de enlaces químicos no covalentes, como los enlaces de hidrógeno. La interacción directa significa que dos proteínas implicadas tienen un contacto estrecho y forman enlaces químicos entre ellas. La interacción indirecta entre dos proteínas se produce cuando éstas no interactúan directamente entre sí, sino que se unen al interactuar con otras proteínas que, a su vez, interactúan directa o indirectamente entre sí. Una interacción proteína-proteína preferida de la invención está mediada y/o localizada en el dominio fosfatasa de PFKFB4, o en un dominio que está en proximidad espacial al dominio fosfatasa, en el que la proximidad espacial está dentro de no más de 50 (preferentemente 40, 30, 20 o 10) restos aminoácidos N o C terminalmente separados de al menos un resto aminoácido localizado dentro del dominio fosfatasa de PFKFB4.

10 El método de cribado de la invención se realiza preferentemente en un sistema animal no humano, *ex vivo* o *in vitro*. Con respecto a los usos *ex vivo*, el método se realiza preferentemente en sistemas sin células o, como alternativa, en cultivo celular. En el contexto de este último, son preferibles las células de mamífero y, en particular, pueden utilizarse líneas celulares humanas, tales como las células renales embrionarias humanas (HEK).

15 La idea de la invención en general es el uso del método en la producción e identificación de terapias anticancerígenas. Por lo tanto, el cáncer en el contexto de la invención es preferentemente un cáncer que expresa PFKFB4, preferentemente un cáncer asociado con una expresión elevada de PFKFB4.

20 Preferentemente, el cáncer es cualquier tumor o enfermedad cancerosa, preferentemente seleccionado entre un tumor líquido o sólido, y preferentemente es cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, linfoma, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, cáncer de glándulas salivales, cáncer de huesos, cáncer cerebral, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de piel, melanoma, carcinoma de células escamosas, adenoma pleomórfico, carcinoma hepatocelular y/o adenocarcinoma. Los cánceres preferidos son el glioblastoma, cáncer de mama, de próstata o de pulmón.

25 Otro aspecto de la invención se refiere, por tanto, a un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de interrumpir, en la célula asociada con el cáncer en el sujeto, la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28.

El cáncer es preferentemente un cáncer como el definido anteriormente.

30 Un sujeto según la invención es preferentemente un mamífero, preferentemente un paciente humano que sufre de cáncer y necesita un tratamiento.

El método de tratamiento de la invención comprende preferentemente la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que reduce específicamente la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28 en una célula asociada con el cáncer. El compuesto es preferentemente un compuesto como el identificado según la invención aquí divulgada.

35 La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, aunque sin limitarse a ellas. En las figuras:

Figura 1:

TMA y transferencias Western

Figura 2:

40 (A) Imagen luminiscente de animales que expresan de forma estable el gen de la luciferasa y son tratados con doxiciclina durante 6 semanas. (B) Curvas de Kaplan Meier de los animales tratados con doxiciclina que expresan shNT (negro) o shPFKFB4 (gris) y los animales no tratados (línea discontinua). (C) Tamaño del tumor determinado por adquisición de imágenes luminiscentes, expresado en flujo total (fotones/segundo). (D) Secciones teñidas con H y E barridas de cerebros de ratón del grupo no tratado y que expresan shNT utilizando el Leica ImageScope. Se presenta el cerebro entero, con 10 y 40 aumentos.

Figura 3:

La PFKFB4 participa en la función transcripcional de HIF

Figura 4:

La atenuación de PFKFB4 afecta a la estabilidad de HIF

50 Figura 5:

La FBXO28 interactúa con PFKFB4

Figura 6:

La FBX028 es necesaria para la estabilidad de HIF1α

Figura 7:

Muestra un ensayo NanoBiT® para el cribado de compuestos candidatos.

5 Y en las secuencias:

SEQ ID NO: 1

MASPRELTQNPLKKIWMPYSNGRPALHACQRGVCMTCPTLIVMVGLPARGKTYISKKLT
 RYLNWIGVPTREFNVGQYRRDVVKTYKSFEFFLPDNEEGLKIRKQCALAALRDVRRFLSE
 EGGHVAVFDATNTRRERRATIFNFGEQNGYKTFVESICVDPEVIAANIVQVKLGSPDYV
 NRDSDEATEDFMRRIECYENSYESLDEDLDRDLSYIKIMDVGQSYVVNRVADHIQSRIYV
 YLMNIHVTPRSIYLCRHGESELNLKGRIGGDPGLSPRGREFAKSLAQFISDQNIKDLKVV
 TSQMKRTIQTAELGVPYEQWVKVLEIDAGVCEEMTYEEIQDNYPLEFALRDQDKYRYRY
 PKGESYEDLVQRLEPVMELERQENVLVICHQAVMRCLLAYFLDKAAEQLPYLKCPHDTV
 LKLTVPVAYGCKVESIFLNVAAVNTHDRPQNVDISRPEEALVTVPAHQ

SEQ ID NO: 2

MAAAAEERMAEEGGGGQGDGGSSLASGSTQRQPPPPAPQHPQPGSQALPAPALAPDQLPQ
 NNTLVALPIVAIENILSFMSYDEISQLRLVCKRMDLVCQRMLNQGFLKVERYHNLCQKQV
 KAQLPRRESERRNHSLARHADILAAVETRLSLLNMTFMKYVDSNLCCFIPGKVIDEIRV
 LRYVNSTRAPQRAHEVLQELRDISSMAMEYFDEKIVPILKRKLPGSDVSGRLMGSPVPVPG
 PSAALTMMQLFSKQNSRQEVTKLQQVKTNGAGVTVLRREISELRTKVQEQQKQLDQD
 QKLEQTQIIGEQNARLAELERKLEVMESAVGNSSGSGQNEESPRKRKATEAIDSLRK
 SKRLRNRK

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Expresión de PFKFB4 específica de tumor

Estudios recientes han demostrado la importancia del gen clave de la glucólisis PFKFB4 para la supervivencia de diferentes células tumorales *in vitro* e *in vivo*, destacando su potencial como diana terapéutica. Para investigar el nivel de expresión de la proteína endógena dentro de diferentes entidades cancerosas, los inventores han desarrollado un nuevo anticuerpo PFKFB4 que es adecuado para la transferencia Western y la inmunohistoquímica, lo que permite la tinción de alto rendimiento de micromatrices de tejidos ("Tissue Microarrays", (TMA). Como se muestra en la figura 1A, las muestras de proteína de tumor de próstata mostraron un nivel de expresión de PFKFB4 significativamente mayor que las muestras normales. Del mismo modo, las muestras emparejadas tumorales y normales de pacientes con cáncer de pulmón mostraron una marcada diferencia en el nivel de expresión de PFKFB4 (figura 1A). Como se muestra en la figura 1B, el nivel de expresión de la proteína PFKFB4 oscila entre la no expresión y la alta expresión, siendo los tejidos normales mayoritariamente negativos para PFKFB4. Curiosamente, el nivel de expresión se correlacionó con el grado de los diferentes tumores, independientemente de su origen tisular, lo que sugiere que PFKFB4 podría estar implicada en el mantenimiento y el crecimiento de los tumores.

Ejemplo 2: La atenuación de PFKFB4 afecta a la viabilidad de las GSC *in vivo*

Para verificar el efecto del silenciamiento de PFKFB4 en el crecimiento del tumor *in vivo*, los inventores usaron un modelo de ratón de xenoinjerto. Para ello, se generaron construcciones de expresión inducible que codifican un ARNhc dirigido a PFKFB4 y un ARNhc no dirigido como control negativo. Las GSC transducidas de forma estable (NCH421k_TetONshPFKFB4 y NCH421k_TetONshNT) fueron tratadas durante tres días con doxiciclina y se caracterizó la atenuación de PFKFB4 a nivel de proteína. Para permitir el seguimiento del crecimiento del tumor *in vivo*, las líneas de GSC inducibles fueron transducidas de forma estable con una construcción que expresa luciferasa.

Dos grupos de 8 y 14 animales fueron trasplantados ortotópicamente con 100 000 células NCH421k_Luc_TetONshNT y NCH421k_Luc_TetONshPFKFB4, respectivamente. El crecimiento del tumor expresado como señal luminiscente se controló dos veces por semana. La aparición de la señal de tamaño suficiente (aproximadamente 200 000 flux/fotones/segundo) determinó el inicio del tratamiento con doxiciclina. Los animales fueron separados

aleatoriamente en tres grupos, a saber, tratados con shNT_dox (n = 8), tratados con shPFKFB4_dox (n = 7) y no tratados con shPFKFB4 (n = 7). Se tomaron fotografías de los animales dos veces por semana (figura 2A). Los animales que expresan shPFKFB4 tras el tratamiento con doxiciclina mostraron una supervivencia significativamente mejor que los animales de control (animales no tratados y animales que expresan shNT) (figura 2B).

- 5 La atenuación de PFKFB4 redujo significativamente el tamaño del tumor con el tiempo, tal y como se observó por la intensidad de los centros de bioluminiscencia, lo que finalmente condujo a la pérdida de células tumorales unas tres semanas después del tratamiento (figura 2C). De hecho, se pudo observar un tumor en el cerebro de los animales enfermos sacrificados (shNT no tratados y tratados con doxiciclina) mediante tinción con H y E (figura 2D), mientras que la mayoría de los ratones tratados con doxiciclina shPFKFB4 estaban libres de tumores. Los tumores residuales de los animales tratados con shPFKFB4_dox seguían expresando PFKFB4, lo que sugiere que la inducción con doxiciclina de shPFKFB4 no era completamente eficaz en estos tumores, como se confirmó por inmunofluorescencia.

Ejemplo 3: Impacto del silenciamiento de PFKFB4 en la expresión de PDK1

- 15 Como se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, el impacto del silenciamiento de PFKFB4 es particularmente alto para la viabilidad de las GSC. Para determinar su efecto en la regulación de la expresión de otros genes, se realizó el perfil de la expresión génica de tres líneas diferentes de GSC (NCH421k, NCH441 y NCH644) transducidas con pLKO_shPFKFB4 y pLKO_shNT. Curiosamente, la atenuación de PFKFB4 condujo a una disminución de la firma génica de HIF1α, según lo determinado por el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes ("Gene Set Enrichment Analysis", GSEA) (figura 3A). Entre las numerosas dianas conocidas de HIF1α que los inventores identificaron, tales como LDHA, CA9 e IGF2, la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) mostró la mayor reducción tras la atenuación de PFKFB4, lo que se verificó mediante qRT-PCR (figura 3B). La PDK1 es una enzima clave que regula el destino del piruvato dentro de la vía glucolítica al fosforilar y, por tanto, inhibir la piruvato deshidrogenasa (PDH). Para verificar que la atenuación de PFKFB4 también afectaba a la fosforilación de la diana de PDK1, los inventores realizaron un análisis de la transferencia Western tras la atenuación de PFKFB4 utilizando CRISPR. Como se muestra en la figura 3C, el nivel de PDH fosforilada disminuyó tras la eliminación de PFKFB4.

- 25 Dado que el efecto del silenciamiento de PFKFB4 sobre la expresión de PDK1 fue significativo, se investigó la expresión endógena de ambos genes en una cohorte de pacientes con glioblastoma (n = 154), disponible en The Cancer Genome Atlas (TCGA). De modo notable, la PDK1 mostró la mayor correlación de expresión con la PFKFB4 (R = 0,67) (figura 3D), un fenómeno que parecía ser específico de esa isoforma PFK2/FBP2. De hecho, ninguna de las otras isoformas que se expresan en las muestras de glioblastoma mostró ninguna correlación con la expresión de PDK1 (figura 3D).

- 30 Ejemplo 4: PFKFB4 participa en la regulación de los niveles de la proteína HIF1α

- Como se ha puesto de manifiesto en los perfiles de expresión génica de las líneas de GSC con atenuación de PFKFB4, esta parece estar implicada en la regulación de la expresión de genes que son dianas del factor de transcripción HIF1α. Para investigar el papel potencial de PFKFB4 en la regulación de la expresión de HIF1α, se realizó una qRT-PCR en GSC con atenuación de PFKFB4. Como se muestra en la figura 4A, no se observó ninguna disminución del ARNm de HIF1α tras la atenuación de PFKFB4. De hecho, parece que, tras el silenciamiento, HIF1α se regula positivamente a nivel de ARNm. Sin embargo, la atenuación de PFKFB4 condujo a una fuerte disminución de HIF1α a nivel de proteína (figura 4B), sugiriendo que PFKFB4 está involucrada postranscripcionalmente en la regulación de HIF1α. Este fenómeno se confirmó mediante la atenuación de PFKFB4 utilizando dos ARN guía CRISPR diferentes (figura 4C).

- 40 Como las GSC se cultivan como neuroesferas, lo que podría llevar a un nivel diferente de disponibilidad de oxígeno y nutrientes, influyendo así en la dependencia del factor de transcripción HIF1α, los inventores realizaron una atenuación de PFKFB4 en GSC adherentes. Curiosamente, incluso en estas condiciones de normoxia, HIF1α se expresa fuertemente, lo que sugiere que los niveles de proteína HIF1α dependen de la expresión de PFKFB4, independientemente de las condiciones de cultivo (figura 4C). Además, la sobreexpresión de PFKFB4 en las células HEK293 condujo a la regulación positiva de HIF1α, mientras que su atenuación en condiciones de hipoxia disminuyó los niveles de proteína HIF1α (figura 4D).

Ejemplo 5: Identificación de una nueva ubiquitina E3 ligasa de HIF1α

Como ambas proteínas no interactúan directamente entre sí, los inventores realizaron una espectrometría de masas de muestras de PFKFB4 inmunoprecipitadas para encontrar compañeros de unión de PFKFB4 que pudieran estar implicados en los mecanismos de estabilización de HIF1α.

- 50 Las proteínas que muestran más de dos secuencias de firma se enumeran en la figura 5A. La unión de FBXO28 a PFKFB4 se verificó por coIP y por dos híbridos de levadura (figura 5B). Además, la localización citoplasmática de ambas proteínas se verificó mediante inmunofluorescencia (figura 5C). La FBXO28 es un miembro de la familia de proteínas F-Box y se cree que forma parte del complejo SCF formado por SKP1, culina y proteínas F-box, como se muestra por coIP (figura 5D), actuando como ubiquitina ligasa. Curiosamente, a diferencia de PFKFB4, la expresión del ARNm de FBXO28 está disminuida en el glioblastoma en comparación con el cerebro normal, y los pacientes con una expresión más baja tienen una mejor supervivencia (figura 5E).

Ejemplo 6: PFKFB4 se une a FBXO28 para inhibir la ubiquitilación y la degradación de HIF1α

Para verificar el papel de PFKFB4 en la ubiquitilación de HIF α , los inventores realizaron una inmunotransferencia utilizando el anticuerpo de ubiquitina en HIF α inmunoprecipitado tras el tratamiento con MG132. Como se destaca en la figura 6A, la ubiquitilación de HIF α está disminuida en las células que sobreexpresan PFKFB4. A continuación, se identificó la importancia del vínculo entre FBX028 y para la expresión de la proteína HIF α y la supervivencia de las GSC PFKFB4. En este sentido, se atenuó PFKFB4 solo o en combinación con el silenciamiento de FBX028 en GSC y se realizó un análisis FACS. El efecto sobre el nivel de proteínas HIF1 α se verificó mediante transferencia Western. Como se muestra en la figura 6B, la atenuación de PFKFB4 disminuyó el nivel de proteínas HIF α mientras que el silenciamiento de FBX028 por sí solo no lo redujo. Sin embargo, el silenciamiento tanto de FBX028 como de PFKFB4 en las GSC rescató el nivel de HIF α . El rescate también se observó a nivel fenotípico (figura 6C).

En conjunto, estos resultados enfatizan el papel potencial de PFKFB4 para proteger a HIF α del complejo SCF, permitiendo la expresión de genes diana de HIF en las células madre del glioblastoma.

Ejemplo 7: Desarrollo de un método de cribado para identificar inhibidores de compuestos pequeños para inhibir la función de PFKFB4

El ensayo NanoBiT[®] de Promega se utiliza ampliamente para investigar las interacciones proteína-proteína.

El ensayo NanoBiT se describe en detalle en Dixon *et al.* (2016), "NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells" (ACS Chem. Biol., 11, 400-408).

Los inventores adaptaron este método para desarrollar un ensayo de cribado celular con el fin de investigar la interacción de PFKFB4 con FBX028. A este respecto, ambos genes se clonaron en vectores pLVX que contenían las cuatro versiones de NanoBiT[®] (pLVX1.1-N[TK/LgBiT], pLVX2.1-N[TK/SmBiT], pLVX1.1-C[TK/LgBiT] y pLVX2.1-C[TK/SmBiT]), lo que permitió que los marcadores BiT pequeño y grande estuvieran en el extremo N- o C-terminal de ambas proteínas de interés. Como control negativo, se utilizó un vector que contenía una proteína HaloTag clonada en el BiT pequeño en combinación con el BiT grande clonado en FBX028 o PFKFB4.

Todos los vectores se transfectaron en células HEK293 y las combinaciones se probaron como se muestra en la figura 7A. La señal luminiscente se detectó con el sistema de ensayo de luciferasa Nano-Glo[®] de Promega. La interacción se consideró positiva si la señal era al menos 10 veces mayor que la del control negativo respectivo. La combinación del vector que contiene PFKFB4 marcado en el C-terminal con el BiT grande con el vector que expresa FBX028 marcado en el N-terminal con el BiT pequeño (véase la figura 7A, 2^a columna) produjo la señal más alta y, por lo tanto, se seleccionó para una mayor validación.

Para verificar la especificidad del ensayo, los inventores transfectaron células HEK293 con la combinación que mostraba los mejores resultados (C-ter[LgBiT]PFKFB4+N-ter[SmBiT]FBX028) junto con una concentración creciente de un vector que sobreexpresaba PFKFB4 no marcada. Como se muestra en la figura 7B, la señal generada por la interacción de PFKFB4 marcado y FBX028 disminuyó al añadir PFKFB4 no marcado que compite con PFKFB4 marcado para formar el complejo de interacción. Esto es una clara indicación de que un compuesto candidato a interactuar (en este caso representado por la PFKFB4 no marcada) en un ensayo de cribado produciría señales indicativas de la alteración de la interacción entre ambas proteínas.

Finalmente, mediante la transfección de diferentes versiones truncadas de PFKFB4 marcada junto con FBX028 marcada, los inventores pudieron determinar que la interacción se reduce si se elimina el dominio fosfatasa y, por lo tanto, que el sitio de interacción entre ambas proteínas se encuentra muy probablemente dentro del dominio fosfatasa de PFKFB4 (figura 7C).

40

Lista de secuencias

<110> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des oeffentlichen Rechts

<120> MÉTODO DE CRIBADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER

5 <130> D31602WO

<150> 18153933.9

<151> 29-01-2018

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 469

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>1

15

Met Ala Ser Pro Arg Glu Leu Thr Gln Asn Pro Leu Lys Lys Ile Trp
1 5 10 15

Met Pro Tyr Ser Asn Gly Arg Pro Ala Leu His Ala Cys Gln Arg Gly
20 25 30

Val Cys Met Thr Asn Cys Pro Thr Leu Ile Val Met Val Gly Leu Pro
35 40 45

Ala Arg Gly Lys Thr Tyr Ile Ser Lys Lys Leu Thr Arg Tyr Leu Asn
50 55 60

Trp Ile Gly Val Pro Thr Arg Glu Phe Asn Val Gly Gln Tyr Arg Arg
65 70 75 80

Asp Val Val Lys Thr Tyr Lys Ser Phe Glu Phe Phe Leu Pro Asp Asn
85 90 95

Glu Glu Gly Leu Lys Ile Arg Lys Gln Cys Ala Leu Ala Ala Leu Arg
100 105 110

Asp Val Arg Arg Phe Leu Ser Glu Glu Gly Gly His Val Ala Val Phe
115 120 125

Asp Ala Thr Asn Thr Thr Arg Glu Arg Arg Ala Thr Ile Phe Asn Phe
130 135 140

Gly Glu Gln Asn Gly Tyr Lys Thr Phe Phe Val Glu Ser Ile Cys Val
145 150 155 160

ES 2 917 605 T3

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

ES 2 917 605 T3

Leu His Thr Val Leu Lys Leu Thr Pro Val Ala Tyr Gly Cys Lys Val
 420 425 430

Glu Ser Ile Phe Leu Asn Val Ala Ala Val Asn Thr His Arg Asp Arg
 435 440 445

Pro Gln Asn Val Asp Ile Ser Arg Pro Pro Glu Glu Ala Leu Val Thr
 450 455 460

Val Pro Ala His Gln
 465

<210> 2

<211> 368

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400>2

Met Ala Ala Ala Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Glu Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gln Gly Asp Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ser Thr Gln Arg Gln
 20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro Gln His Pro Gln Pro Gly Ser Gln Ala Leu
 35 40 45

Pro Ala Pro Ala Leu Ala Pro Asp Gln Leu Pro Gln Asn Asn Thr Leu
 50 55 60

Val Ala Leu Pro Ile Val Ala Ile Glu Asn Ile Leu Ser Phe Met Ser
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Ile Ser Gln Leu Arg Leu Val Cys Lys Arg Met Asp Leu
 85 90 95

Val Cys Gln Arg Met Leu Asn Gln Gly Phe Leu Lys Val Glu Arg Tyr
 100 105 110

His Asn Leu Cys Gln Lys Gln Val Lys Ala Gln Leu Pro Arg Arg Glu
 115 120 125

Ser Glu Arg Arg Asn His Ser Leu Ala Arg His Ala Asp Ile Leu Ala
 130 135 140

Ala Val Glu Thr Arg Leu Ser Leu Leu Asn Met Thr Phe Met Lys Tyr
 145 150 155 160

ES 2 917 605 T3

Val Asp Ser Asn Leu Cys Cys Phe Ile Pro Gly Lys Val Ile Asp Glu
 165 170 175

Ile Tyr Arg Val Leu Arg Tyr Val Asn Ser Thr Arg Ala Pro Gln Arg
 180 185 190

Ala His Glu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ile Ser Ser Met Ala Met
 195 200 205

Glu Tyr Phe Asp Glu Lys Ile Val Pro Ile Leu Lys Arg Lys Leu Pro
 210 215 220

Gly Ser Asp Val Ser Gly Arg Leu Met Gly Ser Pro Pro Val Pro Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Ala Ala Leu Thr Thr Met Gln Leu Phe Ser Lys Gln Asn Pro
 245 250 255

Ser Arg Gln Glu Val Thr Lys Leu Gln Gln Gln Val Lys Thr Asn Gly
 260 265 270

Ala Gly Val Thr Val Leu Arg Arg Glu Ile Ser Glu Leu Arg Thr Lys
 275 280 285

Val Gln Glu Gln Gln Lys Gln Leu Gln Asp Gln Asp Gln Lys Leu Leu
 290 295 300

Glu Gln Thr Gln Ile Ile Gly Glu Gln Asn Ala Arg Leu Ala Glu Leu
 305 310 315 320

Glu Arg Lys Leu Arg Glu Val Met Glu Ser Ala Val Gly Asn Ser Ser
 325 330 335

Gly Ser Gly Gln Asn Glu Glu Ser Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ala Thr
 340 345 350

Glu Ala Ile Asp Ser Leu Arg Lys Ser Lys Arg Leu Arg Asn Arg Lys
 355 360 365

REIVINDICACIONES

1.- Un método para la identificación de un compuesto que es útil como medicamento para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar un compuesto candidato,

5 (b) proporcionar un complejo de proteínas que comprenda PFKFB4 y FBXO28, o fragmentos o derivados de las mismas, en el que PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas estén en interacción directa proteína a proteína entre sí (como, por ejemplo, uniéndose entre sí),

(c) poner en contacto dicho compuesto candidato con el complejo de proteínas que comprende PFKFB4 y FBXO28, o fragmentos o derivados de las mismas, y

10 (d) determinar si el contacto en (c) produce un cambio en la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas, opcionalmente por comparación con un control,

en el que, en el caso de una reducción de la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28, o los fragmentos o derivados de las mismas, como se determina en la etapa (d), el compuesto candidato es útil como medicamento para el tratamiento del cáncer.

15 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el complejo se proporciona dentro de una célula de ensayo biológico, o se proporciona en un sistema sin células.

3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto candidato se selecciona de un compuesto molecular pequeño ("molécula pequeña"), un polipéptido, péptido, una glicoproteína, un peptidomimético, una construcción de unión a un antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, una molécula similar a un anticuerpo u otro derivado de unión a un antígeno, o un fragmento de unión a un antígeno del mismo), un ácido nucleico, tal como un ADN o ARN, por ejemplo, un ADN o ARN antisentido o inhibidor, una ribozima, un aptámero de ARN o ADN, ARNi, ARNip, ARNhc y similares, incluidas sus variantes o derivados, tal como un ácido nucleico peptídico (ARP), una construcción genética para la edición de genes dirigida, tal como una construcción CRISPR/Cas9 y/o un ácido nucleico guía (ARNg o ADNg) y/o ARNcrtra.

25 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la determinación en la etapa (d) comprende al menos una de:

(i) la coimmunoprecipitación de las proteínas que interactúan,

(ii) una transferencia de energía de resonancia Förster (FRET),

(iii) un ensayo de dos híbridos de levadura,

30 (iv) la reticulación covalente proteína-proteína,

(v) la espectroscopia de masas,

(vi) la cromatografía de afinidad,

(vii) la inmunotransferencia de afinidad,

(viii) los reconstrucción de dos híbridos

35 (ix) los ensayos de genes indicadores (NanoBiT™),

(x) la detección de la ubiquitilación de HIF1α,

(xi) la detección de la degradación de HIF1α,

(xii) los ensayos basados en la inmunofluorescencia,

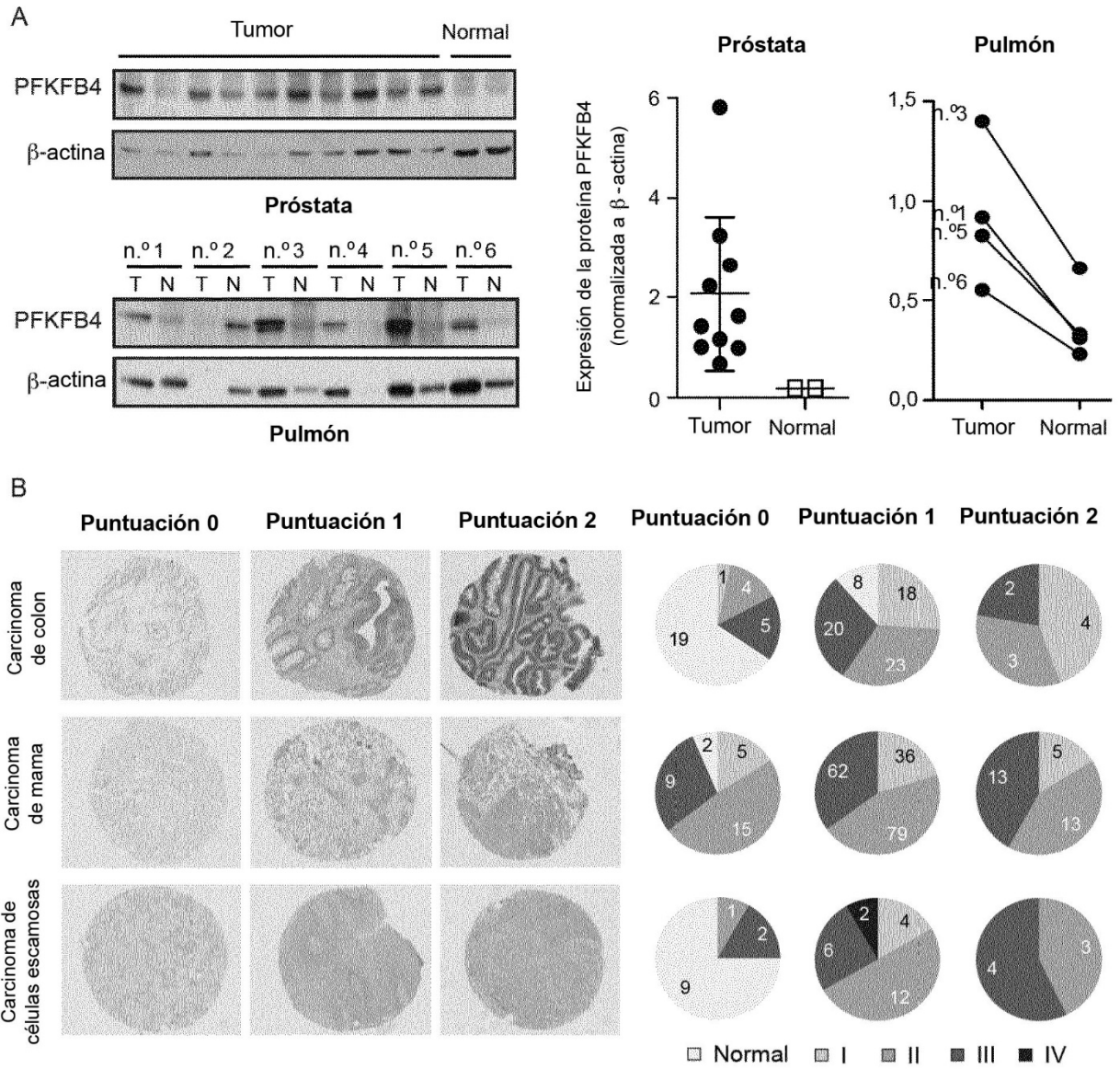
(xiii) la detección de la viabilidad celular del ensayo.

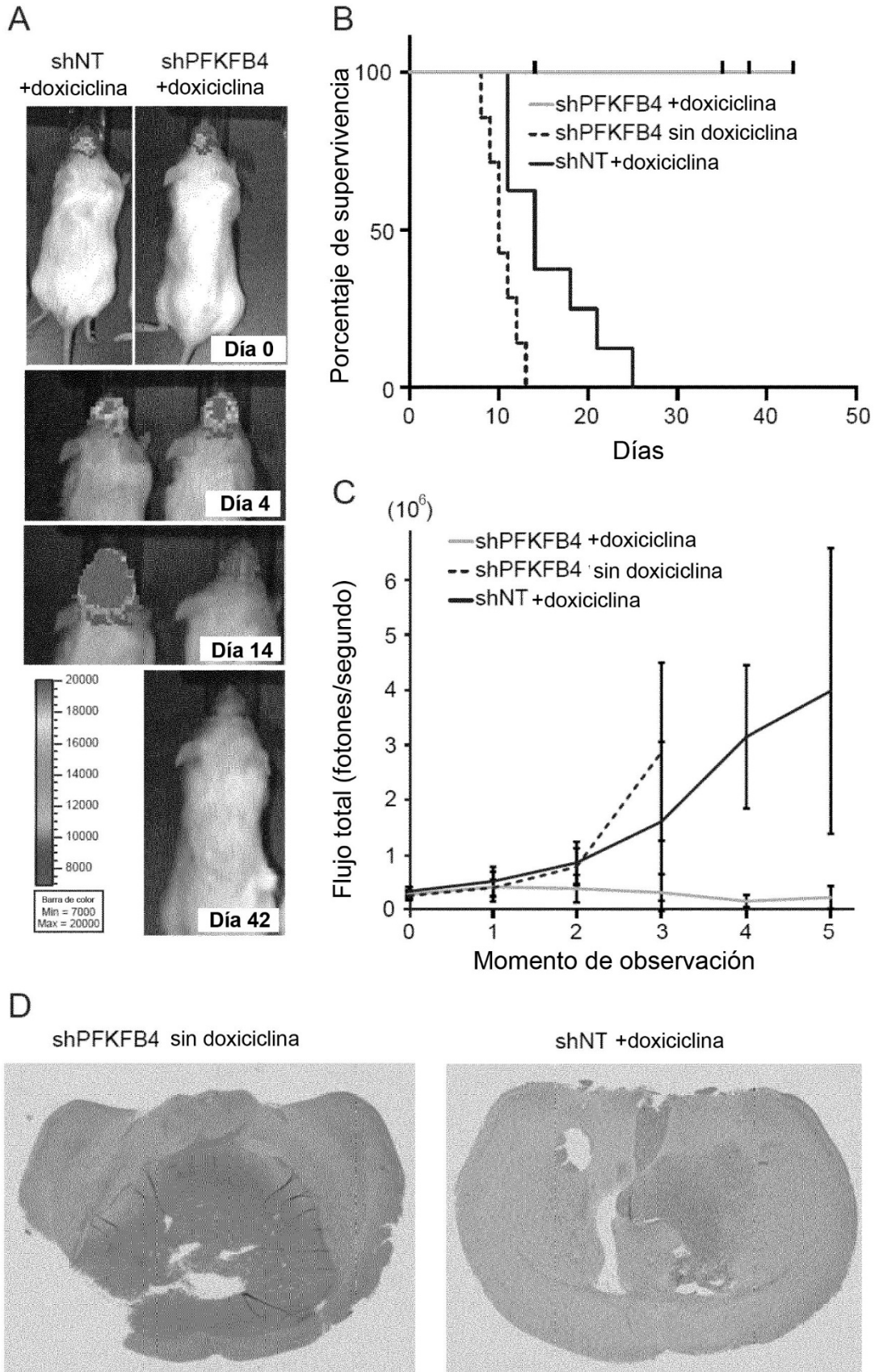
40 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se realiza en un sistema animal no humano, *ex vivo* o *in vitro*, preferentemente en una línea celular humana, tal como células renales embrionarias humanas (HEK).

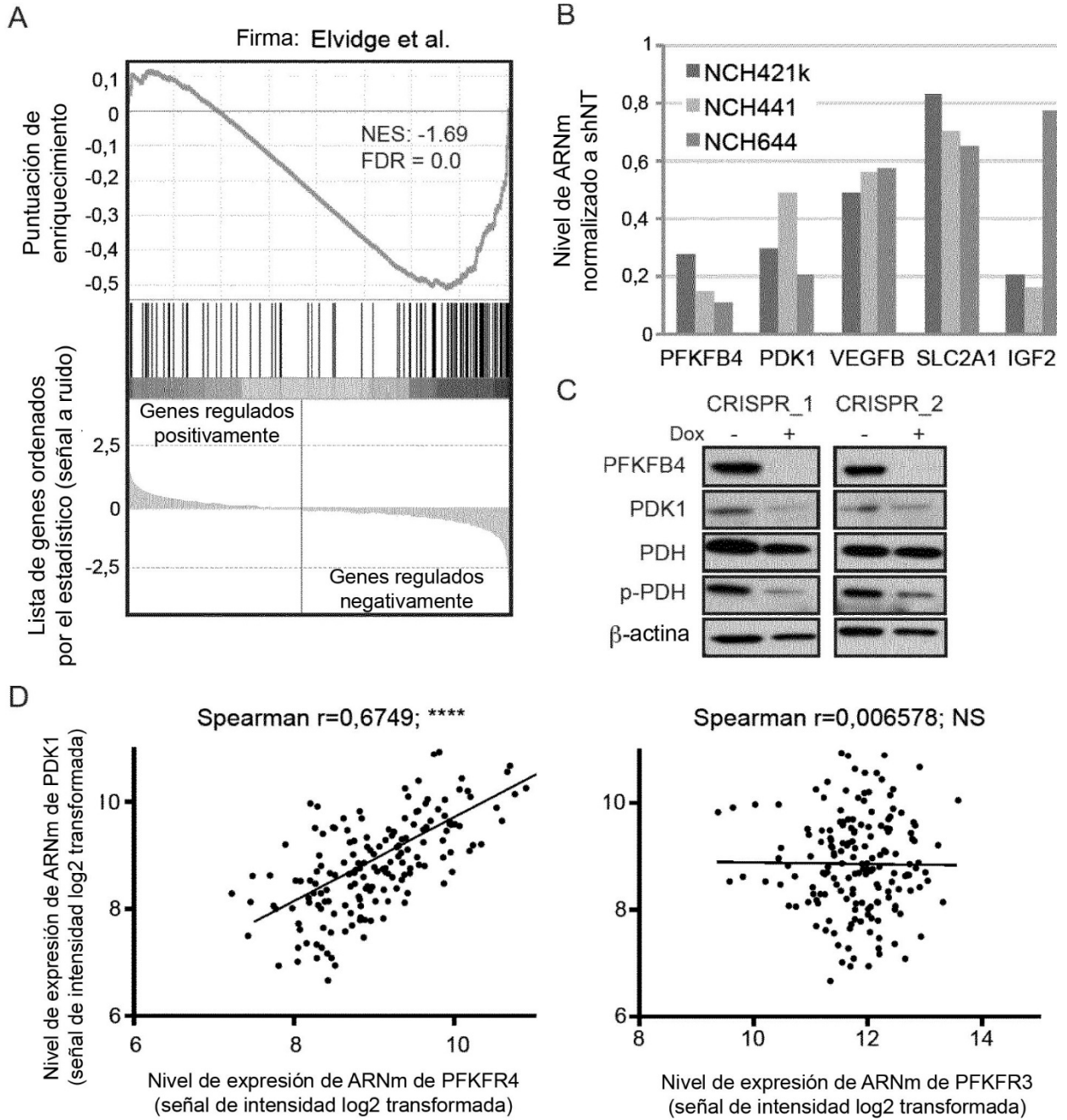
6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el derivado o fragmento de PFKFB4 se caracteriza por su capacidad de estar en interacción proteína-proteína con una proteína FBXO28 de longitud completa.

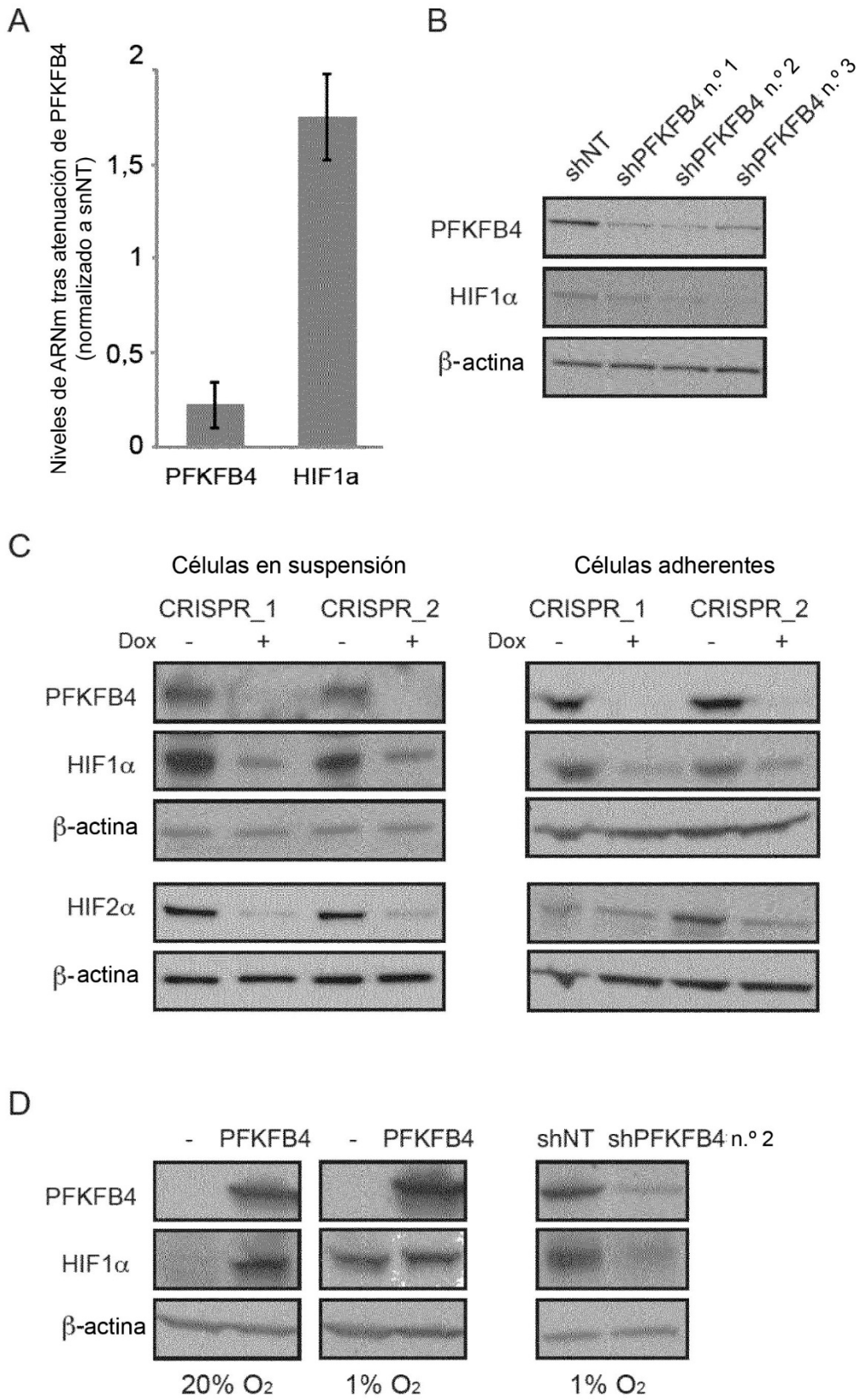
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el derivado o fragmento de FBXO28 se caracteriza por su capacidad de estar en interacción proteína-proteína con una proteína PFKFB4 de longitud completa.
- 5 8.- El método según la reivindicación 6 o 7, en el que la capacidad de estar en interacción proteína-proteína es la capacidad de una interacción que imita la interacción proteína-proteína nativa entre PFKFB4 y FBXO28.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el cáncer es un cáncer que expresa PFKFB4, preferentemente un cáncer asociado con una expresión elevada de PFKFB4, tal como el glioblastoma, el cáncer de mama, de próstata o de pulmón.
- 10 10.- Un compuesto para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto, comprendiendo el método la etapa de interrumpir, en la célula asociada con el cáncer en el sujeto, la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28.
- 11.- El compuesto para su uso según la reivindicación 10, en el que el cáncer es un cáncer caracterizado por la expresión de PFKFB4 y FBXO28.
- 15 12.- El compuesto para su uso según la reivindicación 10 u 11, en el que el sujeto es un mamífero, preferentemente un paciente humano que padece cáncer y necesita un tratamiento.
- 13.- El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el método comprende la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto que reduce específicamente la interacción proteína-proteína entre PFKFB4 y FBXO28 en una célula asociada con el cáncer.
- 20 14.- El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el compuesto es un compuesto como se identifica según un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

Figura 1:









A

Símbolo del gen	Masa [kDa]	Puntuac.	Firma sec. proteínas	Cobertura [%]
PFKFB4	54,7	1114	15	53,4
PFKFB2	59	711	12	31
FBXO28	41,4	532	9	27,1
BDH2	27	423	6	37,9
PFKFB3	60,4	374	5	16,9

