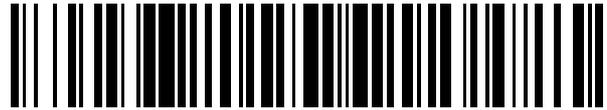


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 776**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008** **E 08859508 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2235535**

54 Título: **Biomarcadores para predecir la sensibilidad de células a compuestos inmunomoduladores durante el tratamiento del linfoma no Hodgkin**

30 Prioridad:

07.12.2007 US 5806 P

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

29.01.2015

73 Titular/es:

**CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 MORRIS AVENUE
SUMMIT, NJ 07901, US**

72 Inventor/es:

**SCHAFER, PETER, H.;
BARTLETT, JUSTIN, B. y
ZHANG, LING-HUA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 527 776 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

Biomarcadores para predecir la sensibilidad de células a compuestos inmunomoduladores durante el tratamiento del linfoma no Hodgkin

1. Campo

- 5 Se proporciona en la presente memoria el control de la expresión de un conjunto específicos de genes o proteínas antes y durante la terapia con un compuesto inmunomodulador para tratar el cáncer, p. ej., pacientes con linfoma no Hodgkin.

2. Antecedentes

- 10 Se han usado diferentes compuestos para tratar el cáncer y entre ellos, compuestos que son capaces de modular el sistema inmunitario. Algunos estudios se han centrado en un grupo de compuestos inmunomoduladores que se seleccionaron inicialmente por su capacidad para inhibir potencialmente la producción de TNF- α por CMSP estimuladas por LPS. L.G. Corral, et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 58 (suppl 1): 1107-1113 (1999). Los compuestos inmunomoduladores de Celgene Corporation, denominados IMiDs®, muestran no solo una potente inhibición del TNF- α sino también una inhibición notable de la producción de IL1 β e IL12 de monocitos inducida por LPS. Los ejemplos particulares de compuestos inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos, descritos y reivindicados en las patentes de Estados Unidos nº 6.281.230 y 6.316.471, ambas de G.W. Muller, et al.

- 20 Uno de estos compuestos, la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, es un fármaco antiangiogénico, antiproliferativo e inmunomodulador que está aprobado para el tratamiento de pacientes con anemia dependientes de transfusión debido al riesgo bajo o intermedio de MDS asociado con una anomalía citogenética del 5q con o sin anomalías citogenéticas adicionales. La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina también está aprobada para usar en combinación con dexametasona para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple tratados previamente.

- 25 El documento US 2007/117133 proporciona un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico y para tratar un tumor de mamífero, que comprende detectar y cuantificar la proteína SPARC o ARN en una muestra aislada del mamífero. El documento de Pellagatti et al, PNAS USA, 104(27), 2007, 11406-11411 describe que la lenalidomida inhibe el clon maligno y regula por aumento el gen de SPARC que se encuentra en la región normalmente eliminada en pacientes con síndrome 5q. ZHANG et al, *BLOOD*, 110 (11 Parte 1), 2007, 1017A-1018A describen que la lenalidomida presenta actividad celular contra linfomas no Hodgkin (NHL) asociada con una expresión potenciada de SPARC pero independiente de su capacidad para inhibir fuertemente la producción de VEGF de células NHL in vitro. ROBINSON et al, *BMC BIOINFORMATICS*, 8(1), 2007, 449, se refieren a la reproducibilidad del nivel de sonda, exón y genes de duplicados técnicos y biológicos de cada una de las 3 plataformas. El documento US 2006/041387 se refiere a la detección del cáncer y, en particular, a un sistema para usar en el diagnóstico temprano del cáncer usando tecnología de micromatriz de alta capacidad. El documento US 2006/135423 se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento o prevención de angiogénesis ocular y neovascularización asociados con enfermedad neovascular.

3. Compendio

- 40 Se proporciona en la presente memoria el uso de ARNm específicos y proteínas como biomarcadores para evaluar la eficacia y progreso del tratamiento por compuestos inmunomoduladores. Por ejemplo, los niveles de ARNm o proteína de SPARC, p21, y ciclina D1, se pueden usar para determinar si es probable que un compuesto inmunomodulador, tal como la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, tenga éxito en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, tales como el NHL. Además, la expresión de estos genes o proteínas se puede usar para controlar el progreso de la eficacia del tratamiento en pacientes de NHL que están recibiendo tratamiento con compuestos inmunomoduladores.

- 45 En algunas realizaciones, se proporciona un método para predecir la respuesta tumoral al tratamiento en un paciente con linfoma no Hodgkin (NHL). El método comprende obtener células tumorales del paciente, cultivar las células en presencia o ausencia de un compuesto inmunomodulador, medir la expresión de SPARC en las células tumorales, y comparar los niveles de expresión de SPARC en células tumorales cultivadas en presencia de un compuesto inmunomodulador con aquellos en células tumorales cultivadas en ausencia de un compuesto inmunomodulador, en donde un nivel aumentado de la expresión de SPARC en presencia de un compuesto inmunomodulador indica la probabilidad de una respuesta tumoral del paciente eficaz al compuesto inmunomodulador.

- 55 En otra realización, se proporciona un método para controlar la respuesta tumoral al tratamiento en un paciente con linfoma no Hodgkin (NHL). El método comprende obtener una muestra biológica del paciente, medir la expresión de SPARC en la muestra biológica, administrar un compuesto inmunomodulador al paciente, obteniendo después una segunda muestra biológica del paciente, medir la expresión de SPARC en la segunda muestra biológica, y comparar los niveles de expresión de SPARC, en donde un nivel aumentado de la expresión de SPARC después de

tratamiento indica la probabilidad de una respuesta tumoral eficaz.

5 En otra realización más, se proporciona un método para controlar la observancia del paciente con un protocolo de tratamiento con fármaco. El método comprende obtener una muestra biológica del paciente, medir el nivel de expresión de al menos uno de p21, D1 o SPARC en la muestra, y determinar si el nivel de expresión es mayor o menor en la muestra del paciente comparado con el nivel de expresión en una muestra de control no tratada, en donde una expresión mayor o menor indica la observancia del paciente con el protocolo de tratamiento con fármaco. En una realización, la expresión de p21 o SPARC es mayor.

10 La expresión controlada puede ser, por ejemplo, la expresión de ARNm o la expresión de proteína. La expresión en la muestra tratada puede aumentar, por ejemplo, en aproximadamente 1,5X, 2,0X, 3X, 5X, o más. El compuesto inmunomodulador es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina.

15 Se describe en la presente memoria un método para predecir la sensibilidad al tratamiento con un compuesto inmunomodulador en un paciente con NHL, específicamente, un linfoma de células del manto (MCL). El método comprende obtener una muestra biológica del paciente, opcionalmente aislar o purificar el ARNm de la muestra biológica, amplificar los transcritos de ARNm, por ejemplo, por RT-PCR, donde un nivel basal mayor de ciclina D1 (evaluado, por ejemplo, determinando el número de ciclos al que la fluorescencia pasa el nivel umbral ("CT") de la expresión de ARNm de la ciclina D1) indica una probabilidad mayor de que el cáncer sea sensible al tratamiento con un compuesto inmunomodulador.

20 También se describe un kit útil para predecir la probabilidad de un tratamiento eficaz del NHL con un compuesto inmunomodulador. El kit comprende un soporte sólido, ácidos nucleicos en contacto con el soporte, donde los ácidos nucleicos son complementarios de al menos 20, 50, 100, 200, 350, o más bases de ARNm de ciclina D1, y un medio para detectar la expresión del ARNm en una muestra biológica.

25 En una realización adicional, se proporciona un kit útil para predecir la probabilidad de un tratamiento eficaz del NHL o para controlar la eficacia de un tratamiento con un compuesto inmunomodulador. El kit comprende un soporte sólido, al menos un ácido nucleico en contacto con el soporte, donde el ácido nucleico es complementario de al menos 20, 50, 100, 200, 350, 500 o más bases de ARNm de SPARC, y un medio para detectar la expresión del ARNm en una muestra biológica.

En una realización adicional, se proporciona un kit útil para predecir la probabilidad de un tratamiento eficaz del NHL o para controlar el tratamiento con un compuesto inmunomodulador. El kit comprende un soporte sólido y un medio para detectar la expresión de proteínas de al menos una de SPARC y p21 en una muestra biológica.

30 Dicho kit puede usar, por ejemplo, una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos, o una fibra óptica. El soporte sólido del kit puede ser, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, una capilar, una película, una placa o un portaobjetos. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un órgano, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, o una muestra de piel. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una biopsia de ganglio linfático, una biopsia de médula ósea, o una muestra de las células tumorales de sangre periférica.

4. Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 es una gráfica de barras que ilustra el efecto de los compuestos inmunomoduladores en la expresión de genes de VEGF, p21, p53 y ciclina D1 en células Rec-1. Las células se trataron con DMSO (control), compuesto inmunomodulador 1, 10 o 100 μ M, dexametasona (10 nM), o una combinación del compuesto inmunomodulador más dexametasona como se indica. Se muestra el número de veces de cambio en el nivel de expresión de ARNm.

La figura 1A ilustra el cambio en la expresión génica después de incubación con el compuesto inmunomodulador 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina durante 24 h.

45 La figura 1B ilustra el cambio en la expresión génica después de incubación con el compuesto inmunomodulador 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina durante 48 h.

La figura 1C ilustra el cambio en la expresión génica después de incubación con el compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina durante 24 h.

50 La figura 1D ilustra el cambio en la expresión génica después de incubación con el compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina durante 48 h.

La figura 2 es una gráfica de barras que ilustra el número de veces de cambio en la expresión génica de p21, activina A o SPARC en células Jeko-1 después de 24 h de incubación con DMSO (control), 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (1 μ M o 10 μ M), 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (1 μ M o 10 μ M), dexametasona (10 nM), o una combinación de 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (10

µM) o 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (10 µM) más dexametasona (10 nM).

La figura 3 ilustra que la sensibilidad de una línea celular de linfoma de células del manto específico (Rec-1, Jeko-1, Granta-519, o JVM-2) al compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina se correlaciona con un nivel basal (es decir, el nivel antes de tratamiento) de la expresión génica alta de la ciclina D1.

5 La figura 4 es un conjunto de gráficas de barras que comparan el efecto del compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina en la proliferación celular y expresión de SPARC en diferentes líneas celulares.

10 La figura 4A demuestra el efecto de una incubación de 3 días con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (0,1 µM, 1 µM, 10 µM o 100 µM) en la inhibición de la proliferación celular en diferentes líneas celulares. Los resultados (por línea celular) están clasificados (de izquierda a derecha) de los más sensibles a los menos sensibles a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina.

15 La figura 4B demuestra la expresión génica de SPARC (en unidades relativas) después de 1 día de incubación con el compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (1 µM o 10 µM). Los resultados están clasificados por línea celular, desde el mayor (izquierda) al menor (derecha) aumento de la expresión relativa de SPARC.

La figura 5 es un conjunto de gráficas de líneas que demuestran el efecto de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina sola en la proliferación de diferentes células de NHL (n = 2-6): Fig. 5A: Namalwa; Fig. 5B: Granta-519; Fig. 5C: REC-1; Fig. 5D: JVM-2; Fig. 5E: Keko-1; y Fig. 5F: DB.

20 La figura 6 son un par de gráficas de líneas que demuestran que la sinergia entre la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina y la dexametasona reduce la viabilidad de células Jeko-1 deteniendo el ciclo celular en la fase G0/G1 (figura 6A) y promoviendo la apoptosis (figura 6B).

La figura 7 es una gráfica de líneas que demuestra que la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina inhibe la producción del factor de crecimiento proangiogénico VEGF de células de NHL sensibles (n = 2-3).

25 La figura 8 es una gráfica de líneas de demuestra el efecto de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina en el crecimiento de células Rec-1 en presencia de rhVEGF o anticuerpo anti-VEGF (n = 2).

La figura 9 es un conjunto de gráficas de barras que demuestran el análisis de RT-PCR en tiempo real de la expresión génica (Fig. 9A: SPARC y Fig. 9B: p21) en células NHL tratadas con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina durante 24 h.

30 La figura 10 es una gráfica de barras que demuestra el efecto sinérgico de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina y la dexametasona en la regulación por aumento de la expresión de SPARC y p21 cip/kip en células Namalwa 48 h después de inicio de tratamiento con fármaco.

La figura 11 es un análisis cinético en el tiempo de la expresión génica en células Namalwa con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina 10 µM durante 2-48 h.

35 La figura 12 son una pareja de gráficas de barras que demuestran que la inactivación génica de SPARC (fig. 12A) deteriora el efecto antiproliferativo de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina en células Namalwa (Fig. 12B).

5. Descripción detallada

40 Lo que se proporciona en la presente memoria se basa, en parte, en el descubrimiento de que la presencia y el nivel de determinados ARNm o proteínas en muestras celulares, se pueden usar como biomarcadores para indicar la eficacia o progreso de un tratamiento de una enfermedad. En particular, estos biomarcadores de ARNm o proteína se pueden usar para predecir, evaluar y seguir la eficacia del tratamiento del paciente con diferentes compuestos inmunomoduladores.

45 Sin estar limitado por una teoría particular, los compuestos inmunomoduladores pueden mediar la inhibición del crecimiento, apoptosis e inhibición de factores angiogénicos en algunos tipos de cáncer tales como el NHL. Tras examinar la expresión de varios genes relacionados con el cáncer en varios tipos de células antes y después del tratamiento con un compuesto inmunomodulador, se descubrió que los niveles de expresión de varios genes o proteínas relacionados con el cáncer se pueden usar como biomarcadores para predecir y controlar los tratamientos del cáncer.

5.1. Definiciones

50 Como se usa en la presente memoria, y salvo que se especifique otra cosa, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a una acción que se produce mientras un paciente padece un cáncer especificado, que reduce la gravedad del cáncer o retarda o ralentiza el avance del cáncer.

5 Los términos “sensibilidad” y “sensible” cuando se usan en referencia al tratamiento con un compuesto inmunomodulador son un término relativo que se refiere al grado de eficacia del compuesto inmunomodulador en la reducción o disminución del avance de un tumor o de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, la expresión “mayor sensibilidad” cuando se usa en referencia al tratamiento de una célula o tumor en relación con un compuesto inmunomodulador se refiere a un aumento de al menos 5%, o más, de la eficacia del tratamiento del tumor.

10 Como se usa en la presente memoria, salvo que se especifique de otra forma, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de un cáncer, o retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la presencia del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión del cáncer. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” puede abarcar cualquier cantidad que mejore la terapia general, reduzca o evite síntomas o causas del cáncer, o potencie la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

15 Como se usa en la presente memoria, una “respuesta tumoral eficaz en el paciente” se refiere a cualquier aumento del beneficio terapéutico en el paciente. Una “respuesta tumoral eficaz en el paciente” puede ser, por ejemplo, una disminución de 5%, 10%, 25%, 50% o 100% en la velocidad de avance del tumor. Una “respuesta tumoral eficaz en el paciente” puede ser, por ejemplo, una disminución de 5%, 10%, 25%, 50% o 100% de los síntomas físicos de un cáncer. Una “respuesta tumoral eficaz en el paciente” también puede ser, por ejemplo, un aumento de 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200% o más de la salud general del paciente, medido por cualquier medio adecuado, tal como la expresión génica, recuentos de células, resultados de ensayos, etc.

20 El término “probabilidad” en general se refiere a un aumento de la probabilidad de un suceso. El término “probabilidad” cuando se usa en referencia a la eficacia de una respuesta tumoral de un paciente, en general contempla una mayor probabilidad de que disminuya la velocidad de avance de un tumor o el crecimiento de células tumorales. El término “probabilidad” cuando se usa en referencia a la eficacia de una respuesta tumoral de un paciente en general también puede significar el aumento de indicadores, tales como expresión de ARNm o proteína, que pueden poner de manifiesto un aumento del avance en el tratamiento del tumor.

25 El término “predecir” en general significa determinar o decir por adelantado. Cuando se usa para “predecir” la eficacia de un tratamiento de cáncer, por ejemplo, el término “predecir” puede significar que la probabilidad del resultado del tratamiento del cáncer se pueda determinar al principio, antes de que haya empezado el tratamiento, o antes de que el periodo de tratamiento haya avanzado sustancialmente.

30 El término “controlar”, como se usa en la presente memoria, en general se refiere a la inspección, supervisión, regulación, observación, seguimiento o vigilancia de una actividad. Por ejemplo, la expresión “controlar la eficacia de un compuesto inmunomodulador” se refiere a hacer el seguimiento de la eficacia en el tratamiento de un cáncer en un paciente o en un cultivo de células tumorales. Igualmente, el “control” cuando se usa en relación con la observancia de un paciente, sea de forma individual o en un ensayo clínico, se refiere al seguimiento o confirmación de que el paciente está realmente tomando el compuesto inmunomodulador que se está ensayando como se ha prescrito. El control se puede hacer, por ejemplo, siguiendo la expresión de biomarcadores de ARNm o proteínas tales como SPARC, ciclina D1 y p21.

35 Una mejora en el cáncer o enfermedad relacionada con el cáncer se puede caracterizar como una respuesta completa o parcial. La “respuesta completa” se refiere a una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anómalo, mediciones de la médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF) o proteínas monoclonales anómalas. La “respuesta parcial” se refiere a al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de disminución en toda la carga tumoral medible (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, o el volumen medido de masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anómala) en ausencia de nuevas lesiones. El término “tratamiento” contempla tanto una respuesta completa como parcial.

40 “Tumor”, como se usa en la presente memoria, se refiere a todo el crecimiento y proliferación celular neoplásicos, sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. “Neoplásico” como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier forma de crecimiento celular desregulado o no regulado, sea maligno o benigno, que da como resultado el crecimiento tisular anómalo. Por lo tanto, las “células neoplásicas” incluyen células malignas y benignas que tienen crecimiento celular desregulado o no regulado.

45 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a linfoma y leucemia y tumores sólidos.

50 Como se usa en la presente memoria, los términos “polipéptido” y “proteína” usados de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a un polímero de aminoácidos de 3 o más aminoácidos en una matriz seriada, unida por enlaces peptídicos. El término “polipéptido” incluye proteínas, fragmentos de proteínas, análogos de proteínas, oligopéptidos y similares. El término polipéptido como se usa en la presente memoria, también se puede referir a un péptido. Los aminoácidos que componen el polipéptido pueden ser de origen natural o sintéticos. Los polipéptidos de

ejemplo descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a SPARC, ciclina D1, p21 y similares. El polipéptido se puede purificar de una muestra biológica.

5 El término “anticuerpo” se usa en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre anticuerpos totalmente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno (p. ej., Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos), anticuerpos monocatenarios, fragmentos bivalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados y similares. El término “anticuerpo” cubre anticuerpos tanto policlonales como monoclonales.

10 El término “expresado” o “expresión” como se usa en la presente memoria, se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico de ARN al menos complementaria en parte con una región de una de las dos cadenas de ácido nucleico del gen. El término “expresado” o “expresión” como se usa en la presente memoria, se refiere también a la traducción de la molécula de ARN para dar una proteína, un polipéptido o una parte de los mismos.

15 Un ARNm que es “regulado por aumento” en general aumenta tras un tratamiento o afección dados. Un ARNm que es “regulado por disminución” en general se refiere a una disminución del nivel de expresión del ARNm en respuesta a un tratamiento o afección dados. En algunas situaciones, el nivel de ARNm puede permanecer sin cambiar tras un tratamiento o afección dados.

20 Un ARNm de una muestra de paciente se puede “regular por aumento” cuando se trata con un compuesto inmunomodulador, comparado con un control no tratado. Esta regulación por aumento, puede ser, por ejemplo, un aumento de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de ARNm de control comparativo.

Alternativamente, un ARNm puede ser “regulado por disminución” o expresado en un nivel inferior en respuesta a la administración de determinados compuestos inmunomoduladores u otros agentes. Un ARNm regulado por disminución puede estar presente, por ejemplo, en un nivel de aproximadamente 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 1% o menos del nivel de ARNm de control comparativo.

25 Igualmente, el nivel de un biomarcador polipéptido o proteína de una muestra de paciente puede aumentar cuando se trata con un compuesto inmunomodulador comparado con un control no tratado. Este aumento puede ser de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de proteína de control comparativo.

30 Alternativamente, el nivel de un biomarcador proteína puede disminuir en respuesta a la administración de determinados compuestos inmunomoduladores u otros agentes. Esta disminución puede estar presente, por ejemplo, en un nivel de aproximadamente 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 1% o menos del nivel de proteína de control comparativo.

35 La expresión “agente inmunomodulador” o “fármaco inmunomodulador” o “compuesto inmunomodulador” se refiere a una molécula o compuesto, tal como una molécula o fármaco pequeño, un agente, un péptido, o una proteína que puede alterar el sistema inmunitario de alguna forma. En algunas realizaciones, el término abarca una molécula o compuesto que puede inhibir la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF y COX-2 de monocitos inducida por LPS.

40 Los términos “determinar”, “medir”, “evaluar”, “valorar” y “ensayar” como se usan en la presente memoria, se refieren en general a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está o no presente. Estos términos incluyen determinaciones tanto cuantitativas como/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta. La “valoración de la presencia de” puede incluir determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.

45 Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan de forma intercambiable en la presente memoria, para describir un polímero de cualquier longitud compuesto de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos de forma sintética, que pueden hibridar con ácidos nucleicos naturales de una forma específica de la secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos naturales, p. ej., puede participar en interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Como se usa en la presente memoria en el contexto de una secuencia de polinucleótido, el término “bases” (o “base”) es sinónimo de “nucleótidos” (o “nucleótido”), es decir, la subunidad monómera de un polinucleótido. Los términos “nucleósido” y “nucleótido” se pretende que incluyan aquellos restos que contienen no solo las bases de purina y pirimidina conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que se han modificado. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas u otros heterociclos. Además, los términos “nucleósido” y “nucleótido” incluyen los restos que contienen no solo azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, p. ej., en donde uno o más de los grupos hidroxilo se sustituyen por átomos de halógeno o grupos alifáticos, o son funcionalizados como éteres, aminas o similares. “Análogos” se refiere a moléculas que tienen características estructurales reconocidas en la bibliografía como miméticos, derivados, que tienen estructuras análogas, u otros términos parecidos, e incluyen, por ejemplo, polinucleótidos que incorporan nucleótidos no naturales, miméticos de

nucleótidos tales como nucleósidos 2'-modificados, ácidos nucleicos peptídicos, fosfonatos de nucleósidos oligómeros, y cualquier polinucleótido que haya añadido grupos sustituyentes, tales como grupos protectores o restos conectores.

5 El término "complementario" se refiere a la unión específica entre polinucleótidos basada en la secuencia de los polinucleótidos. Como se usa en la presente memoria, un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido son complementarios si se unen entre sí en un ensayo de hibridación en condiciones restrictivas, p. ej., si producen un nivel dado o detectable de señal en un ensayo de hibridación. Las partes de polinucleótidos son complementarias entre sí, si siguen las reglas convencionales de emparejamiento de bases, p. ej., A se empareja con T (o U) y G se empareja con C, aunque puede haber regiones pequeñas (p. ej., menores de aproximadamente 3 bases) de emparejamientos erróneos, inserción o secuencia eliminada.

La expresión "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos se refiere a los restos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, y puede tener en cuenta adiciones, eliminaciones y sustituciones.

15 La expresión "identidad sustancial" u "homólogo" en sus diferentes formas gramaticales en el contexto de los polinucleótidos, en general significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad deseada, por ejemplo, al menos 60% de identidad, preferiblemente al menos 70% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90% e incluso más preferiblemente al menos 95%, comparado con una secuencia de referencia. Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones restrictivas.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "enlace" se puede usar en la presente memoria para indicar la unión directa o indirecta. En el contexto de las estructuras químicas, "enlace" (o "enlazado") puede referirse a la existencia de un enlace químico que une directamente dos restos o que une indirectamente dos restos (p. ej., por un grupo conector o cualquier otra parte intermedia de la molécula). El enlace químico puede ser un enlace covalente, un enlace iónico, un complejo de coordinación, enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals o apilamiento hidrófobo, o puede presentar características de múltiples tipos de enlaces químicos. En algunos casos, "enlace" incluye realizaciones donde la unión es directa y también realizaciones donde la unión es indirecta.

30 Los términos "aislado" y "purificado" se refieren al aislamiento de una sustancia (tal como ARNm o proteína) de modo que la sustancia comprende una parte sustancial de la muestra en la que reside, es decir, la mayor parte de la sustancia se encuentra típicamente en su estado natural o no aislado. Típicamente, una parte sustancial de la muestra comprende, p. ej., más de 1%, más de 2%, más de 5%, más de 10%, más de 20%, más de 50%, o más, normalmente hasta aproximadamente 90% - 100% de la muestra. Por ejemplo, una muestra de ARNm aislado típicamente puede comprender al menos aproximadamente 1% de ARNm total. Las técnicas para purificar polinucleótidos son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, electroforesis en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, separación por flujo, y sedimentación según la densidad.

35 El término "muestra" como se usa en la presente memoria se refiere a un material o mezcla de materiales, típicamente, aunque no necesariamente, en forma fluida, que contiene uno o más componentes de interés.

40 "Muestra biológica" como se usa en la presente memoria se refiere a una muestra obtenida de un sujeto biológico, que incluye muestra de tejido biológico u origen fluido, obtenido, logrado o recogido in vivo o in situ. Una muestra biológica también incluye muestras de una región de un sujeto biológico que contiene células o tejidos precancerosos o cancerosos. Dichas muestras pueden ser, pero no se limitan a órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de un mamífero. Las muestras biológicas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a lisato celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un órgano, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de piel, y similares. Las muestras biológicas preferidas incluyen, pero no se limitan a sangre entera, sangre parcialmente purificada, CMSP, biopsias de tejidos y similares.

El término "analito" como se usa en la presente memoria, se refiere a un componente conocido o desconocido de una muestra

50 La expresión "agente de captura" como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente que se une a un ARNm o proteína por una interacción que es suficiente para permitir que el agente se una y concentre el ARNm o proteína de una mezcla homogénea.

El término "sonda" como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente de captura que se dirige a una secuencia de biomarcador ARNm diana específica. Por consiguiente, cada sonda de un conjunto de sondas tiene un biomarcador ARNm diana respectivo. Un dúplex de sonda/ARNm diana es una estructura formada por hibridación de una sonda con su biomarcador ARNm diana.

55 La expresión "ácido nucleico" o "sonda de oligonucleótido" se refieren a un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria, tal como los biomarcadores ARNm proporcionados en la presente memoria, mediante uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente mediante emparejamiento de bases

- complementarias, normalmente a través de la formación de enlace de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (p. ej. A, G, C o T) o bases modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante un enlace distinto de un fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. El experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a
- 5 secuencias diana que carecen de la complementariedad completa con la secuencia sonda dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Las sondas preferiblemente están directamente marcadas con isótopos, por ejemplo, cromóforos, luminóforos, cromógenos, o indirectamente marcadas con biotina a la cual se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo de la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de un biomarcador ARNm diana de interés.
- 10 La expresión “condiciones de ensayo restrictivas” se refiere a condiciones que son compatibles para producir parejas de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo, sondas y ARNm diana, de suficiente complementariedad para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo, mientras que a la vez es en general incompatible con la formación de parejas de unión entre miembros de unión de insuficiente complementariedad para proporcionar la especificidad deseada. La expresión condiciones de ensayo restrictivas en general se refiere a la combinación de
- 15 condiciones de hibridación y lavado.
- Un “marcador” o un “resto detectable” en referencia a un ácido nucleico, se refiere a una composición que, cuando se une con un ácido nucleico, hace al ácido nucleico detectable, por ejemplo, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a
- 20 isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, enzimas, biotina, digoxigenina, haptenos y similares. Un “ácido nucleico o sonda de oligonucleótido marcado” en general es uno que está unido, sea covalentemente, mediante un conector o un enlace químico, o de forma no covalente, por enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, atracciones electrostáticas, interacciones hidrófobas o enlaces de hidrógeno, a un marcador de modo que la presencia del ácido nucleico o sonda se puede detectar detectando la presencia del marcador unido al ácido nucleico o sonda.
- 25 Las expresiones “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR”, como se usa en la presente memoria, se refiere en general a un procedimiento en donde pequeñas cantidades de un ácido nucleico, ARN y/o ADN, son amplificadas como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.683.195 de Mullis. En general, la información de la secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá, debe estar disponible, de modo que se puedan diseñar cebadores oligonucleótidos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas
- 30 opuestas del molde que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito del ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. Véase, en general, Mullis et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 51: 263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989).
- 35 La expresión “número de ciclos” o “CT” cuando se usa en la presente memoria en referencia a métodos de PCR, se refiere al número de ciclos de PCR al que el nivel de fluorescencia pasa un nivel umbral fijado dado. La medición del CT se puede usar, por ejemplo, para aproximar los niveles de ARNm en una muestra original. La medición del CT se usa a menudo en términos de puntuación “dCT” o “diferencia en el CT”, cuando se resta el CT de un ácido nucleico del CT de otro ácido nucleico.
- 40 Como se usa en la presente memoria, y salvo que se indique otra cosa, la expresión “ópticamente puro” significa una composición que comprende un isómero óptico de un compuesto y carece sustancialmente de otros isómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral, carecerá sustancialmente del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales, carecerá sustancialmente de otros diastereoisómeros del compuesto. Un
- 45 compuesto ópticamente puro típico comprende más de aproximadamente 80% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 20% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 90% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 10% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 95% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 5% en peso de los
- 50 otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 97% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 3% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, y lo más preferiblemente más de aproximadamente 99% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 1% en peso de los otros enantiómeros del compuesto.
- La práctica de las realizaciones proporcionadas en la presente invención usará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología e inmunología, que están en la experiencia de los que
- 55 trabajan en la técnica. Dichas técnicas están explicadas con detalle en la bibliografía. Ejemplos de textos particularmente adecuados para consultar, incluyen los siguientes: Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual* (2d ed.); D.N Glover, ed. (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; M.J. Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Transcription and Translation*; R.I. Freshney, ed. (1986) *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London);
- 60

Scopes (1987) *Protein Purification: Principles and Practice* (2ª ed.; Springer Verlag, N. Y.); y D.M. Weir y C. C. Blackwell, eds. (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV.

5.2 Linfoma no Hodgkin

5 Los linfomas malignos son transformaciones neoplásicas de células que residen predominantemente en tejidos linfoides. Dos grupos de linfomas malignos son el linfoma Hodgkin y linfoma no Hodgkin (NHL). Ambos tipos de linfomas infiltran tejidos reticuloendoteliales. Sin embargo, difieren en el origen de la célula neoplásica, sitio de la enfermedad, presencia de síntomas sistémicos, y respuesta al tratamiento (Freedman et al, "Non-Hodgkin's Lymphomas" capítulo 134, *Cancer Medicine*, (una publicación aprobada de la American Cancer Society, B.C. Decker Inc., Hamilton, Ontario, 2003).

10 Los ejemplos de un tipo de linfoma, linfoma no Hodgkin, incluyen, pero no se limitan a linfoma/leucemia de células T del adulto (LLCTA), linfoma anaplásico de células grandes (LACG), linfoma nasal angiocéntrico de células T, linfoma angiocéntrico de células B pulmonares, linfoma angioinmunoblástico, linfoma de Burkitt (véase linfoma de células pequeñas no hendidas), linfoma centrocítico (véase linfoma de células del manto), linfoma cutáneo de células B, linfoma cutáneo de zona marginal (MZL), linfoma difuso de células grandes (DLBCL), linfoma difuso de células grandes y pequeñas mezcladas, linfoma difuso de células pequeñas hendidas, linfoma linfocítico pequeño difuso, linfoma de células T tipo enteropatía, linfoma de células B de zona marginal extranodal, linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma folicular, linfoma folicular de células pequeñas hendidas (grado 1), de células grandes y pequeñas hendidas mezcladas foliculares (grado 2), células grandes foliculares (grado 3), difuso de células pequeñas hendidas, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma inmunoblástico, linfoma de diferenciación intermedia, linfoma intestinal de células T, linfoma intravascular de células B grandes, linfomatosis intravascular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma de células grandes (LCG), linfoma linfoblástico, granulomatosis linfomatoide, linfoma MALT, linfoma de células del manto (LCM), linfoma de células B grandes del mediastino, linfoma de células B monocitoides, micosis fungoide, linfoma cutáneo de células T, linfoma de células NK, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de células T periféricas (LTP), linfoma de células T pleomórficas, trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), linfoma linfoblástico de células B precursoras, linfoma linfoblástico de células T precursoras, linfoma del sistema nervioso central (SNC) primario, linfoma primario cutáneo anaplásico de células grandes/papulosis linfomatoide (CD30+), linfoma de efusión primaria, linfoma primario mediastinal de células B, síndrome de Sézary, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células pequeñas no hendidas (SNCL), linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico, linfoma no Burkitt, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de células T subcutáneo paniculítico, linfoma histiocítico verdadero, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma linfoplasmacítico, y similares.

35 El linfoma de células del manto (LCM) es un tipo de linfoma no Hodgkin que representa aproximadamente 6% de todos los linfomas no Hodgkin de células B (B-NHL) (Jaffe, et al. ed., World health organization classification of tumours. Pathology and Genetics of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001). El LCM típicamente implica una translocación t(11;14)(q13;q32). Los pacientes con LCM a menudo tienen características tales como una variante morfológica blástica, mayor proliferación celular, eliminación del locus INK4a/ARF y mutación p53 o exceso de expresión de proteína (Campo et al, (1999) *Semin. Hematol.* 36:115-127). La enfermedad tiene una mediana de supervivencia de pacientes de 3 a 4 años. Varias de las líneas celulares descritas en la presente memoria, tales como Rec-1, Jeko-1, Granta-519, y JVM-2 son linfomas de células del manto.

5.3 Biomarcadores

45 Se proporcionan en la presente memoria métodos relacionados con el uso de ARNm o proteínas como biomarcadores para evaluar la eficacia de agentes inmunomoduladores. Los niveles de ARNm o proteína se pueden usar para determinar si un potencial agente inmunomodulador es probable que tenga éxito en los modelos celulares de enfermedad.

Un marcador biológico o "biomarcador" es una sustancia cuya detección indica un estado biológico particular, tal como, por ejemplo, la presencia de cáncer. En algunas realizaciones, los biomarcadores se pueden determinar individualmente, o se pueden medir simultáneamente varios biomarcadores.

50 En algunas realizaciones, un "biomarcador" indica un cambio en el nivel de expresión de ARNm que se puede correlacionar con el riesgo o avance de una enfermedad, o con la susceptibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado. En algunas realizaciones, el biomarcador es un ácido nucleico, tal como un ARNm o ADNc.

55 En realizaciones adicionales, un "biomarcador" indica un cambio en el nivel de expresión de polipéptido o proteína que se puede correlacionar con el riesgo, susceptibilidad al tratamiento o avance de una enfermedad. En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser un polipéptido o proteína, tal como SPARC, ciclina D1, p21 o un fragmento del mismo. El nivel relativo de proteínas específicas se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos basados en anticuerpos, tales como un ensayo de inmunotransferencia, análisis de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), u otros métodos.

5.3.1 Uso de ARNm de SPARC o proteína como un biomarcador como un indicador temprano (pronosticador) del

éxito del tratamiento

Basado, en parte, en el descubrimiento de que aumentos detectables de la expresión ARNm de SPARC son visibles en menos de 24 h después de la administración de un compuesto inmunomodulador en líneas celulares sensibles pero no en líneas celulares resistentes, los niveles de proteína o ARNm de SPARC se pueden usar como un biomarcador para predecir la sensibilidad de una célula de cáncer a un compuesto inmunomodulador.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el biomarcador proteína o ARNm de SPARC se puede usar para predecir la eficacia de un tratamiento inmunomodulador en un paciente. En una realización, el nivel de ARNm o proteína se mide en una muestra biológica obtenida de un potencial paciente. Después se administra directamente un compuesto inmunomodulador al paciente. Después de un determinado tiempo, tal como por ejemplo 24 h, se obtiene otra muestra, y se compara el nivel de biomarcador proteína o ARNm de SPARC con el nivel previo a la administración del compuesto, usando, por ejemplo, métodos basados en RT-PCR. Un aumento del nivel de expresión de SPARC después de administración indica la probabilidad de eficacia del tratamiento en el paciente.

Alternativamente, SPARC también se puede usar como un biomarcador para un ensayo in vitro para predecir el éxito de un tratamiento inmunomodulador, tomando una muestra de células de cáncer del paciente, cultivándolas en presencia o ausencia de un compuesto inmunomodulador, y ensayando en las células un aumento de la expresión de SPARC. Los pacientes que tienen muestras de células que presentan una expresión aumentada de SPARC en el ensayo basado en células, podrían entonces tratarse con un compuesto inmunomodulador.

5.3.2 Control del avance del tratamiento del paciente usando la expresión de proteína o ARNm de SPARC como un biomarcador

Además de la predicción inicial de la probabilidad de eficacia del tratamiento en un paciente con NHL, el progreso del tratamiento del cáncer con un compuesto inmunomodulador se puede seguir usando la expresión de SPARC como biomarcador. Por lo tanto, en algunas realizaciones se proporciona un método para evaluar o controlar la eficacia de un tratamiento mediante un compuesto inmunomodulador en un paciente. Se obtiene una muestra del paciente, y se mide el nivel de proteína o ARNm de SPARC para determinar si está presente en un nivel aumentado o disminuido comparado con el nivel antes de iniciar el tratamiento.

Los pacientes de NHL pueden enviar la muestra de células por cualquier medio deseado, tal como por ejemplo, una biopsia de ganglio linfático, biopsia de médula ósea, o de un tumor circulatorio. Las muestras se pueden tomar, por ejemplo, cada día, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada dos meses, trimestral o anualmente, según sea necesario para seguir la eficacia del tratamiento. En una realización, un aumento de la expresión de SPARC después de la administración indica que el protocolo de tratamiento es eficaz. En otra realización, una falta de aumento en la expresión de SPARC después de administración del compuesto inmunomodulador indica que el tratamiento puede no ser eficaz en el paciente particular, y que puede ser necesario seguir otros métodos de tratamiento. Mediante el seguimiento del nivel de proteína o ARNm de SPARC, se puede controlar la eficacia del tratamiento a lo largo del tiempo.

Los biomarcadores basados en proteína o ARNm también se pueden usar para seguir y ajustar la eficacia del tratamiento de un paciente individual. Los biomarcadores basados en proteína o ARNm se pueden usar para obtener la información necesaria para hacer ajustes en el tratamiento de un paciente, aumentando o disminuyendo la dosis de un agente según sea necesario. Por ejemplo, se puede hacer el ensayo en un paciente que recibe un compuesto inmunomodulador, usando un biomarcador basado en proteína o ARNm de SPARC, para ver si la dosis está siendo eficaz, o si puede ser necesario un plan de tratamiento más agresivo.

5.3.3 Uso de ciclina D1 y p21 como biomarcadores predictivos

El nivel de ciclina D1 o p21 en diferentes tipos de células de cáncer permite la predicción de la probabilidad de un tratamiento con éxito con compuestos inmunomoduladores, tales como la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina, mediante el ensayo de una muestra biológica de un paciente y comparando los niveles basales de expresión de proteína o gen de ciclina D1 y/o p21. Por lo tanto, los ARNm se pueden usar como biomarcadores para predecir la sensibilidad al tratamiento del cáncer por administración de compuestos inmunomoduladores. En particular, se pueden usar los niveles de p21 y ciclina D1 para determinar si es probable que un potencial agente inmunomodulador tenga éxito en el tratamiento de determinados tipos de cáncer, tales como el NHL (p. ej., LCM). Por lo tanto, como se describe en la presente memoria, un nivel basal más alto de ciclina D1 se correlaciona con una probabilidad mayor de sensibilidad aumentada a los compuestos inmunomoduladores tales como la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (figura 3).

En algunas realizaciones, el nivel de p21 se determina evaluando la expresión de su gen, p. ej. ARNm. En algunas realizaciones, la expresión del gen se mide simplemente como el tiempo de ciclo de la PCR para alcanzar una fluorescencia umbral o "CT".

En otras realizaciones, el nivel de p21 se determina evaluando el nivel de la propia proteína. El nivel de proteína se puede medir usando cualquier método de cuantificación de proteínas bien conocido en la técnica, p. ej., ELISA.

En algunas realizaciones, la expresión de p21 se puede usar como biomarcadores para controlar el progreso de la eficacia del tratamiento en pacientes de NHL que están recibiendo el tratamiento con compuestos inmunomoduladores. Dicho control comprende comparar el nivel de p21 de una muestra obtenida después del tratamiento con la de muestras de control obtenidas antes del tratamiento o sin el tratamiento de otro sujeto.

5 5.3.4 Control de la observancia del paciente usando la expresión de proteína o ARNm de p21, ciclina D1 y SPARC como biomarcador

Los biomarcadores proteínas o ARNm de p21, ciclina D1 y SPARC se pueden usar además para el seguimiento o para realizar un control de calidad en ensayos de investigación humanos o para controlar la observancia del paciente a un régimen con fármacos, proporcionando un medio para confirmar que el paciente está recibiendo tratamientos con fármacos específicos. Estos biomarcadores se pueden usar en relación, por ejemplo, con la gestión del tratamiento de pacientes, ensayos clínicos e investigaciones basadas en células.

En una realización, los biomarcadores basados en proteína o ARNm de p21 y SPARC se pueden usar para el seguimiento de la observancia de un paciente durante regímenes de tratamiento individuales o durante ensayos clínicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un método para evaluar la observancia del paciente con un protocolo de tratamiento con fármaco. Se obtiene una muestra biológica del paciente, y se miden los niveles de al menos uno de proteína o ARNm de p21 o SPARC, y se comparan con los de una muestra de control no tratada. Un nivel de expresión alterado del biomarcador proteína o ARNm comparado con el de una muestra de control no tratada, indica observancia del protocolo.

Por ejemplo, la expresión de la proteína o ARNm de SPARC se puede seguir en intervalos fijos durante un ensayo clínico para asegurar que los pacientes incluidos en el ensayo están tomando los fármacos como se les ha enseñado. También se puede seguir el tratamiento de pacientes individuales usando el procedimiento. Por ejemplo, cuando se mide al menos uno de la proteína o ARNm de p21 o SPARC, un nivel alterado del biomarcador comparado con el de un control no tratado indica al menos una observancia parcial del paciente del protocolo de tratamiento con fármaco. Un nivel alterado del biomarcador proteína o ARNm que los es en una cantidad similar a la de un control positivo indica la probabilidad de observancia completa del protocolo de tratamiento.

5.4 Compuestos inmunomoduladores

Los compuestos inmunomoduladores, incluyendo los compuestos conocidos como "IMiDs"® (Celgene Corporation), son un grupo de compuestos que pueden ser útiles para tratar varios tipos de enfermedades humanas, incluyendo algunos cánceres. Como se proporciona en la presente memoria, estos compuestos pueden ser eficaces en el tratamiento de NHL. En algunas realizaciones, se puede administrar un compuesto inmunomodulador a una muestra de células o a un paciente, y la eficacia del tratamiento se puede seguir usando biomarcadores proteínas o ARNm como se describe en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, y salvo que se indique otra cosa, la expresión "compuesto inmunomodulador" puede abarcar algunas moléculas orgánicas pequeñas que inhiben la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, y COX-2 de monocitos inducida por LPS. Estos compuestos se pueden preparar de forma sintética, o se pueden obtener en el comercio.

Los compuestos inmunomoduladores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil)-1,3-dioxoisindolin-4-il)metil]ciclopropil-carboxamida; 3-[2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-1,1-dimetil-urea; (-)-3-(3,4-Dimetoxi-fenil)-3-(1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propionamida; (+)-3-(3,4-Dimetoxi-fenil)-3-(1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-propionamida; (-)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfonietil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona}; (+)-{2-[1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-metilsulfonietil]-4-acetilaminoisoindolina-1,3-diona}; Difluoro-metoxi-SelCID; 1-ftalimido-1-(3,4-dietoxifenil)etano; 3-(3,4-dimetoxifenil)-3-(3,5-dimetoxifenil)acrilonitrilo; 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; 4-amino-2-(3-metil-2,6-dioxo-piperidin-3-il)-isoindol-1,3-diona; 3-(3-acetoamidofthalimido)-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)-N-hidroxipropionamida; 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilsisoindolina; ciclopropil-N-{2-[(1S)-1-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-(metilsulfonil)etil]-3-oxoisindolin-4-il}carboxamida; 2-(3-hidroxi-2,6-dioxopiperidin-5-il)isoindolina sustituida; N-[2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-ilmetil]-4-trifluorometoxibenzamida; (S)-4-cloro-N-((2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-1,3-dioxoisindolin-5-il)metil)benzamida; [2-[(3S)-3-metil-2,6-dioxo-piperidin-3-il]-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-5-ilmetil]-amida del ácido piridina-2-carboxílico; (S)-N-((2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-1,3-dioxoisindolin-5-il)metil)-4-(trifluorometil)benzamida; 3-(2,5-dimetil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona, y similares.

La citoquina inflamatoria TNF- α , que es producida por macrófagos y monocitos durante la inflamación aguda, produce una variedad diversa de sucesos de señalización dentro de las células. Sin estar limitados por ninguna teoría particular, uno de los efectos biológicos ejercidos por los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria, es la reducción de la producción de TNF- α de células mieloides. Los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria pueden potenciar la degradación del ARNm del TNF- α .

Además, sin querer estar limitados por la teoría, los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria también pueden ser potentes coestimuladores de linfocitos T y aumentar notablemente la proliferación de

células de una forma dependiente de la dosis. Los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria también pueden tener un mayor efecto coestimulador en el subconjunto de linfocitos T CD8+ que en el subconjunto de linfocitos T CD4+. Además, los compuestos pueden tener propiedades antiinflamatorias contra las respuestas de células mieloides, y todavía coestimular de forma eficaz los linfocitos T para producir mayores cantidades de IL-2, IFN- γ , y potenciar la proliferación de linfocitos T y la actividad citotóxica de linfocitos T CD8+.

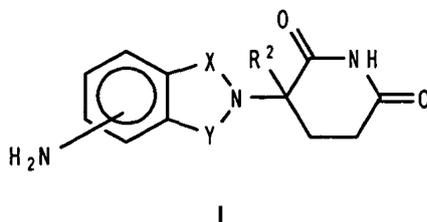
Además, sin estar limitados por ninguna teoría particular, los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria, pueden ser capaces de actuar tanto indirectamente a través de la activación de citoquinas como directamente en linfocitos citolíticos naturales ("NK") y linfocitos T citolíticos naturales ("NKT"), y aumentar la capacidad de las células NK para producir citoquinas beneficiosas tales como, pero no limitadas a IFN- γ , y potenciar la actividad citotóxica de células NK y NKT.

Los ejemplos específicos de compuestos inmunomoduladores incluyen derivados ciano y carboxi de estirenos sustituidos, como los descritos en la patente de EE.UU. n° 5.929.117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas tales como las descritas en las patentes de EE.UU. n° 5.874.448 y 5.955.476; las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetrasustituidas descritas en la patente de EE.UU. n° 5.798.368; 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas (p. ej., derivados 4-metilo de talidomida), 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindoles sustituidos incluyendo, pero no limitado a los descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.635.517, 6.281.230, 6.316.471, 6.403.613, 6.476.052 y 6.555.554; 1-oxo y 1,3-dioxoisoindolinas sustituidas en la posición 4- o 5- del anillo de indolina (p. ej., ácido 4-(4-amino-1,3-dioxoisoindolin-2-il)-4-carbamoilbutanoico) descritas en la en la patente de EE.UU. n° 6.380.239; isoindolina-1-ona e isoindolina-1,3-diona sustituida en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo (p. ej., 2-(2,6-dioxo-3-hidroxi-5-fluoropiperidin-5-il)-4-aminoisoindolin-1-ona) descritas en la en la patente de EE.UU. n° 6.458.810; una clase de amidas cíclicas no polipeptídicas descritas en las patentes de EE.UU. n° 5.698.579 y 5.877.200; y compuestos de isoindol-imida tales como los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n° 2003/0045552 publicada el 6 de marzo, 2003, publicación de patente de EE.UU. n° 2003/0096841 publicada el 22 de mayo, 2003, y solicitud internacional n° PCT/US01/50401 (publicación internacional n° WO 02/059106). La publicación de patente de EE.UU. n° 2006/0205787 describe composiciones de 4-amino-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-isoindol-1,3-diona. La publicación de patente de EE.UU. n° 2007/0049618 describe compuestos de isoindol-imida. En una realización, los compuestos inmunomoduladores no incluyen talidomida.

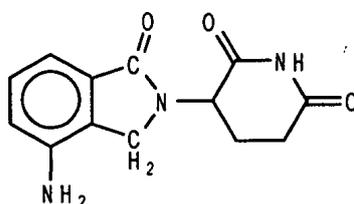
Varios compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria contienen uno o más centros quirales, y pueden existir como mezclas racémicas de enantiómeros o mezclas de diastereoisómeros. Por lo tanto, también se proporciona en la presente memoria el uso de formas estereoméricamente puras de dichos compuestos, así como el uso de mezclas de esas formas. Por ejemplo, se pueden usar mezclas que comprenden cantidades iguales o desiguales de los enantiómeros de un compuesto inmunomodulador particular. Estos isómeros se pueden sintetizar de forma asimétrica o resolver usando técnicas convencionales tales como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, p. ej., Jacques, J., et al, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

Los compuestos inmunomoduladores proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a 1-oxo-y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas sustituidas con amino en el anillo benzo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.635.517.

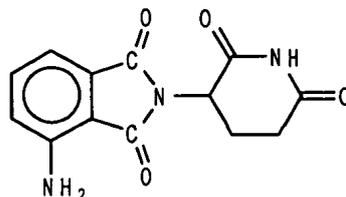
Estos compuestos tienen la estructura I:



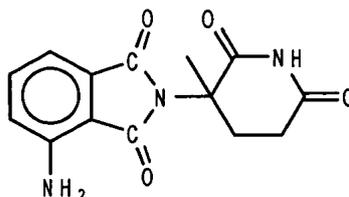
en la que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero no se limitan a:



1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina;



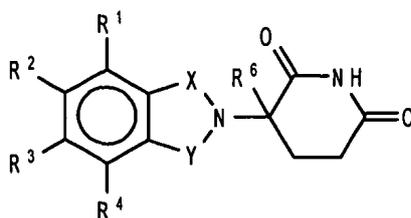
1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina; y



- 5 1,3-dioxo-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindol, e isómeros de los mismos ópticamente puros.

Los compuestos se pueden obtener por métodos sintéticos convencionales (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.635.517). Los compuestos también están disponibles en Celgene Corporation, Warren, NJ.

- 10 Otros compuestos inmunomoduladores específicos pertenecen a una clase de 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos, tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 6.281.230; 6.316.471; 6.335.349; y 6.476.052, y solicitud de patente internacional n° PCT/US97/13375 (publicación internacional n° WO 98/03502). Los compuestos representativos son de fórmula:



en la que:

uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂;

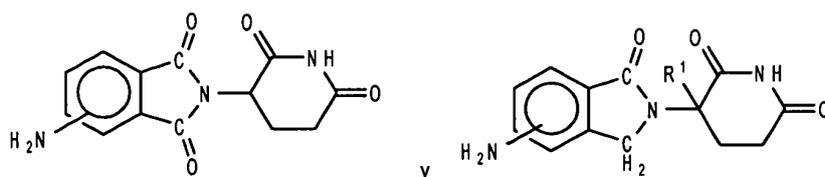
- 15 (i) cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente entre sí, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo o halógeno;

- 20 con la condición de que R⁶ es distinto de hidrógeno si X e Y son C=O, y (i) cada uno de R¹, R², R³ y R⁴ es fluoro, o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es amino.

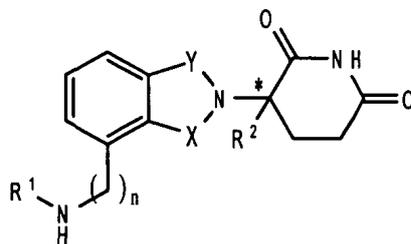
Compuestos representativos de esta clase son de fórmulas:



en las que R¹ es hidrógeno o metilo. En una realización separada, se proporciona en la presente memoria el uso de formas enantioméricamente puras (p. ej., enantiómeros (R) o (S) ópticamente puros) de estos compuestos.

- 25 Otros compuestos inmunomoduladores específicos más descritos en la presente memoria pertenecen a una clase de isindol-imidas descritas en la patente de EE.UU. n° 7.091.353, publicación de patente de EE.UU. n°

2003/0045552, y solicitud internacional nº PCT/USO 1/50401 (publicación internacional nº WO 02/059106). Los compuestos representativos son de fórmula II:



II

- 5 y sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereoisómeros, racematos farmacéuticamente aceptables, y mezclas de estereoisómeros de los mismos, en donde:

uno de X e Y es C=O, y el otro es CH₂ o C=O;

- 10 R¹ es H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} o alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

R² es H, F, bencilo, alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), o alquinilo (C₂-C₈);

R³ y R^{3'} son independientemente alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵;

- 15 R⁴ es alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), alquil(C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), o alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅);

R⁵ es alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, o heteroarilo (C₂-C₅);

cada vez que aparece R⁶ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo (C₂-C₅), o alquil(C₀-C₈)-C(O)O-R⁵ o los grupos R⁶ pueden unirse para formar un grupo heterocicloalquilo;

- 20 n es 0 o 1; y

* representa un centro de carbono quiral.

En compuestos específicos de fórmula II, cuando n es 0, entonces R¹ es cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), C(O)R³, C(O)OR⁴, alquil(C₁-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, C(S)NHR³, o alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵;

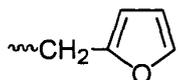
- 25 R² es H o alquilo (C₁-C₈); y

R³ es alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alquenilo (C₂-C₈), alquinilo (C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₅-C₈)-N(R⁶)₂; alquil(C₀-C₈)-NH-C(O)O-R⁵; alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵; y las otras variables tienen las mismas definiciones.

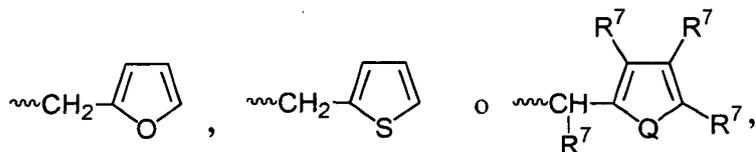
- 30 En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo (C₁-C₄).

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es alquilo (C₁-C₈) o bencilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H, alquilo (C₁-C₈), bencilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃, o



En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es



5 en donde Q es O o S, y cada vez que aparece R⁷ es independientemente H, alquilo (C₁-C₈), cicloalquilo (C₃-C₇), alqueno (C₂-C₈), alquino (C₂-C₈), bencilo, arilo, halógeno, alquil(C₀-C₄)-heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₀-C₈)-N(R⁶)₂, alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵, o C(O)OR⁵, o los casos de R⁷ que están adyacentes se pueden considerar juntos para formar un anillo de alquilo o arilo bicíclico.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)R³.

10 En otros compuestos específicos de fórmula II, R³ es alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquilo (C₁-C₈), arilo, o alquil(C₀-C₄)-OR⁵.

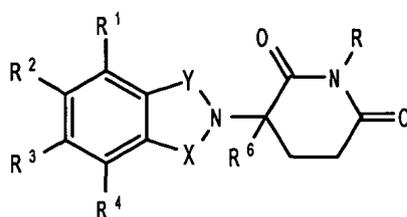
En otros compuestos específicos de fórmula II, el heteroarilo es piridilo, furilo o tienilo.

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)R⁴.

En otros compuestos específicos de fórmula II, el H de C(O)NHC(O) se puede sustituir por alquilo (C₁-C₄), arilo, o bencilo.

15 Los ejemplos adicionales de compuestos de esta clase incluyen, pero no se limitan a: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-amida; éster *terc*-butilico del ácido (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-carbámico; 4-(aminometil)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona; N-(2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-acetamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)ciclopropil-carboxamida; 2-cloro-N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)acetamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil}piridilcarboxamida; 3-{1-oxo-4-(bencilamino)isoindolin-2-il}piperidina-2,6-diona; 2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-4-(bencilamino)isoindolina-1,3-diona; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)propanamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)-3-piridilcarboxamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)heptanamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)-2-furilcarboxamida; acetato de {N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)carbamoil}metilo; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)pentanamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-2-tienilcarboxamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil){butilamino}carboxamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil){octilamino}carboxamida; y N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil){bencilamino}carboxamida.

30 Otros compuestos inmunomoduladores específicos más descritos en la presente memoria pertenecen a una clase de isoindol-imidas descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° US 2002/0045643, publicación internacional n° WO 98/54170, y patente de EE.UU. n° 6.395.754. Los compuestos representativos son de fórmula III:



III

35 y sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereoisómeros, racematos farmacéuticamente aceptables, y mezclas de estereoisómeros de los mismos, en donde:

uno de X e Y es C=O, y el otro es CH₂ o C=O;

R es H o CH₂OCOR';

40 (i) cada uno de R¹, R², R³ o R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ o R⁴ es nitro o -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ o R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos

R⁶ hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluoro;

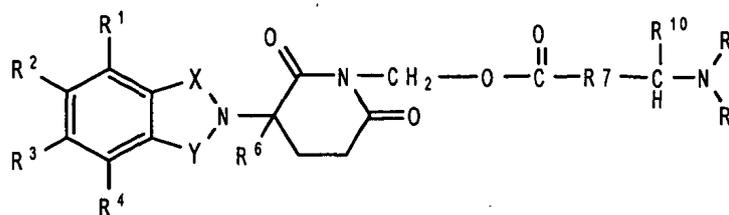
R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

5 R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(CnH2n)- en el que n tiene un valor de 0 a 4; cada uno de R⁸ y R⁹ considerados independientemente de los otros es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbonos, o R⁸ y R⁹ considerados juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S-, o -NH-;

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de hasta 8 átomos de carbono, o fenilo; y

*representa un centro de carbono quiral.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



10

en donde

uno de X e Y es C=O y los otros de X e Y es C=O o CH₂;

(i) cada uno de R¹, R², R³ o R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno;

15 R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono;

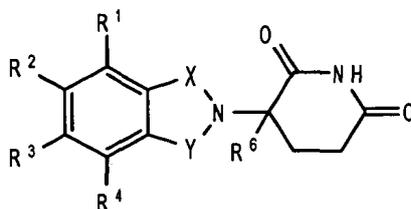
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro;

R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(CnH2n)- en el que n tiene un valor de 0 a 4;

20 cada uno de R⁸ y R⁹ considerado independientemente del otro, es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ considerados juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S-, o -NH-; y

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de hasta 8 átomos de carbono, o fenilo.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



en la que

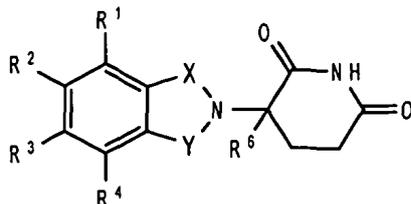
25 uno de X e Y es C=O y los otros de X e Y es C=O o CH₂;

cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es nitro o amino protegido y el resto de R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno; y

R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluoro.

30

Otros compuestos representativos son de fórmula:



en la que:

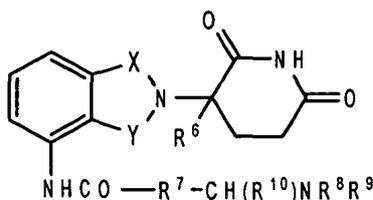
uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

- 5 (i) cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno;

R⁵ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹ en el que cada uno de R⁷, R⁸, R⁹ y R¹⁰ es como se define en la presente memoria; y

R⁶ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro, o fluoro.

- 10 Los ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



en la que:

uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

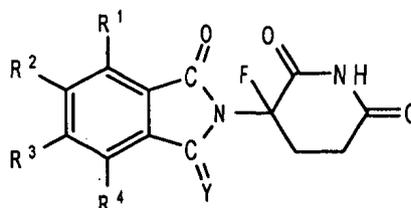
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, bencilo, cloro o fluoro;

- 15 R⁷ es m-fenileno, p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en el que n tiene un valor de 0 a 4;

cada uno de R⁸ y R⁹ considerado independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ considerados juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S- o -NH-; y

R¹⁰ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o fenilo.

- 20 Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas tales como las descritas en las patentes de EE.UU. nº 5.874.448 y 5.955.476. Los compuestos representativos son de fórmula:

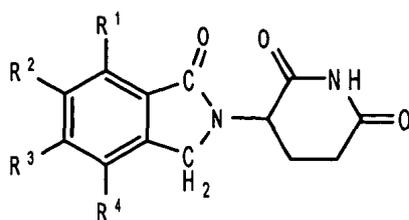


en donde:

- 25 Y es oxígeno o H₂ y

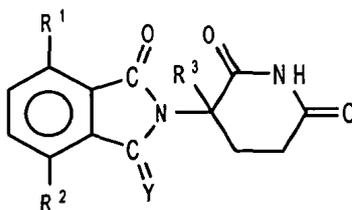
cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o amino.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetrasustituidas, descritas en la patente de EE.UU. nº 5.798.368. Los compuestos representativos son de fórmula:



en donde cada uno de R^1 , R^2 , R^3 y R^4 , independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono.

- 5 Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas descritas en la patente de EE.UU. nº 6.403.613. Los compuestos representativos son de fórmula:



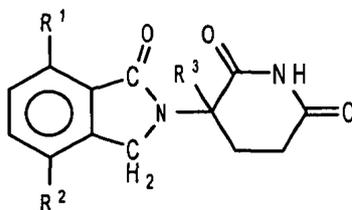
en la que

Y es oxígeno o H_2 ,

- 10 un primero de R^1 y R^2 es halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano o carbamoilo, el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano o carbamoilo, y

R^3 es hidrógeno, alquilo o bencilo.

Los ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



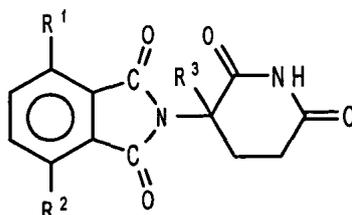
- 15 en donde:

un primero de R^1 y R^2 es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano, o carbamoilo;

- 20 el segundo de R^1 y R^2 , independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que el alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano o carbamoilo; y

R^3 es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



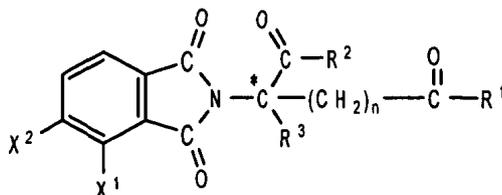
- 25 en la que:

un primero de R¹ y R² es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano o carbamoilo;

5 el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que el alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano o carbamoilo; y

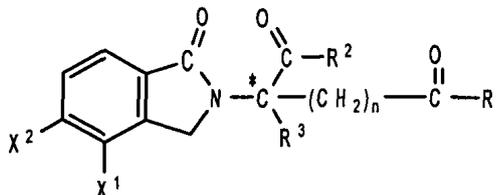
R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o bencilo.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos descritos en la presente memoria son las 1-oxo y 1,3-dioxoisindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina descritas en la patente de EE.UU. nº 6.380.239 y patente de EE.UU. nº 7.244.759. Los compuestos representativos son de fórmula:



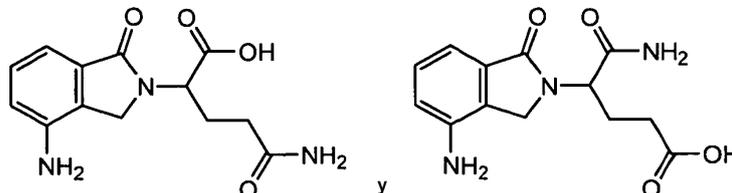
10 en la que el átomo de carbono designado C* constituye un centro quiral (cuando n no es cero y R¹ no es el mismo que R²); uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de 1 a 6 carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 carbonos, halógeno, o halogenoalquilo; Z es hidrógeno, arilo, alquilo de 1 a 6 carbonos, formilo, o acilo de 1 a 6 carbonos; y n tiene un valor de 0, 1 o 2; con la condición de que si X¹ es amino, y n es 1 o 2, entonces R¹ y R² no son ambos hidroxilo; y las sales de los mismos.

Los compuestos representativos adicionales son de fórmula:

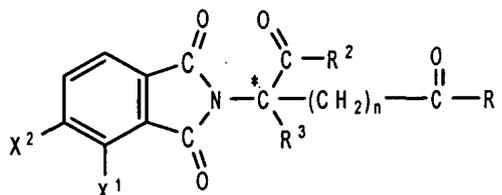


20 en la que el átomo de carbono designado C* constituye un centro quiral cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de 1 a 6 carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo de 1 a 6 carbonos, halógeno, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo o un alquilo o acilo de 1 a 6 carbonos; y n tiene un valor de 0, 1 o 2.

25 Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a ácido 2-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico y ácido 4-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-carbamoil-butírico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y sales, solvatos, profármacos y estereoisómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables:



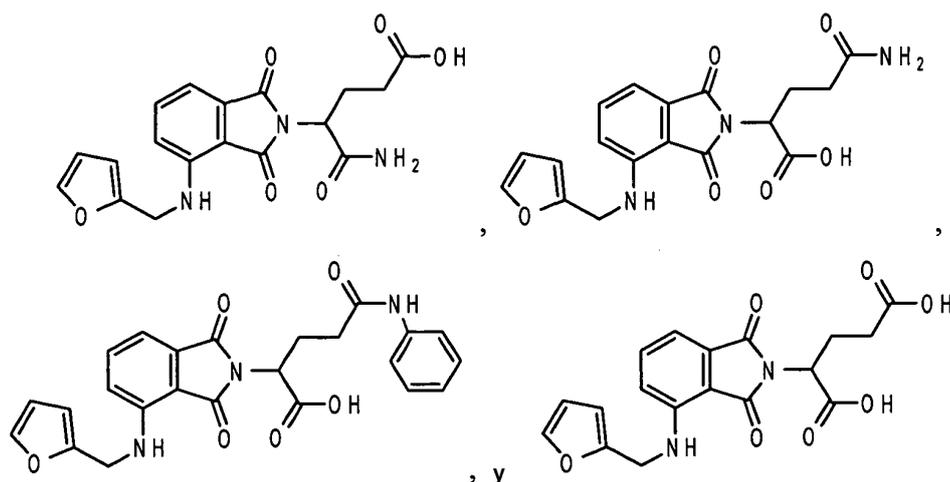
Otros compuestos representativos son de fórmula:



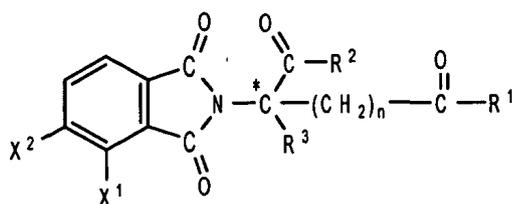
en la que el átomo de carbono designado C* constituye un centro quiral cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de

X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de 1 a 6 carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo de 1 a 6 carbonos, halógeno, o hidrógeno; Z es hidrógeno, arilo o un alquilo o acilo de 1 a 6 carbonos; y n tiene un valor de 0, 1 o 2; y las sales de los mismos.

- 5 Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a ácido 4-carbamoyl-4-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 4-carbamoyl-2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-4-fenilcarbamoyl-butírico y ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-pentanedioico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y sales, solvatos, profármacos y estereoisómeros de los mismos farmacéuticamente aceptables:



- 10 Otros ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



en donde:

uno de X¹ y X² es nitro, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno;

cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;

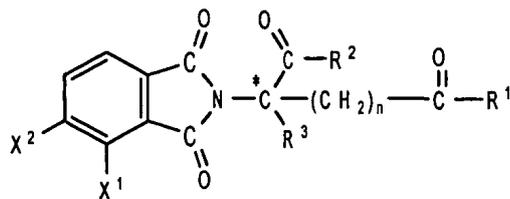
- 15 R³ es alquilo de 1 a 6 carbonos, halógeno o hidrógeno;

Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de 1 a 6 carbonos, o un alquilo de 1 a 6 carbonos; y

n tiene un valor de 0, 1 o 2; y

si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono designado C* constituye un centro quiral.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



- 20

en donde:

uno de X¹ y X² es alquilo de 1 a 6 carbonos;

cada uno de R¹ y R², independientemente del otro, es hidroxilo o NH-Z;

R³ es alquilo de 1 a 6 carbonos, halógeno, o hidrógeno;

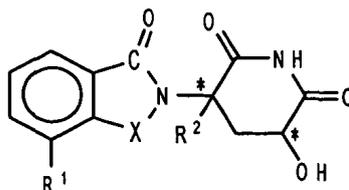
Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de 1 a 6 carbonos, o un alquilo de 1 a 6 carbonos; y

n tiene un valor de 0, 1 o 2; y

si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono designado C* constituye un centro quiral.

- 5 Otros compuestos inmunomoduladores específicos más son la isoindolina-1-ona y la isoindolina-1,3-diona sustituidas en la posición 2 con 2,6-dioxo-3-hidroxipiperidin-5-ilo descritas en la patente de EE.UU. n° 6.458.810.

Compuestos representativos son de fórmula:



en donde:

- 10 los átomos de carbono designados con * constituyente centros quirales;
 X es -C(O)- o -CH₂-;
 R¹ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o -NHR³;
 R² es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o halógeno; y
 R³ es hidrógeno,
- 15 alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,
 cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,
 fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,
- 20 bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o -COR⁴ en el que
 R⁴ es hidrógeno,
 alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,
- 25 cicloalquilo of 3 to 18 átomos de carbono,
 fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o
 bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino, o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono.
- 30 Todos los compuestos descritos se pueden adquirir en el comercio o se pueden preparar según los métodos descritos en las patentes o publicaciones de patentes descritas en la presente memoria. Además, los compuestos ópticamente puros se pueden sintetizar de forma asimétrica o se pueden resolver usando agentes de resolución conocidos o columnas quirales, así como otras técnicas de química orgánica sintética convencionales. Se puede encontrar información adicional sobre compuestos inmunomoduladores, su preparación y uso, por ejemplo, en las
- 35 publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° US20060188475, US20060205787 y US20070049618.

Los compuestos pueden ser moléculas orgánicas pequeñas que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 1.000 g/mol, y no son proteínas, péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos u otras macromoléculas.

- 40 Debe indicarse que si hay una discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado a esa estructura, se le concede más peso a la estructura representada. Además, si la estereoquímica de una estructura o una parte

de una estructura no está indicada, por ejemplo, con líneas en negrilla o a trazos, debe interpretarse que la estructura o parte de la estructura abarca todos los estereoisómeros de la misma.

5.4.1 Métodos de administración de compuestos inmunomoduladores

5 Se puede usar cualquier vía de administración de un compuesto inmunomodulador. Por ejemplo, un compuesto inmunomodulador se puede administrar por vía oral, parenteral, intravenosa, transdérmica, intramuscular, rectal, sublingual, mucosa, nasal, u otros medios. Además, los compuestos inmunomoduladores se pueden administrar en una forma de composición farmacéutica y/o forma farmacéutica unitaria. Las formas farmacéuticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a cápsulas, comprimidos (incluyendo comprimidos de disolución rápida y de liberación retardada), polvos, jarabes, suspensiones y soluciones orales para administración parenteral. Los métodos de administración adecuados para compuestos inmunomoduladores, así como las formas farmacéuticas y composiciones farmacéuticas adecuadas, se pueden encontrar en las publicaciones de solicitudes de patentes de EE.UU. nº US20060188475, US20060205787 y US20070049618.

15 La cantidad específica del agente dependerá del agente específico usado, el tipo de enfermedad o trastorno que se va a tratar o gestionar, y la(s) cantidad(es) de un compuesto inmunomodulador proporcionado en la presente memoria y cualquier agente adicional opcional administrado simultáneamente al paciente. Las formas farmacéuticas típicas comprenden un compuesto inmunomodulador o una sal, solvato, estereoisómero o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 150 mg. En particular, las formas farmacéuticas comprenden un compuesto inmunomodulador o una sal, solvato, estereoisómero o profármaco del mismo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20, 25, 50, 100, 150 o 200 mg. En una realización particular, una forma farmacéutica comprende 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 10, 25 o 50 mg.

25 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria también pueden contener uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Véase, p. ej., Rowe et al., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4^a Ed. (2003).

30 En algunas realizaciones, se administra un compuesto inmunomodulador a un sujeto aproximadamente 3 meses, 30 días, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 7 días, 5 días, 3 días, 1 día, 12 horas, o 5 horas antes del ensayo de los niveles de biomarcador ARNm o proteína. En otras realizaciones, se administra un compuesto inmunomodulador de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 30 días, de 30 días a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 20 días a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 15 días a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 días a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 5 días a aproximadamente 1 día, de aproximadamente 3 días a aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 3 días a aproximadamente 1 día antes del ensayo de los niveles de biomarcador ARNm o proteína.

40 En algunas realizaciones, se proporciona en la presente memoria, el control basado en biomarcador ARNm o proteína tras la administración de mezcla racémica, isómero (R) ópticamente puro o isómero (S) ópticamente puro de 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona. En una realización específica, la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona racémica se administra en una cantidad de 1, 2, 5, 10, o 25 mg por día. Puesto que se describe que el isómero (S) de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona tiene mayor potencia que la mezcla racémica, se puede dar una dosis menor cuando se usa el isómero (S). Por ejemplo, la (S)-4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona se puede administrar en una cantidad de 0,01, 0,1, 1, 2,5, 5, o 10 mg por día. El isómero (R) de la 4-(amino)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona se puede administrar en una cantidad comparable a la mezcla racémica.

45 Como se describe en la presente memoria, una forma farmacéutica comprende 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona en una cantidad de aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25 o 50 mg. También se proporciona en la presente memoria el uso de la mezcla racémica, el isómero (S) y el isómero (R) de 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona. Típicamente, la 3-(4-amino-1-oxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-piperidina-2,6-diona racémica se puede administrar en una cantidad de 1, 5, 10, 15, 25, o 50 mg por día. Los isómeros ópticos también se pueden administrar en una cantidad comparable a la mezcla racémica. Las dosis se pueden ajustar dependiendo del tipo de enfermedad o trastorno que se va a tratar, prevenir o gestionar, y la cantidad del compuesto inmunomodulador y cualquier agente adicional opcional administrado al paciente, que dependen todos del criterio del experto en la técnica.

5.5 Métodos de detección de niveles de ARNm o proteína en una muestra

55 Se puede usar cualquier método adecuado de detección de diferencias de niveles de biomarcadores ARNm o proteínas. En algunas realizaciones, el biomarcador que se va a detectar es una molécula de ARNm. En otras realizaciones, el método de medir la expresión del gen o proteína puede implicar métodos tales como hibridación de ADNc, citometría de flujo, inmunofluorescencia, inmunotransferencias, ELISA o ensayos de inmunofluorescencia de

anticuerpo en micromanchas puntuales, un ensayo de tira reactiva basada en anticuerpo, matrices de perlas citométricas, u otros métodos comunes de detección de ARNm o proteína.

5.5.1 Métodos de detección de niveles de ARNm en una muestra

5 Se conocen en la técnica varios métodos de detección o cuantificación de los niveles de ARNm. Los métodos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a transferencias Northern, ensayos de protección de ribonucleasa, métodos basados en PCR y similares. Cuando el biomarcador es una molécula de ARNm, se puede usar la secuencia de ARNm, p. ej., ARNm de SPARC, ciclina D1, p21, o un fragmento de las mismas, para preparar una sonda que es al menos parcialmente complementaria. La sonda se puede usar entonces para detectar la secuencia de ARNm en una muestra, usando cualquier ensayo adecuado, tal como métodos basados en PCR, transferencia Northern, un ensayo de tira reactiva, y similares.

10 En otras realizaciones, se puede preparar un ensayo de ácido nucleico para ensayar la actividad inmunomoduladora en una muestra biológica. Un ensayo típicamente contiene un soporte sólido, y al menos un ácido nucleico en contacto con el soporte, donde el ácido nucleico corresponde al menos a una parte de un ARNm que tiene la expresión alterada durante un tratamiento de inmunomodulador en un paciente, tal como ARNm de SPARC, ciclina D1 o p21. El ensayo también puede tener un medio para detectar la expresión alterada del ARNm en la muestra.

15 El método de ensayo se puede variar dependiendo del tipo de información del ARNm deseada. Los métodos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a transferencias Northern y métodos basados en PCR (p. ej., qRT-PCR). Métodos tales como la qRT-PCR también pueden cuantificar con precisión la cantidad de ARNm en una muestra.

20 Se puede usar cualquier plataforma de ensayo adecuada para determinar la presencia del ARNm en una muestra. Por ejemplo, un ensayo puede ser en forma de una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica. Un sistema de ensayo puede tener un soporte sólido sobre el que se une un ácido nucleico correspondiente al ARNm. El soporte sólido puede comprender, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, una capilar, una película, una placa o un portaobjetos. Los componentes del ensayo se pueden preparar y envasar juntos como un kit para detectar un ARNm.

25 El ácido nucleico se puede marcar, si se desea, para hacer una población de ARNm marcados. En general, una muestra se puede marcar usando métodos que son conocidos en la técnica (p. ej., usando ADN ligasa, transferasas terminales, o marcando la cadena principal de ARN, etc.; véase, por ejemplo, Ausubel, et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, 3^a ed., Wiley & Sons 1995 y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera edición, 2001 Cold Spring Harbor, N.Y.). En algunas realizaciones, la muestra se marca con un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a colorantes de xanteno, colorantes de fluoresceína, colorantes de rodamina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), 6-carboxifluoresceína (FAM), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA o T), 6-carboxi-X-rodamina (ROX o R), 5-carboxi-rodamina 6G (R6G5 o G5), 6-carboxi-rodamina 6G (R6G6 o G6), y rodamina 110; colorantes de cianina, p. ej. colorantes Cy3, Cy5 y Cy7; colorantes de Alexa, p. ej. Alexa-fluor-555; cumarina, dietilaminocumarina, umbeliferona; colorantes de benzimida, p. ej. Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, p. ej. Texas Red; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxazina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, colorantes BODIPY, colorantes de quinolina, Pireno, Clorotriazinil Fluoresceína, R110, Eosina, JOE, R6G, Tetrametilrodamina, Lissamina, ROX, Naftofluoresceína, y similares

30 En algunas realizaciones, las secuencias de ARNm comprenden al menos un ARNm seleccionado del grupo que consiste en ARNm de SPARC, ARNm de p21 o un fragmento de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en situaciones específicas dirigibles sobre un soporte sólido; correspondiendo cada uno a al menos una parte de las secuencias de ARNm que son expresadas de forma diferente tras el tratamiento de un compuesto inmunomodulador en una célula o un paciente.

35 Un método de ensayo de ARNm típico puede contener las etapas de 1) obtención de sondas objeto unidas a superficie; 2) hibridación de una población de ARNm con las sondas unidas a superficie en condiciones suficientes para proporcionar la unión específica, (3) lavados de post-hibridación para separar los ácidos nucleicos no unidos en la hibridación; y (4) detección de los ARNm hibridados. El reactivo usado en cada una de estas etapas y sus condiciones para usar pueden variar dependiendo de la aplicación particular.

40 La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de hibridación adecuadas, que pueden variar en la restricción según se desee. Las condiciones típicas son suficientes para producir complejos de sonda/diana en una superficie sólida entre miembros de unión complementarios, es decir, entre sondas objeto unidas a la superficie y ARNm complementarios en la muestra. En algunas realizaciones, se pueden usar condiciones de hibridación restrictivas.

45 La hibridación se lleva a cabo típicamente en condiciones de hibridación restrictivas. Las técnicas de hibridación convencionales (p. ej., en condiciones suficientes para proporcionar la unión específica de los ARNm diana en la muestra a las sondas) son descritas por Kallioniemi et al., *Science* 258:818-821 (1992) y en el documento WO

93/18186. Están disponibles varias guías para las técnicas generales, p. ej., Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Partes I y II (Elsevier, Amsterdam 1993). Para descripciones de técnicas adecuadas para la hibridación in situ, véase Gall et al. *Meth. Enzymol.*, 21 :470-480 (1981); y Angerer et al. en *Genetic Engineering: Principles and Methods* (Setlow and Hollaender, Eds.) Vol 7, págs 43-65 (Plenum Press, New York 1985). La selección de las condiciones adecuadas, incluyendo temperatura, concentración salina, concentración de polinucleótidos, tiempo de hibridación, restricción de las condiciones de lavado, y similares, dependerá del diseño experimental, incluyendo la fuente de la muestra, identidad de agentes de captura, grado de complementariedad esperada, etc., y los expertos en la técnica lo pueden determinar mediante experimentación rutinaria.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden usar condiciones de hibridación y lavado alternativas pero comparables, para proporcionar condiciones de restricción similares.

Después del procedimiento de hibridación de ARNm, los polinucleótidos unidos a la superficie típicamente se lavan para eliminar los ácidos nucleicos no unidos. El lavado se puede llevar a cabo usando cualquier protocolo de lavado conveniente, donde las condiciones de lavado típicamente son restrictivas, como se han descrito antes. Después, la hibridación de los ARNm diana con las sondas se detecta usando técnicas convencionales.

5.5.2 Métodos basados en PCR para detectar biomarcadores ARNm

También se pueden usar otros métodos, tales como métodos basados en PCR, para seguir la expresión de los biomarcadores SPARC o p21. Se pueden encontrar ejemplos de métodos de PCR en la bibliografía. Se pueden encontrar ejemplos de ensayos de PCR en la patente de EE.UU. n° 6.927.024. Se pueden encontrar ejemplos de métodos de RT-PCR en la patente de EE.UU. n° 7.122.799. Se describe un método de PCR in situ fluorescente en la patente de EE.UU. n° 7.186.507.

En algunas realizaciones, se puede usar la PCR con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR) tanto para la detección como la cuantificación de las dianas de ARN (Bustin, et al., 2005, *Clin. Sci.*, 109:365-379). Los resultados cuantitativos obtenidos por la qRT-PCR en general son más informativos que los datos cualitativos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los ensayos basados en qRT-PCR pueden ser más útiles para medir los niveles de ARNm durante los ensayos basados en células. El método de qRT-PCR también es útil para controlar la terapia del paciente. Se pueden encontrar ejemplos de métodos basados en qRT-PCR, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.101.663.

A diferencia de la PCR con transcriptasa inversa normal y análisis por geles de agarosa, la PCR en tiempo real da resultados cuantitativos. Una ventaja adicional de la PCR en tiempo real es la relativa facilidad y conveniencia de uso. Los instrumentos para la PCR en tiempo real, tales como Applied Biosystems 7500, están disponibles en el comercio, así como los reactivos, tales como TaqMan Sequence Detection chemistry. Por ejemplo, se puede usar TaqMan® Gene Expression Assays siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits son ensayos de expresión de genes preformulados para la detección rápida y fiable y la cuantificación de transcritos de ARNm humano, de ratón y rata. Un ejemplo de programa de PCR, por ejemplo, es 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, y después 60°C durante 1 min.

Para determinar el número de ciclos al que la señal de fluorescencia asociada con una acumulación de amplicón particular cruza el umbral (denominado CT), se pueden analizar los datos, por ejemplo, usando un software 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection v1.3 usando el método de cálculo de cuantificación relativo de CT comparativo. Usando este método, el resultado se expresa como un número de veces de cambio de los niveles de expresión. En algunas realizaciones, el nivel umbral se puede seleccionar para que sea determinado automáticamente por el software. En algunas realizaciones, el nivel umbral se ajusta para que esté por encima del nivel base pero suficientemente bajo para que esté dentro de la región de crecimiento exponencial de una curva de amplificación.

5.5.3 Métodos de detección de biomarcadores polipéptidos o proteínas

Cuando el biomarcador es una proteína, tal como proteína SPARC, ciclina D1 o p21, se pueden usar varios métodos de detección y cuantificación de proteínas para medir la presencia del biomarcador. Se puede usar cualquier método de cuantificación de proteína adecuado. En algunas realizaciones, se usan métodos basados en anticuerpos. Los métodos de ejemplo que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a inmunotransferencia (transferencia Western), ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), inmunohistoquímica, citometría de flujo, ensayo de perlas citométricas, espectrometría de masas, y similares. Se usan habitualmente varios tipos de ELISA, incluyendo ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA de tipo sándwich.

5.6 Muestras biológicas

Se puede usar cualquier muestra adecuada para evaluar los biomarcadores ARNm o proteínas proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la muestra biológica es sangre entera, sangre parcialmente purificada, un PBMC, una biopsia tisular, un extracto de ARN o proteína, un extracto celular, un lisato celular, una célula, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un tejido oral, un tejido gastrointestinal, un órgano, un órgano, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de piel, una pluralidad de muestras de un

ensayo clínico, o similares. En una realización, la muestra es una biopsia de un ganglio linfático, una biopsia de médula ósea, o una muestra de células tumorales de sangre periférica. La muestra puede ser una muestra bruta, o se puede purificar en varios niveles antes de almacenamiento, procesamiento o medición.

5 Se pueden tomar muestras para la evaluación de ARNm o proteína durante cualquier intervalo deseado. Por ejemplo, cada hora, dos veces al día, cada día, semanalmente, mensualmente, cada dos meses, anualmente, o similares. La muestra se puede ensayar inmediatamente, o se puede almacenar para el ensayo más tarde.

10 Las muestras se pueden purificar antes del ensayo. En algunas realizaciones, el ARNm o proteína se pueden aislar del contenido celular restante antes del ensayo. Se pueden tomar muestras de control de diferentes fuentes. En algunas realizaciones, se toman muestras de control del paciente antes del tratamiento. Un ensayo basado en células puede usar un cultivo celular de control, por ejemplo, que no se haya tratado con el compuesto de ensayo.

5.7 Selección de compuestos inmunomoduladores eficaces usando biomarcadores ARNm o proteínas

15 En algunas realizaciones, se puede obtener un método de selección de compuestos inmunomoduladores eficaces para tratar diferentes tipos de NHL, usando los métodos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, se elige y cultiva un tipo de célula de NHL. Se mide el nivel basal de proteína o ARNm de SPARC. La célula (o células) después se ponen en contacto con un candidato a fármaco, o una pluralidad de candidatos a fármacos. Después de un período de incubación para permitir que se produzca la expresión génica, se mide el nivel de proteína o ARNm de SPARC y se compara con el de una célula similar no tratada. Los niveles de proteína o ARNm se analizan para determinar si la muestra tratada presenta expresión de SPARC aumentada. Los candidatos a fármacos que presentan un patrón de expresión de SPARC aumentada después se pueden elegir para estudios posteriores para elucidar la actividad del compuesto candidato.

5.8 Kits para detectar biomarcadores ARNm

25 En algunas realizaciones, se puede preparar un kit para detectar los biomarcadores ARNm de SPARC y/o p21. Estos kits pueden incluir, por ejemplo, una sonda o conjunto de sondas que comprenden oligonucleótidos que se pueden unir al(a los) biomarcador(es) ARNm de interés para una enfermedad dada, compuesto u otro parámetro. También se pueden incluir soluciones de lavado, reactivos para llevar a cabo un ensayo de hibridación, medios de aislamiento o purificación de ARNm, medios de detección, así como controles positivos y negativos. El kit también puede incluir instrucciones para usar los componentes del kit. El kit se puede diseñar para uso en el hogar, uso clínico, o uso para investigación.

5.9 Kits para detectar biomarcadores polipéptidos o proteínas

30 En algunas realizaciones, se puede preparar un kit para detectar niveles de proteína SPARC y/o p21. Los kits pueden incluir, por ejemplo, una tira reactiva revestida con un anticuerpo que reconoce la proteína, soluciones de lavado, reactivos para llevar a cabo el ensayo, medios de aislamiento o purificación de proteínas, medios de detección, así como controles positivos y negativos. El kit también puede incluir instrucciones para usar los componentes del kit. El kit se puede diseñar para usar en el hogar, uso clínico o uso para investigación.

35 6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se llevan a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para el experto en la técnica, excepto donde se describe de otra forma en detalle. Se pretende que los ejemplos sean meramente ilustrativos.

40 Como se detalla más adelante, el efecto de la administración de un compuesto inmunomodulador en varios tipos de células NHL se determinó después de 1-3 días usando la incorporación de 3H-timidina, tecnología de matrices de microperlas y PCR en tiempo real.

6.1 Métodos

45 Ensayo de proliferación celular: La proliferación de células NHL se evaluó mediante ensayo de incorporación de 3H-timidina. Brevemente, las células se cultivaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos en medio RPMI-1640 completo en presencia y ausencia de fármacos. Después de incubación a 37°C durante 3 días, se añadió 3H-timidina 1 µCi a cada pocillo durante al menos 5 h de incubación. Después, se midió la incorporación de 3H de cada pocillo.

50 Ensayo de citometría de flujo: Se recogieron las células después de tratamiento con los fármacos de ensayo y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) y anexina-V-FITC. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo en BD FACScanto y se analizó con el programa ModFit.

Ensayo Luminex para factores de crecimiento: Las células se trataron con el fármaco durante 3 días en placas de 96 pocillos. Después, los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron para la medición del VEGF usando la tecnología Luminex/xMAP®.

Análisis de RT-PCR en tiempo real: Después del tratamiento celular, se purificó el ARN total. Se llevó a cabo la PCR en tiempo real con 100 ng de ARN total, usando un instrumento Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando la química de detección de secuencia de TaqMan que usa una sonda fluorogénica (FAM) para permitir la detección de un producto de la PCR específico cuando se acumula durante la PCR. Las muestras se prepararon por triplicado en volúmenes de reacción de 50 µl. Las reacciones de 50 µl consistían en 25 µl de 2x mezcla maestra de PCR TaqMan, 25 µl de 20x ensayo de expresión génica, 10 µl de ARN (500 ng) y 12,5 µl de agua. Se usó la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno para asegurar cantidades de ARN iguales en cada muestra.

Los ensayos de expresión génica TaqMan® eran ensayos de expresión génica preformulados para la detección y cuantificación rápida y fiable de transcritos de ARNm humano, ratón y rata. El programa usado era: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min. Los datos se analizaron usando el software 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection v1.3 usando el método de cálculo de cuantificación relativa de CT comparativa. El resultado se expresó como el número de veces de cambio de los niveles de expresión. El nivel umbral se seleccionó para ser determinado automáticamente por el software y se ajustó para que estuviera por encima del nivel basal pero suficientemente bajo para que estar dentro de la región de crecimiento exponencial de una curva de amplificación. El número de ciclos al que la señal de fluorescencia asociada con una acumulación de amplicón particular cruza el umbral, se denomina el CT.

Transfección de ARN de interferencia pequeño: Se transfectaron células con SPARC o ciclofilina de siGENOME SMARTpool (Dharmacon, Lafayette, Co) en una concentración final 200 nM usando reactivos de transfección DharmaFECT 2 siguiendo el protocolo del fabricante. Después de 24 h de transfección, las células después se trataron con el fármaco durante 2 días.

6.2 Efecto de la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en la expresión de ARNm de VEGF, p21, p53 en células Rec-1

El efecto de la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina o 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, sola o en combinación con dexametasona (10 nM) en la expresión de varios genes importantes implicados en la regulación de la proliferación y supervivencia de células de NHL se determinó usando células Rec-1 (FIG. 1). Los compuestos inmunomoduladores 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina o 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina se añadieron a las células Rec-1 en una concentración final 1, 10, o 100 µM. Después de 24 o 48 h de incubación con 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina o 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, se midió la expresión génica de VEGF, p21, p53, y ciclina D1 usando PCR en tiempo real. Se observó una disminución del nivel de ARNm de VEGF y un aumento del nivel de ARNm de p21 en las células Rec-1.

6.3 Efecto de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina combinada con dexametasona en la viabilidad celular en células Jeko-1

Se examinó el efecto de la combinación de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina y dexametasona en células Jeko-1. Los resultados muestran (fig. 1) que hay una notable sinergia entre la dexametasona y la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en la inhibición del crecimiento y supervivencia de células de NHL. El tratamiento con dexametasona durante 3 días apenas inducía detención del ciclo celular en la fase G0/G1 ni apoptosis. Sin embargo, la adición de 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina potenciaba notablemente el efecto antiproliferativo de la dexametasona (fig. 7).

6.4 Efecto de la administración de varios agentes inmunomoduladores en los niveles de ARNm de SPARC, p21 y activina A en células Jeko-1

Las células Jeko-1 se trataron con compuestos inmunomoduladores, con o sin dexametasona (10 nM) durante 24 h. Después, se aisló el ARN total de las células tratadas, y las muestras se sometieron a análisis por RT-PCR en tiempo real para determinar la transcripción génica a nivel del ARNm. Se encontró que el compuesto inmunomodulador 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina (en concentración 1-10 µM) regulaba por aumento los niveles de ARNm de p21, activina A y SPARC (fig. 2). La 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina (en concentración 10 µM) potenciaba los niveles de ARNm de estos genes hasta aproximadamente 3 veces. La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina (1 µM) potenciaba el nivel de ARNm de activina A hasta 2,6 veces y SPARC era potenciado con la concentración 10 µM. La 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina tenía un efecto de potenciación claro sobre p21.

6.5 Propiedades antiproliferativas de compuestos inmunomoduladores en determinadas líneas celulares de NHL

Para entender mejor cómo varía la eficacia de la administración del compuesto inmunomodulador entre los diferentes tipos de células de cáncer, se ensayó in vitro el efecto antiproliferativo del compuesto inmunomodulador 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en varias líneas celulares de NHL después de 1-3 días de tratamiento. El método usaba la incorporación de ³H-timidina, tecnología de matrices de microperlas y PCR en tiempo real. Las 6 líneas celulares ensayadas eran Namalwa, Jeko-1, Rec-1, Granta-519, DB y JVM-2.

La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina demostró actividad antiproliferativa contra varios tipos de células de NHL (fig. 4A; fig. 6A). La sensibilidad de estas líneas celulares de NHL frente a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina es como sigue: células Namalwa > Rec-1 > Jeko-1 > Granta-519 > JVM-2 > DB.

- 5 Tras el análisis citogenético, se encontró que las células Namalwa tienen una eliminación 5q. Las células Rec-1, Jeko-1, Granta-519 y JVM-2 tienen una t(11;14)(q13;q32), que es la característica para las líneas celulares del linfoma de células del manto (LCM); y las células DB tienen la t(14;18)(q32;q21), que es característica del linfoma folicular.

10 6.6 Marcadores de expresión génica que predicen la sensibilidad del linfoma de células del manto frente al tratamiento con compuestos inmunomoduladores

El descubrimiento de que los niveles de expresión de determinados genes relacionados con el cáncer difieren entre diferentes líneas de células de cáncer condujo a una investigación más detallada para determinar si algunos tipos de células de cáncer son más sensibles a compuestos inmunomoduladores específicos que otros. Por lo tanto, se buscaron patrones de expresión de genes constitutiva (nivel basal) que predijeran la sensibilidad de los tumores de NHL a la terapia con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina. La expresión de nivel basal de genes específicos de diferentes líneas celulares de NHL se midieron por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) usando el ARN total. Se usó el gen de la GAPDH como control interno de normalización (fig. 3). Los resultados muestran que el gen de la ciclina D1 en general es expresado en exceso en células de LCM, como se esperaba basándose en su genotipo característicos t(11;14). El nivel de expresión del gen de la ciclina D1 constitutivo se correlaciona con el orden de sensibilidad frente a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina: Rec-1 > Jeko-1 > Granta-519 > JVM-2.

20 6.7 Predicción de la eficacia del tratamiento en pacientes midiendo los niveles de expresión basales de la ciclina D1 (Referencia)

La proteína ciclina D1 del ciclo celular, en particular en combinación con la quinasa dependiente de ciclina Cdk4, estimula el avance a través del ciclo celular, dando como resultado un aumento de la proliferación celular.

Se examinó el efecto de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina en la expresión de la ciclina D1 en los seis tipos de células de NHL usando la tecnología de RT-PCR en tiempo real. Se encontró que un nivel basal alto de ciclina D1 se correlacionaba con sensibilidad a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina (fig. 3). Por lo tanto, las células con cantidades altas de expresión de ciclina D1 es más probable que respondan a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina que las células que tenían nivel bajo de ciclina D1.

Por consiguiente, el nivel basal de la ciclina D1 también se podía usar como marcador para predecir si un paciente con un tipo dado de NHL es probable que sea tratado eficazmente con un compuesto inmunomodulador. Para predecir la probabilidad de un resultado del tratamiento exitoso con un compuesto inmunomodulador específico, la expresión basal de la ciclina D1 se puede controlar por qRT-PCR en biopsia de ganglios linfáticos o de la médula ósea, o en células tumorales de la sangre periférica, de pacientes con NHL y en particular con LCM, como medio para predecir que paciente es más probable que se beneficie de una terapia con un compuesto inmunomodulador.

Como referencia, se identifica un paciente con NHL y se toma una biopsia de ganglio linfático. Se mide el nivel basal de expresión del gen de la ciclina D1. La probabilidad de un tratamiento con éxito con un agente inmunomodulador se determina comparando los niveles de ciclina D1 con los de ciclina D1 medidos en una muestra obtenida antes del tratamiento con un compuesto inmunomodulador. A un paciente con un nivel basal de ciclina D1 más alto después del tratamiento, se le da una probabilidad alta de tratamiento con éxito con un compuesto inmunomodulador, y se asigna a un protocolo de tratamiento que implica la administración oral diaria de un compuesto inmunomodulador.

45 6.8 La administración de 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina aumenta la expresión de los genes supresores tumorales de p21^{cip/kip} y SPARC

La administración de 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina aumentaba la expresión de genes supresores tumorales, tales como p21^{cip/kip} y SPARC en varias líneas celulares. El aumento del ARNm de SPARC se correlacionaba con el efecto antiproliferativo de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina y no se vio en las células resistentes, mientras que se observó p21 elevado tanto en las células sensibles como en las resistentes (DB).

Como se muestra en la figura 4, la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina aumentaba la expresión del ARNm de SPARC en líneas celulares del linfoma no Hodgkins (NHL) de una forma que se correlaciona con la actividad antiproliferativa de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina contra la línea celular particular (figuras 4A y 4B). El orden de sensibilidad de las diferentes líneas celulares de NHL a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina es Namalwa (linfoma de Burkitt) > Rec-1 > Jeko-1 > Granta-519 > JVM-2 (todos linfomas de células del manto, LCM) > DB (linfoma difuso de células B grandes, DLBCL). Las cuatro líneas de LCM tratadas contenían la translocación cromosómica característica t(11;14) que da como resultado el exceso de expresión de la

proteína del ciclo celular ciclina D1. La línea celular DB contenía la translocación cromosómica t(14;18) que da como resultado el exceso de expresión de la proteína antiapoptótica bc12. Esta línea celular DB respondía realmente a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina con una velocidad mayor de proliferación celular. Por lo tanto, la t(14;18) puede ser un factor de pronóstico negativo en la predicción de la respuesta clínica a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina. Por lo tanto, la expresión génica de SPARC se puede usar como un biomarcador de respuesta tumoral NHL o LCM a la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina.

6.9 La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina reduce la producción del factor angiogénico VEGF de células de NHL sensibles

Se midió el efecto de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en la producción de VEGF, como se muestra en la figura 7. La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina inhibía la producción del factor de crecimiento pro-angiogénico VEGF de células de NHL sensibles a la antiproliferación, tales como células Namalwa, Jeko-1 y Rec-1. Este efecto en el VEGF se produce con concentraciones muy inferiores a los niveles requeridos para los efectos antiproliferativos. En cambio, la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina no consigue inhibir el VEGF de las células de NHL resistentes a la antiproliferación, como las células Granta-519 y DB. La 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina no inhibe la expresión del ARNm de VEGF, implicando un efecto inhibidor postranscripcional (fig. 7).

Es interesante que los efectos inhibidores de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en la proliferación y producción de VEGF de células de NHL sensibles parece que son sucesos independientes, debido a la adición de VEGF humano recombinante exógeno (en exceso) o anticuerpo de VEGF neutralizante no afectan a la actividad antiproliferativa de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina (fig. 8).

6.10 Análisis de RT-PCR de la expresión génica en células de NHL tratadas con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina

Se midió el efecto de la administración de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en diferentes células de NHL después de 24 h de incubación, usando la RT-PCR en tiempo real (fig. 9). Los resultados muestran que la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina aumentaba la expresión de genes supresores tumorales tales como p21cip/kip y SPARC en células de NHL sensibles.

6.11 Sinergia de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina y la dexametasona en la regulación por aumento de la expresión de SPARC y p21 en células Namalwa

Se midió el efecto de la administración de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en células Namalwa después de 48 h de tratamiento con fármaco. Los resultados muestran que la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina tenía efecto sinérgico con la dexametasona, regulando por aumento la expresión de SPARC en células de NHL tales como Namalwa, Rec-1 y Jeko-1, aunque la administración de dexametasona sola no tenía efecto en la expresión de SPARC. Esta combinación de fármacos también regulaba por aumento significativamente la expresión de p21 (figura 10).

6.12 Análisis de la cinética en el tiempo de la expresión génica en células Namalwa tratadas con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina

Se midió el efecto de la administración de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en diferentes tiempos de medición de 0 a 48 h en el número de veces de cambio de la expresión de varios genes en células Namalwa (fig. 11). Las células tratadas con 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina no presentaban un cambio significativo en la expresión de varios genes implicados en la angiogénesis, proliferación y supervivencia celular, tales como de VEGF, p53/p73 (2 miembros de la familia de p53 transactivador de transcripción de p21), BlyS (estimulador de linfocitos B, un miembro de la familia de ligandos TNF implicado en la supervivencia de células hematopoyéticas) y ciclina D1.

6.13 La inactivación génica de SPARC usando ARNip dificulta el efecto antiproliferativo de un compuesto inmunomodulador

Se transfectó ARNip de SPARC en células Namalwa para determinar el efecto de una inactivación génica de SPARC en el efecto antiproliferativo de 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en células Namalwa. El efecto antiproliferativo de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina es más débil después de la inactivación génica de SPARC comparado con células de control transfectadas de forma simulada. Por lo tanto, el resultado muestra que el efecto inhibidor de la 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina en la proliferación celular puede ser dificultado, en cierta medida, por la inactivación génica de SPARC (fig. 12).

REIVINDICACIONES

1. Un método de predicción de la respuesta tumoral al tratamiento de un paciente con linfoma no Hodgkin (NHL), que comprende:
- cultivar células tumorales obtenidas del paciente en presencia o ausencia de un compuesto inmunomodulador;
- 5 medir la expresión de SPARC en las células tumorales; y
- comparar el nivel de expresión de SPARC en células tumorales cultivadas en presencia de un compuesto inmunomodulador con el nivel de expresión de SPARC en células tumorales cultivadas en ausencia de un compuesto inmunomodulador;
- 10 en donde un nivel aumentado de expresión de SPARC en presencia de un compuesto inmunomodulador indica la probabilidad de una respuesta tumoral eficaz al compuesto inmunomodulador en el paciente,
- en donde el compuesto inmunomodulador es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina.
2. Un método de control de la respuesta tumoral al tratamiento de un paciente con linfoma no Hodgkin (NHL), que comprende:
- medir la expresión de SPARC en una muestra biológica obtenida del paciente;
- 15 medir la expresión de SPARC en una segunda muestra biológica obtenida del paciente después de la administración de un compuesto inmunomodulador al paciente; y
- comparar los niveles de expresión de SPARC;
- en donde un nivel aumentado de expresión de SPARC después del tratamiento indica la probabilidad de una respuesta tumoral eficaz,
- 20 en donde el compuesto inmunomodulador es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina.
3. Un método de control de la observancia del paciente de un protocolo de tratamiento con fármaco en el tratamiento del linfoma no Hodgkin (NHL), que comprende:
- medir el nivel de expresión de SPARC en una muestra biológica obtenida de dicho paciente; y
- 25 determinar si el nivel de expresión es mayor en la muestra del paciente comparado con el nivel de expresión en una muestra de control no tratada;
- en donde una expresión aumentada indica la observancia del paciente de dicho protocolo de tratamiento con fármaco,
- en donde el fármaco es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la expresión es la expresión de ARNm o expresión de proteína.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la expresión en la muestra tratada aumenta 1,5x, 2x, 3x, 5x o más.
6. Uso de un kit para predecir la probabilidad de un tratamiento eficaz del NHL con un compuesto inmunomodulador, en donde el kit comprende:
- 35 un soporte sólido;
- un ácido nucleico en contacto con dicho soporte, en donde dicho ácido nucleico es complementario con al menos 20, 50, 100, 200, 350 o más bases de al menos uno del ARNm de p21 o ARNm de SPARC; y
- un medio para detectar la expresión de dicho ARNm en una muestra biológica;
- en donde el compuesto inmunomodulador es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina.
- 40 7. Uso de un kit para predecir la probabilidad de un tratamiento eficaz del NHL con un compuesto inmunomodulador o para controlar el tratamiento del NHL con un compuesto inmunomodulador, en donde el kit comprende:
- un soporte sólido; y
- un medio para detectar la expresión de proteína de al menos uno de SPARC y p21 en una muestra biológica;

en donde el compuesto inmunomodulador es la 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina.

8. El uso de las reivindicaciones 6 o 7, en donde el kit usa una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica.
- 5 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicho soporte sólido comprende un componente seleccionado del grupo que consiste en plástico, silicio, metal, resina, vidrio, membrana, partícula, precipitado, gel, polímero, lámina, esfera, polisacárido, capilar, película, placa y portaobjetos.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en un lisato celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina y una muestra de piel.
- 10 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicha muestra biológica es una biopsia de ganglio linfático, una biopsia de médula ósea, o una muestra de células tumorales de sangre periférica.
12. El uso de la reivindicación 10, en donde el tejido es un tejido oral o un tejido gastrointestinal.

Expresión génica de VEGF, p21, p53 y ciclina D1 en células Rec-1 tratadas con CC-4047 durante 24 h

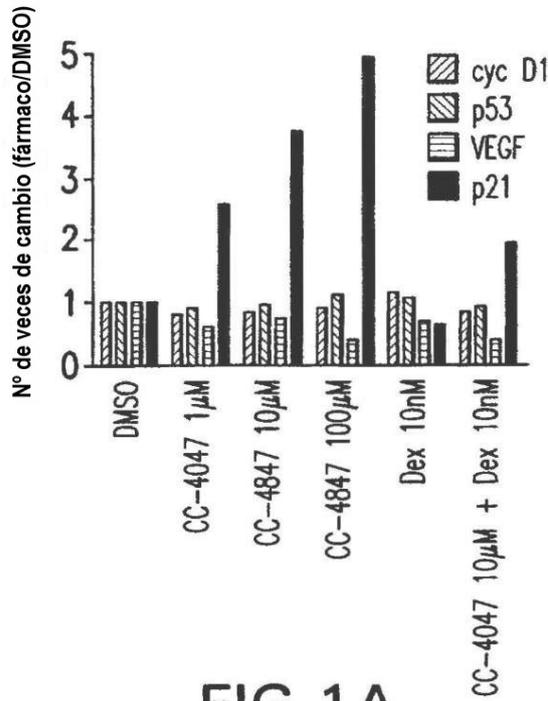


FIG. 1A

Expresión génica de VEGF, p21, p53 y ciclina D1 en células Rec-1 tratadas con CC-4047 durante 48 h

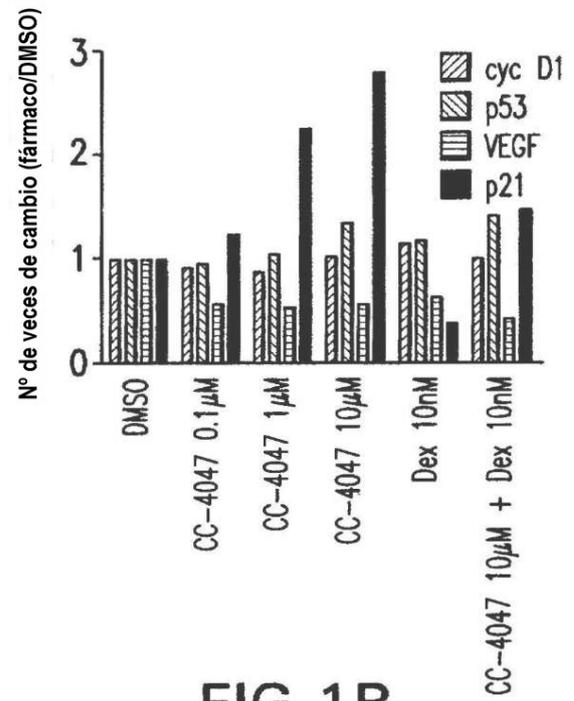


FIG. 1B

Expresión génica de VEGF, p21, p53 y ciclina D1 en células Rec-1 tratadas con CC-5013 durante 24 h

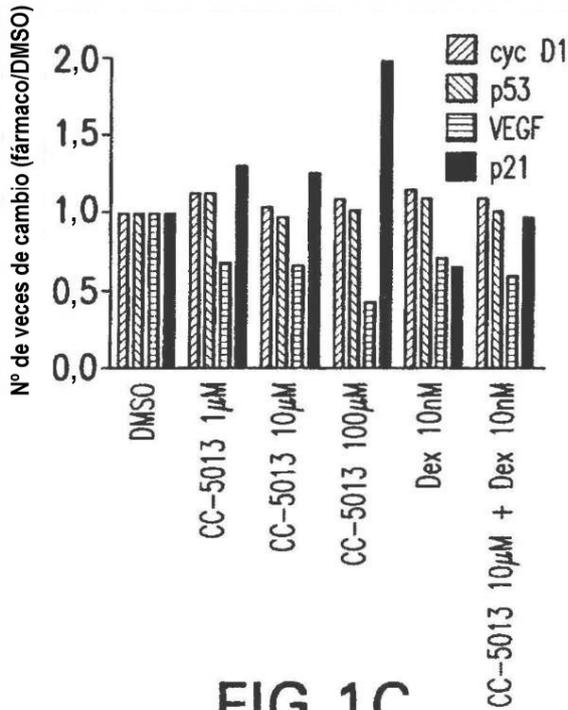


FIG. 1C

Expresión génica de VEGF, p21, p53 y ciclina D1 en células Rec-1 tratadas con CC-5013 durante 48 h

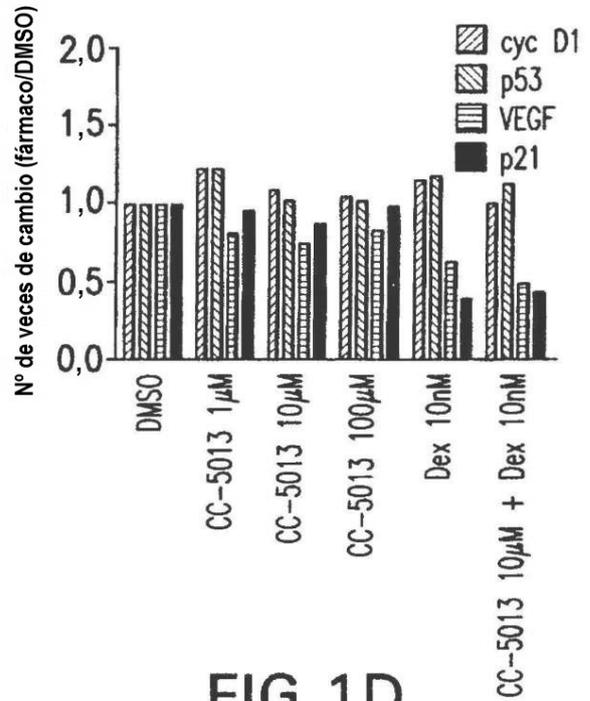


FIG. 1D

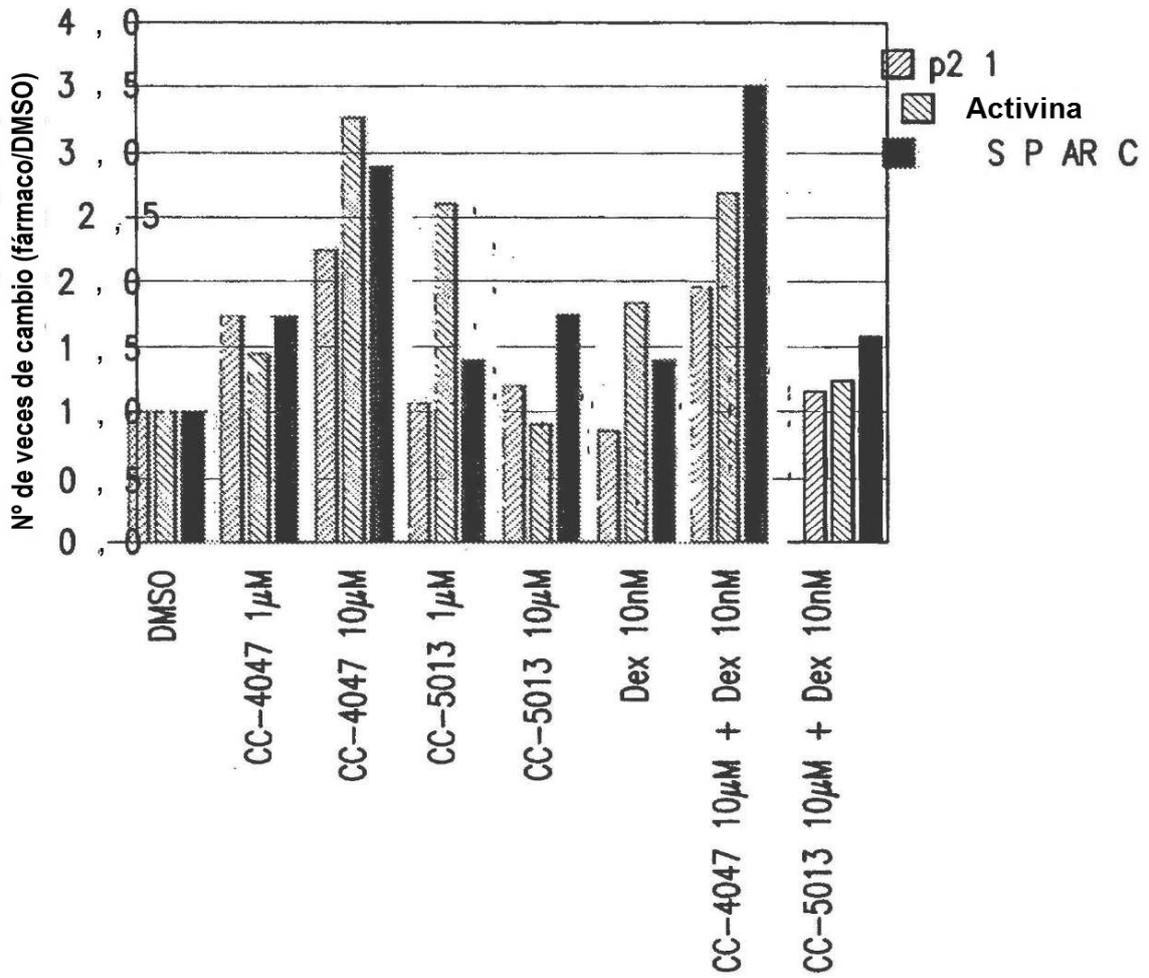


FIG.2

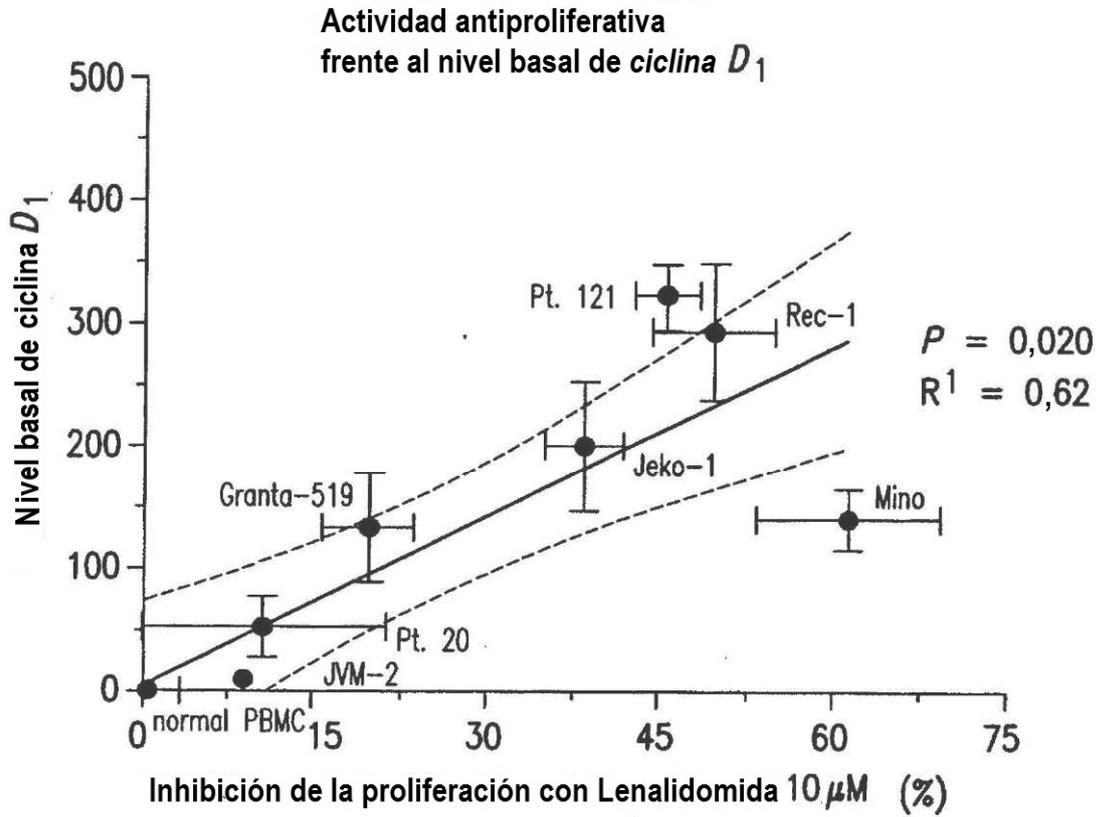
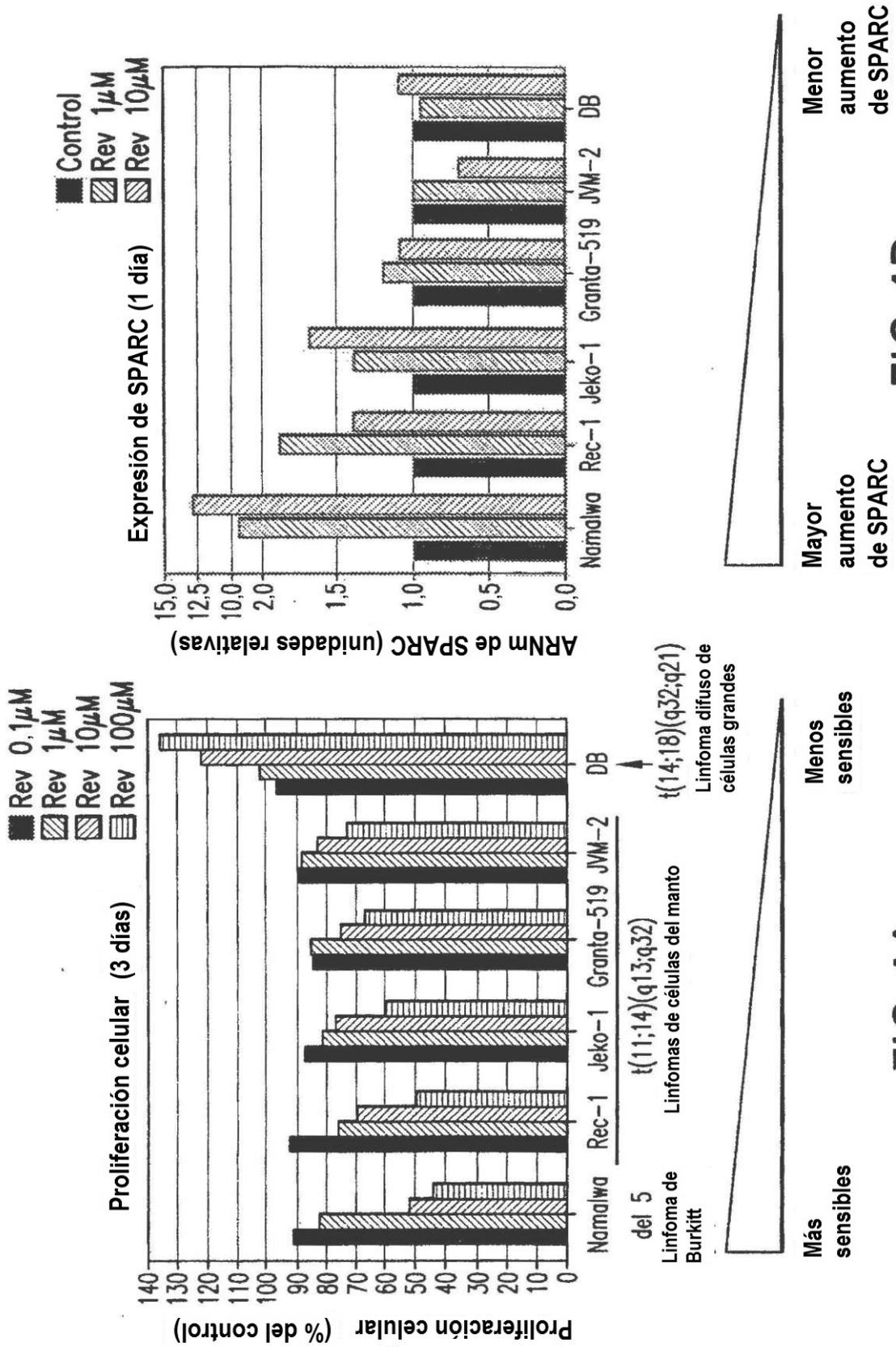


FIG.3



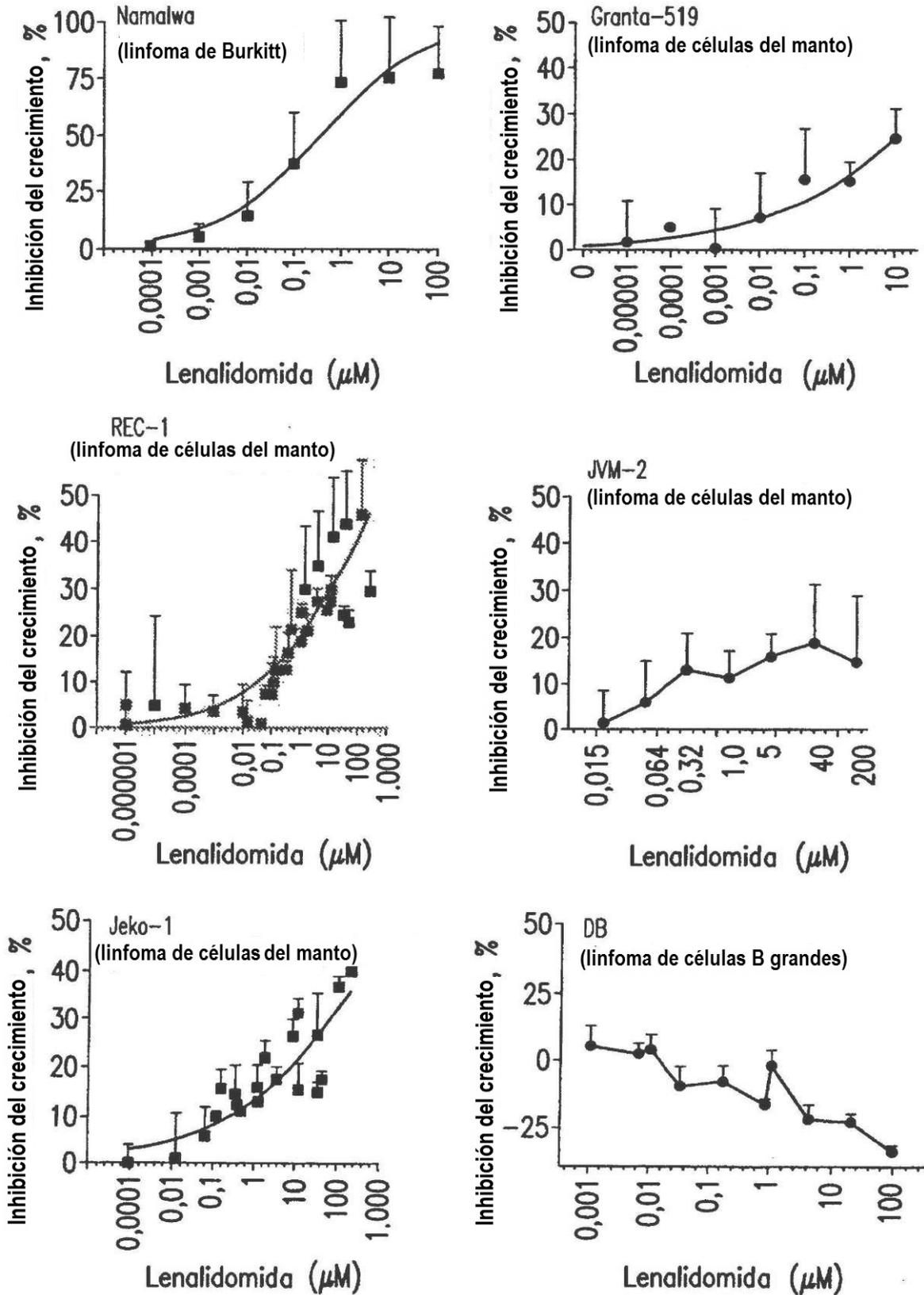


FIG.5

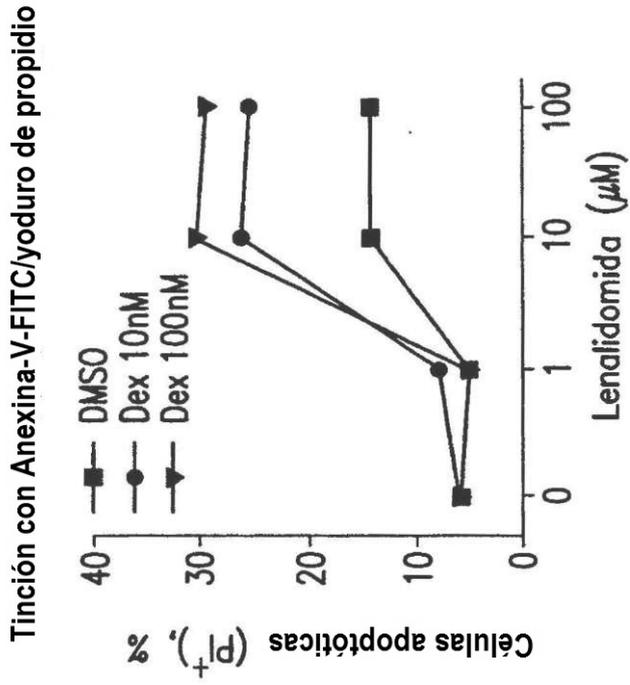
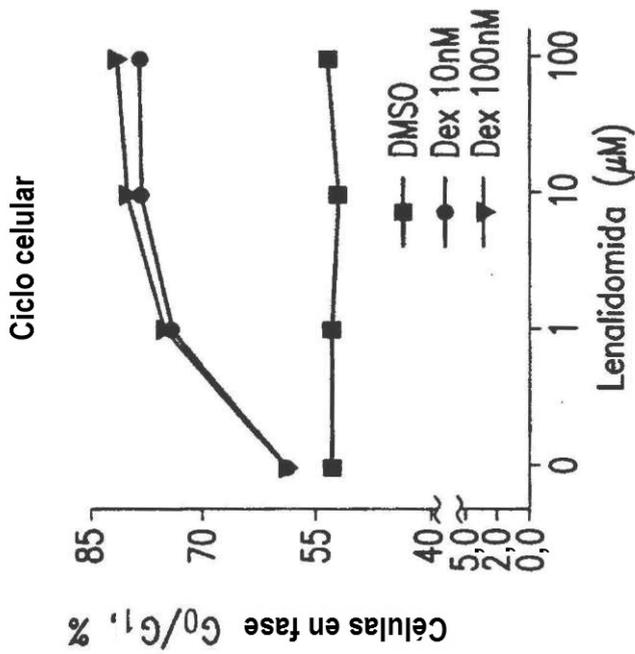
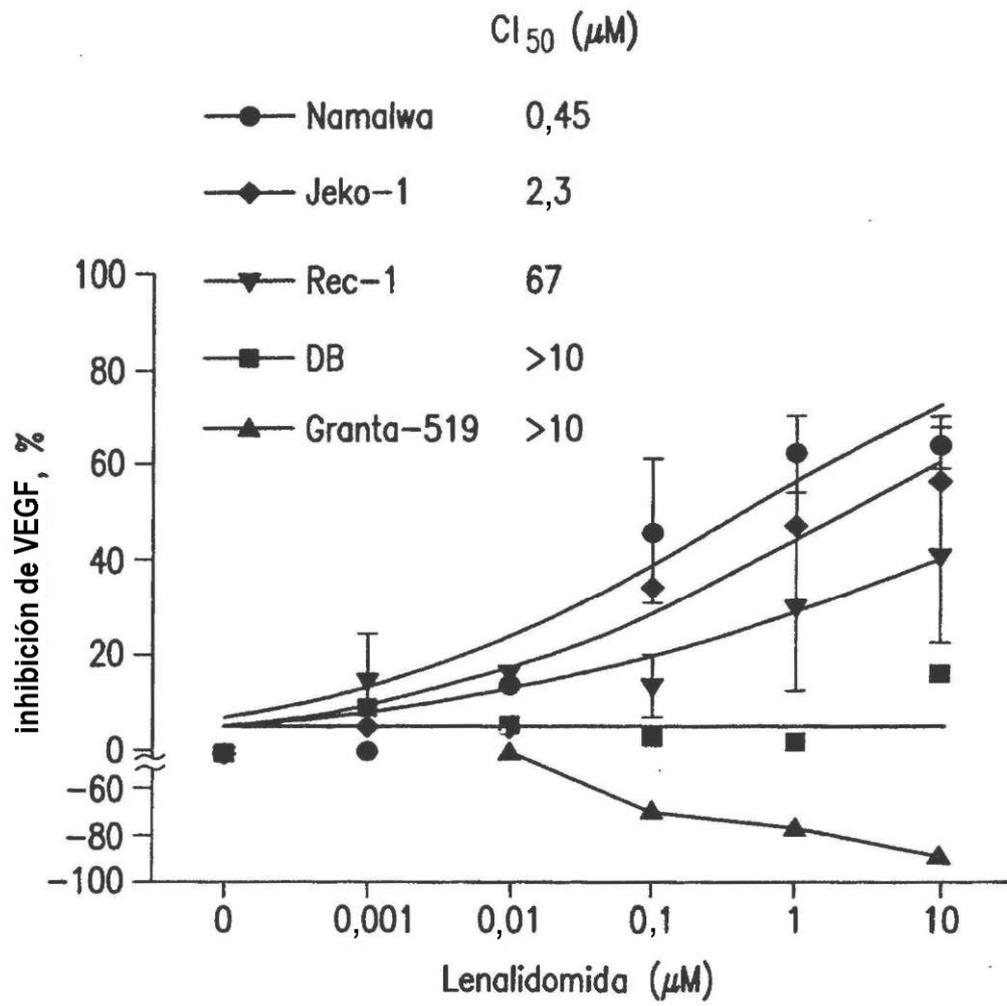


FIG.6B



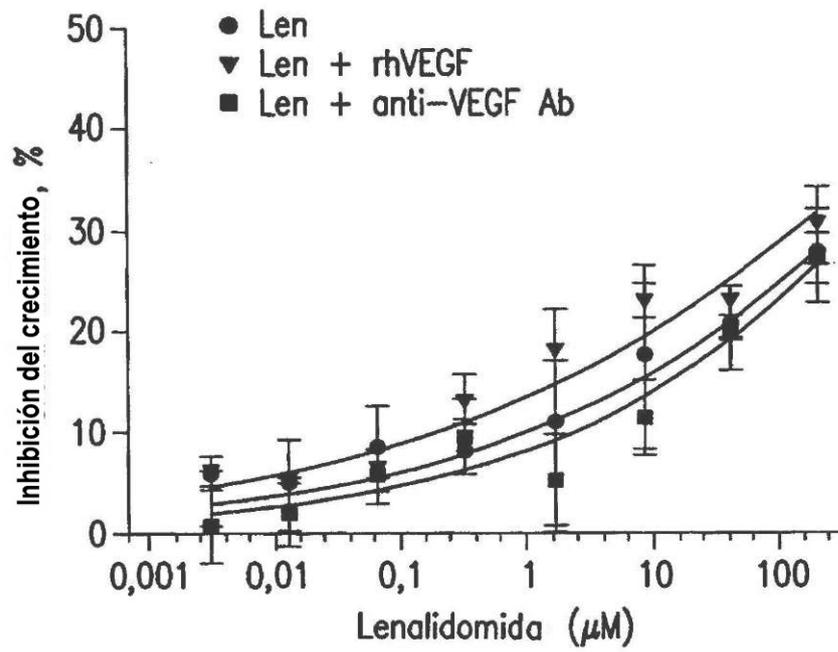
Dex, dexametasona, DMSO; dimetilsulfóxido.

FIG.6A



CI_{50} , concentración inhibidora semimáxima.

FIG.7



Ab, anticuerpo; Len, Lenalidomida; rh, recombinante humano.

FIG.8

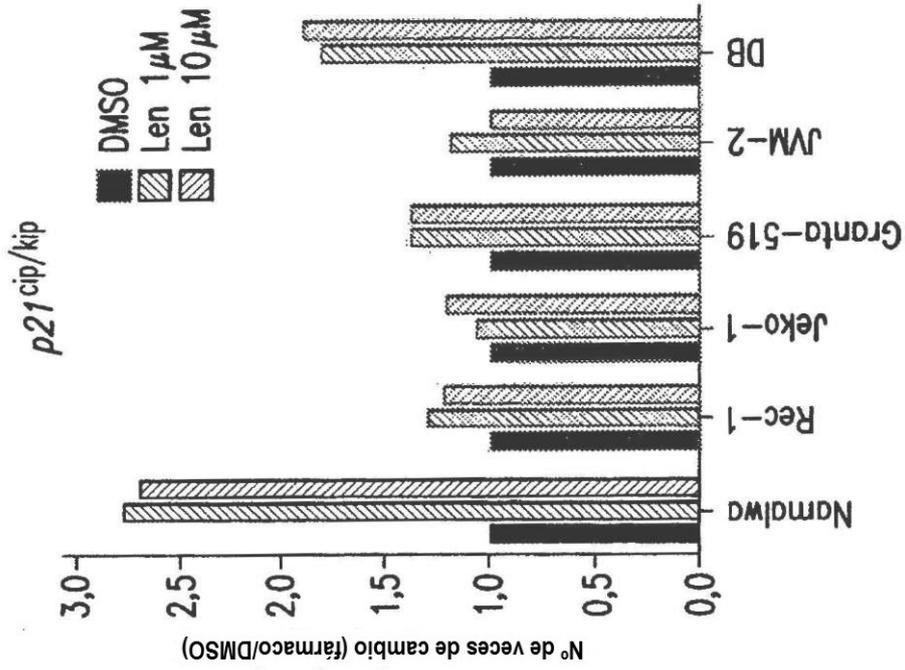


FIG.9B

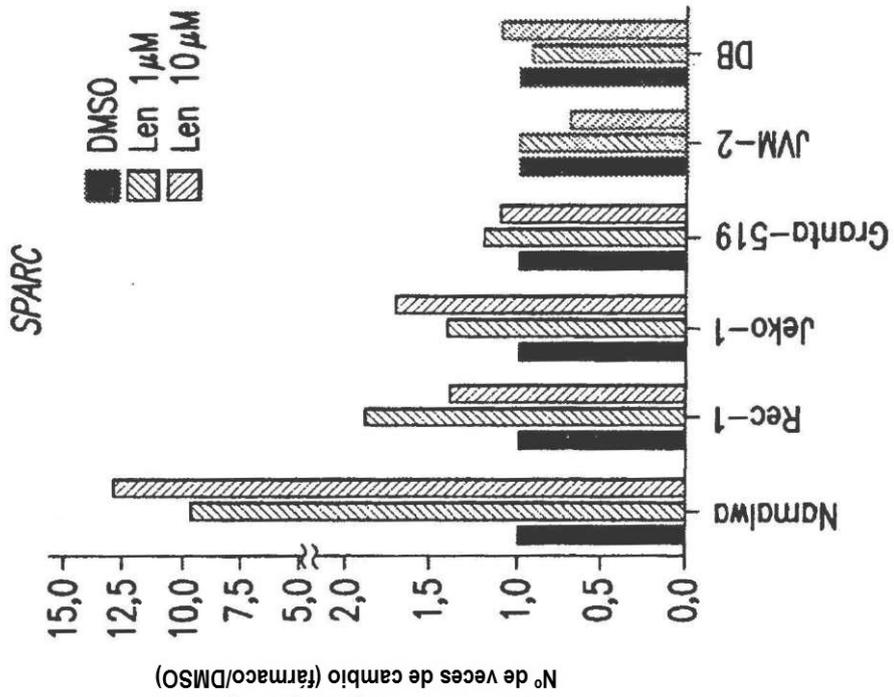


FIG.9A

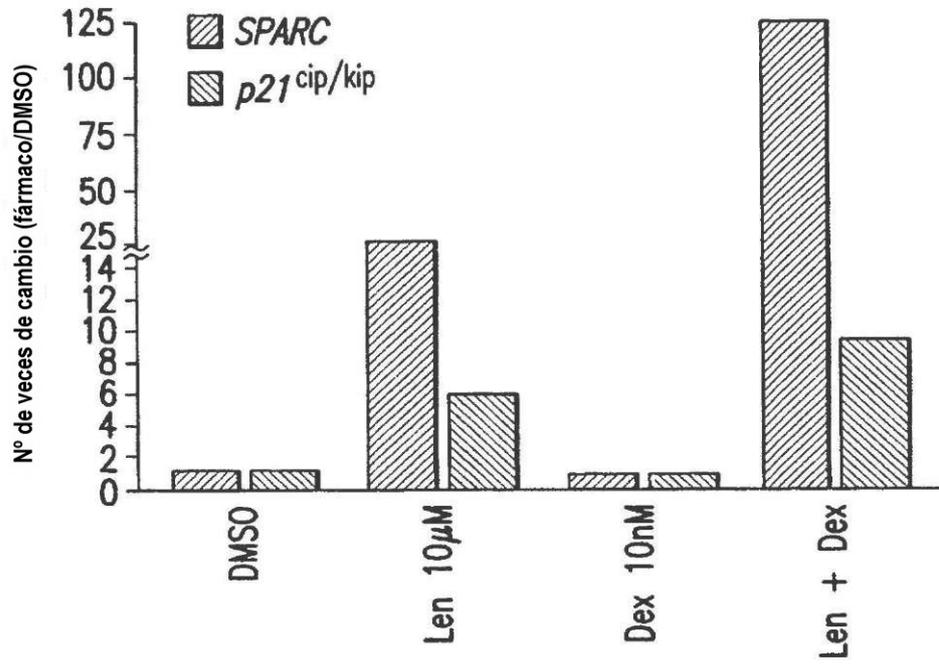


FIG.10

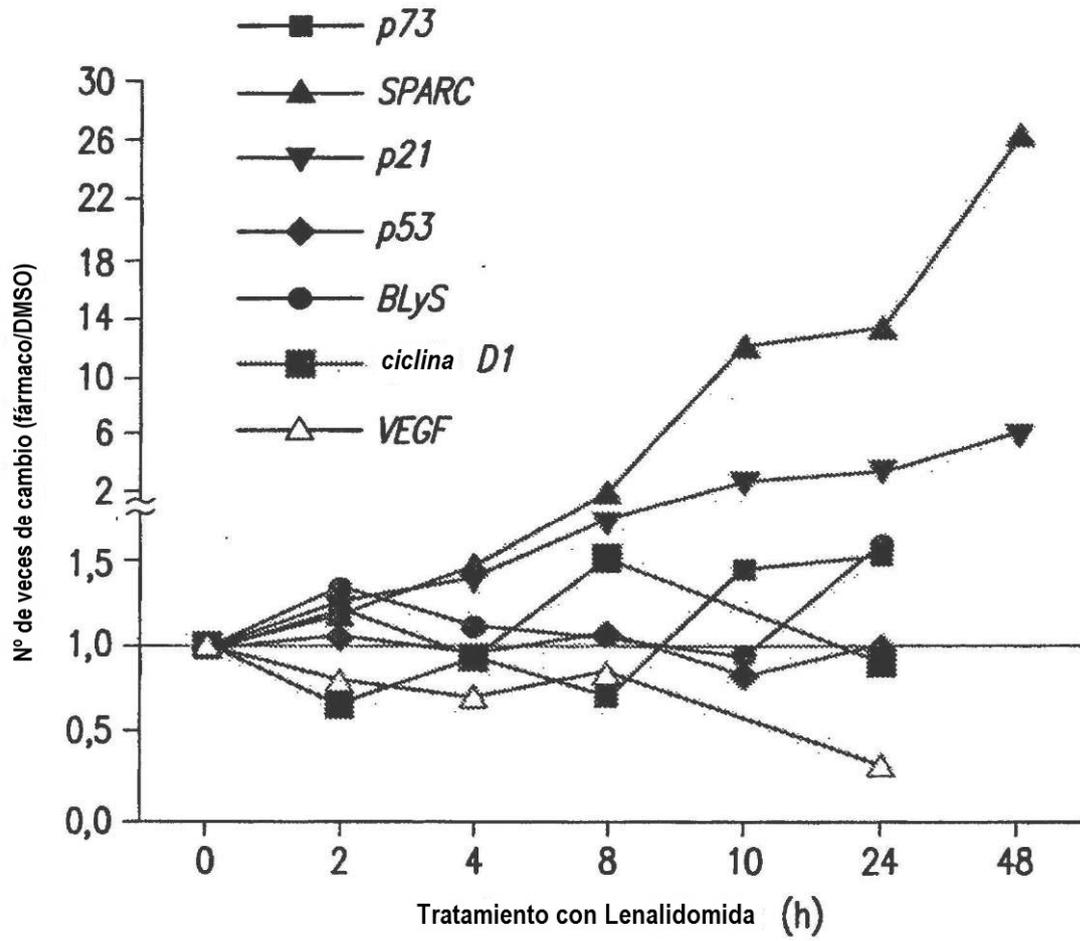


FIG.11

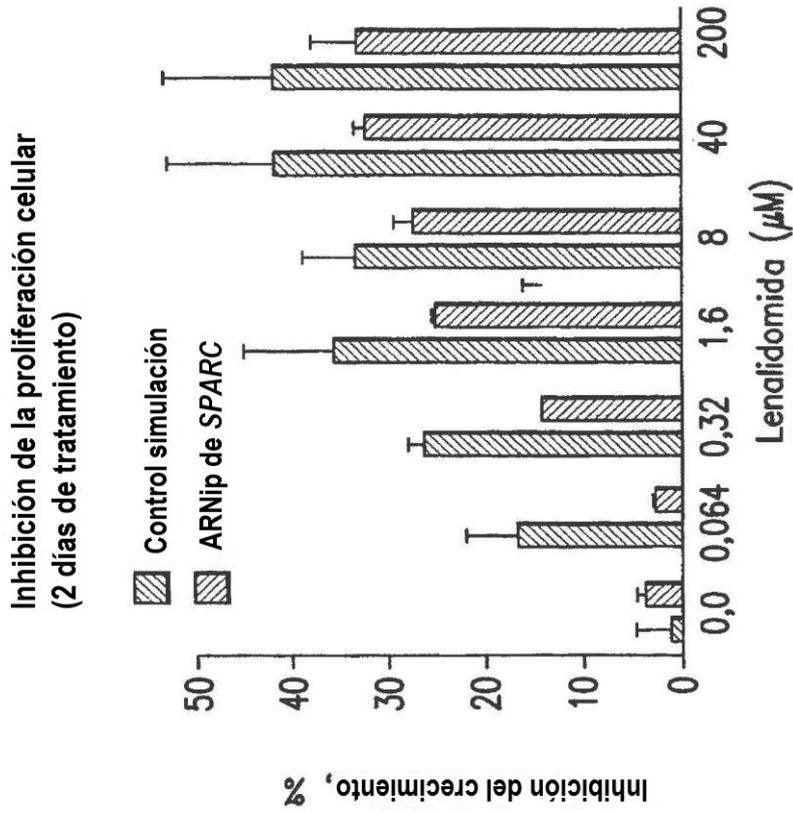


FIG.12B

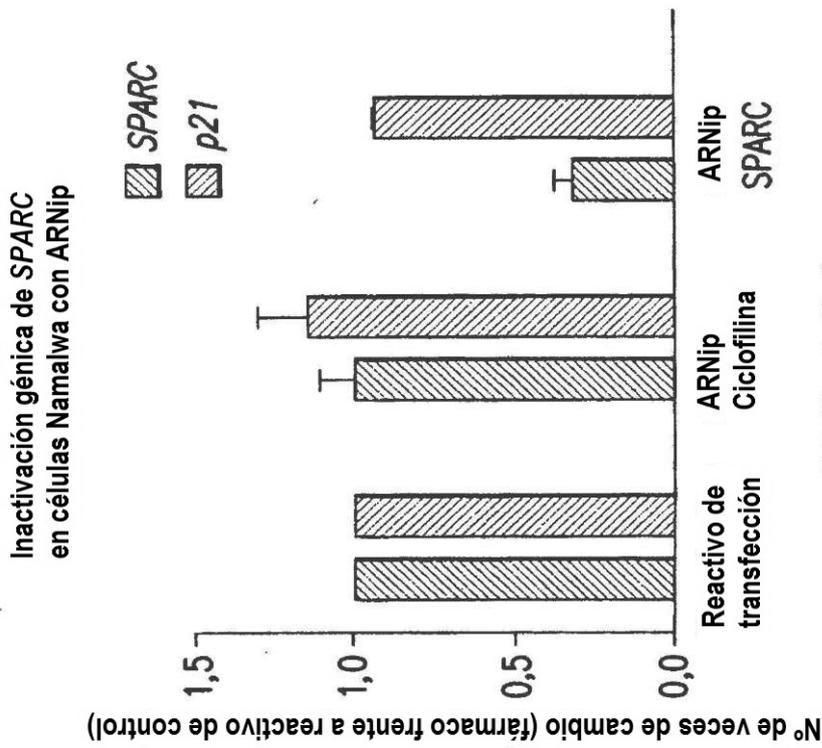


FIG.12A