

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 402**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2010 PCT/US2010/053623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10825706 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2491145**

54 Título: **Métodos y composiciones para trastornos relacionados con la proliferación celular**

30 Prioridad:

**21.10.2009 US 253821 P**  
**04.12.2009 US 266930 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2016**

73 Titular/es:

**AGIOS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**88 Sidney Street**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**SU, SHINSAN;**  
**DANG, LENNY;**  
**GROSS, STEFAN;**  
**JIN, SHENGFANG y**  
**FANTIN, VALERIA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 594 402 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para trastornos relacionados con la proliferación celular

## 5 Reivindicación de Prioridad

Esta solicitud reivindica prioridad con el documento U.S.S.N. 61/253821, presentado el 21 de octubre de 2009 y el documento U.S.S.N. 61/266930, presentado el 4 de diciembre de 2009.

## 10 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para la evaluación y el tratamiento de trastornos relacionados con la proliferación celular, por ejemplo, trastornos proliferativos tales como el cáncer.

## 15 Antecedentes

La isocitrato deshidrogenasa, también conocida como IDH, es una enzima que participa en el ciclo del ácido cítrico. Cataliza la tercera etapa del ciclo: la descarboxilación oxidativa del isocitrato, produciendo alfa-cetoglutarato ( $\alpha$ -cetoglutarato o  $\alpha$ -KG) y  $\text{CO}_2$ , mientras convierte  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ . Este es un proceso de dos pasos, que implica la oxidación de isocitrato (un alcohol secundario) hasta oxalosuccinato (una cetona), seguido por la descarboxilación del grupo carboxilo beta hasta la cetona, formando alfa-cetoglutarato. Otra isoforma de la enzima cataliza la misma reacción; sin embargo, esta reacción no está relacionada con el ciclo del ácido cítrico, se lleva a cabo en el citosol, así como en la mitocondria y los peroxisomas, y utiliza  $\text{NADP}^+$  como cofactor en lugar de  $\text{NAD}^+$ .

## 25 Las mutaciones de la IDH en pacientes con leucemia mieloide aguda se describen en Kranendijk y colaboradores, Sciences 2010, 330, 363 y Ward y colaboradores, Cancer Cell 2010, 17(3), 225-234.

Sumario de la invención

30 Los métodos y composiciones descritos en esta memoria se refieren al papel que juegan en una enfermedad los nuevos productos activos producidos por nuevas enzimas mutantes activas IDH (por ejemplo, IDH1 o IDH2). Los inventores han descubierto, entre otros, una neoactividad asociada con mutantes de IDH y que el producto de la neoactividad puede ser significativamente elevado en las células cancerosas. Se divulgan aquí métodos y composiciones para tratamiento, y métodos de evaluación, de individuos que tienen o están en riesgo de padecer un trastorno, por ejemplo, un trastorno relacionado con proliferación celular caracterizado por la neoactividad de IDH. Tales trastornos incluyen, por ejemplo, trastornos proliferativos tales como el cáncer. Los inventores han descubierto y divulgado aquí nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos, por ejemplo, cánceres, caracterizados, por ejemplo, por una neoactividad de IDH, proteína neoactiva, ARNm neoactivo, o mutaciones neoactivas. En formas de realización, un agente terapéutico reduce los niveles de neoactividad o del producto neoactivo o mejora un efecto de un producto neoactivo. Los métodos descritos en esta memoria también permiten la identificación de un sujeto, o la identificación de un tratamiento para el sujeto, con base en la neoactividad del genotipo o fenotipo. Esta evaluación puede permitir una coincidencia óptima del sujeto con el tratamiento, por ejemplo, donde la selección del sujeto, el tratamiento, o ambos, se basa en el análisis de la neoactividad del genotipo o fenotipo. Por ejemplo, los métodos descritos aquí pueden permitir la selección de un régimen de tratamiento que comprende la administración de un nuevo compuesto, por ejemplo, un nuevo compuesto divulgado aquí, o un compuesto conocido, por ejemplo, un compuesto conocido no recomendado previamente para un trastorno seleccionado. En formas de realización, el compuesto conocido reduce los niveles de neoactividad o de producto neoactivo o mejora un efecto de un producto neoactivo. Los métodos descritos aquí pueden guiar y proporcionar una base para la selección y administración de un nuevo compuesto o un compuesto conocido, o combinación de compuestos, no previamente recomendados para sujetos que tienen un trastorno caracterizado por una nueva mutación somática activa en una IDH. En formas de realización, el nuevo genotipo o fenotipo activo puede actuar como un biomarcador cuya presencia indica que un compuesto, ya sea nuevo, o previamente conocido, debe ser administrado, para tratar un trastorno caracterizado por una nueva mutación somática activa en una enzima de la ruta metabólica. Los nuevos mutantes activos de IDH1 o IDH2 que tienen una neoactividad que resultan en la producción de un producto alfa hidroxil tales como 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato y los trastornos asociados se discuten aquí en detalle.

60 Si bien no se desea estar ligado por la teoría, se cree que el equilibrio entre la producción y la eliminación de un producto neoactivo, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, es importante en una enfermedad. Los nuevos mutantes activos pueden aumentar el nivel del producto neoactivo, mientras que otros procesos, por ejemplo, en el caso de 2HG, por ejemplo, R-2HG, la degradación enzimática de 2HG, por ejemplo, por la 2HG deshidrogenasa, reducen el nivel del producto neoactivo. Un equilibrio incorrecto está asociado con la enfermedad. En ciertas realizaciones, el resultado neto de una nueva mutación activa de IDH1 o IDH2 resulta en mayores niveles, en las células afectadas, del producto neoactivo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

65 Por lo tanto, se describe un método para tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno relacionado con

- 5 proliferación celular, por ejemplo, un trastorno precanceroso, o cáncer. En una realización, el sujeto no tiene, o no le ha sido diagnosticado que tiene, aciduria 2-hidroxiglutarica. El trastorno relacionado con proliferación celular se caracteriza por un alelo somático, por ejemplo, un alelo preseleccionado, o un alelo mutante, de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que codifica una IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, una enzima que tiene una neoactividad.
- 10 Tal como se utiliza aquí, neoactividad se refiere a neoactividad del hidroxilo alfa. Neoactividad y neoactividad del hidroxilo alfa se utilizan aquí en forma intercambiable. La neoactividad del hidroxilo alfa es la capacidad para convertir una cetona alfa en un hidroxilo alfa. En formas de realización, la neoactividad del hidroxilo alfa procede con un cofactor reductor, por ejemplo, NADPH o NADH. En formas de realización la neoactividad del hidroxilo alfa es la neoactividad de 2HG. Neoactividad de 2HG, como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad para convertir cetoglutarato alfa en 2-hidroxiglutarato (algunas veces denominado aquí como 2HG), por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato (algunas veces denominado aquí como R-2HG). En formas de realización, la neoactividad de 2HG procede con un cofactor reductor, por ejemplo, NADPH o NADH. En una forma de realización, una nueva enzima activa puede actuar sobre más de un sustrato, por ejemplo, más de un sustrato ceto alfa.
- 15 El método comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un agente terapéutico del tipo descrito aquí para tratar así al sujeto.
- 20 En una realización, el agente terapéutico:
- trate como resultado la reducción del nivel de un producto neoactivo, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;
  - comprende un agente que es un análogo estructural celular de un producto neoactivo, o profármaco del mismo, o que disminuye la competición de un producto de la neoactividad y un análogo estructural celular del producto de la neoactividad;
  - comprende un agente que mejora los efectos de un producto no deseado, es decir, aumenta el producto neoactivo;
  - comprende un agente anti-glicolítico;
  - comprende un antioxidante; o
  - comprende un agente de hipometilación.
- 30 En una realización, el método comprende la administrar de un agente terapéutico que disminuye la neoactividad, por ejemplo, la neoactividad de 2HG. En una realización, el método comprende la administración de un inhibidor de una proteína IDH mutante, por ejemplo, una proteína IDH1 mutante o IDH2 mutante, que tiene una neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- 35 En una realización, el agente terapéutico comprende un compuesto de la Tabla 24a o de la Tabla 24b, un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (X) o la Fórmula (XI) descrita aquí, o un compuesto como se describe en la solicitud provisional de Patente de los Estados Unidos No. 61/365.072.
- 40 En una realización, el agente terapéutico comprende un agente terapéutico con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNbc descrito aquí.
- 45 En una realización, el agente terapéutico es un análogo estructural celular de un producto de neoactividad, un sustrato de un mutante neoactivo de IDH, o un profármaco del mismo, por ejemplo, como se describe en la sección titulada "Análogos estructurales celulares de productos de neoactividad, y profármacos de los mismos" en otro lugar de la presente memoria.
- 50 En una realización, el agente terapéutico es un agente antiglicolítico, por ejemplo, un agente antiglicolítico descrito en la sección titulada "Compuestos antiglicolíticos" en la presente memoria.
- 55 En una realización, el agente terapéutico es un antioxidante, por ejemplo, un agente antioxidante descrito en la sección titulada "Antioxidantes" en la presente memoria.
- 60 En una realización, el agente terapéutico es un agente de hipometilación, por ejemplo, un agente de hipometilación se describe en la sección titulada "Agentes de hipometilación" en la presente memoria.
- 65 En una realización, el agente terapéutico que vuelve al 2HG, por ejemplo, R-2HG, más tóxico para las células, por ejemplo, mediante la modulación de una enzima que resulta en la conversión del 2HG, por ejemplo, del R-2HG, en una sustancia más tóxico, por ejemplo, en donde el 2HG, por ejemplo, el R-2HG, actúa como un profármaco o un inhibidor que se dirige a la 2HG deshidrogenasa, o un modulador que conduce a la conversión del 2HG en otro metabolito que es tóxico para la célula cancerosa.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor, por ejemplo, un polipéptido, péptido o una molécula pequeña (por ejemplo, una molécula de menos de 1.000 daltons), o un aptómero, que se une a un mutante de IDH1 o IDH2 o una subunidad de tipo silvestre e inhibe la neoactividad, por ejemplo, mediante la inhibición de la formación de un dímero, por ejemplo, un homodímero de las subunidades IDH1 o IDH2 mutantes o un heterodímero de un

## ES 2 594 402 T3

- mutante y una subunidad de tipo silvestre. En una realización, el inhibidor es un polipéptido. En una realización, el polipéptido actúa como un dominante negativo con respecto a la neoactividad de la enzima mutante. El polipéptido puede corresponder a IDH1 o IDH2 de longitud completa o un fragmento del mismo. El polipéptido no necesita ser idéntico con los correspondientes residuos de IDH1 o IDH2 de tipo silvestre, pero en ciertas realizaciones tiene al menos 60, 70, 80, 90 o 95% de homología con IDH1 o IDH2 de tipo silvestre.
- En una realización, el agente terapéutico disminuye la afinidad de una IDH, por ejemplo, proteína mutante neoactiva de IDH1 o IDH2 para NADH, NADPH o un ión de metálico divalente, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  o disminuye los niveles o disponibilidad de NADH, NADPH o ion de metal divalente, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , por ejemplo, mediante competición por la unión con la enzima mutante. En una realización, la enzima es inhibida mediante el reemplazo de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  con  $Ca^{2+}$ .
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de neoactividad de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, la neoactividad de 2HG.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante que tiene una neoactividad de una IDH, por ejemplo, un mutante de IDH1 o IDH2, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que:
- inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
- inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que se selecciona de la base que:
- inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
- inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de una IDH1, por ejemplo, neoactividad de IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de una IDH mutante, por ejemplo, proteína IDH1 o IDH2 o ARNm.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, la IDH mutante, por ejemplo, ARNm de IDH1 o IDH2.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, la IDH mutante, por ejemplo, proteína IDH1 o IDH2.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la actividad de la enzima IDH neoactiva, por ejemplo, mediante la interacción con, por ejemplo, el enlazamiento con, IDH mutante, por ejemplo, proteína IDH1 o IDH2. En una realización, el inhibidor es diferente a un anticuerpo.
- En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 mutante y reduce la interacción entre el residuo N96 o S94 con cetoglutarato alfa.
- En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 y causa una alteración en la posición de N96 o S94 de la IDH1 mutante.
- En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 y causa una alteración en la posición del residuo Y139.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se enlaza con, el ARN mutante, por ejemplo, el ARNm de IDH1 mutante o el ARNm de IDH2 mutante.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, ya sea la IDH mutante, por ejemplo, proteína IDH1 o IDH2 o interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, el ARNm de IDH mutante, por ejemplo, ARNm de IDH1 o IDH2.
- En una realización, la IDH es IDH1 y la neoactividad es neoactividad de 2HG. Las mutaciones en IDH1 asociadas con la neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 132, por ejemplo, R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, o R132V (por ejemplo, R132H o R132C).
- Otras mutaciones de IDH1 asociados con la neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG

incluyen mutaciones en el residuo 71, por ejemplo, una mutación diferente a una Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

5 Otras mutaciones de IDH1 asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 100, por ejemplo, una mutación diferente a una Arg en el residuo 100, y mutaciones en el residuo 109, por ejemplo, una mutación diferente a una Arg en el residuo 109.

10 Aún otras mutaciones asociadas con la neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 70, por ejemplo, una mutación diferente a Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D); una mutación que diferente a un Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); una mutación diferente a His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); una mutación diferente a Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o una mutación que tiene un residuo diferente a Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).

15 En una realización, la IDH es IDH2 y la neoactividad del mutante de IDH2 es la neoactividad de 2HG. Las mutaciones en IDH2 asociadas con la neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 172 tales como R172X (por ejemplo, R172K, R172M, R172S, R172G, o R172W). Las mutaciones adicionales en IDH2 asociadas con la neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 140, por ejemplo, R140X (por ejemplo, IDH2R140Q, IDH2R140W, o IDH2R140L) y mutaciones en el residuo 294, por ejemplo V294X (por ejemplo, IDH2V294M).

20 Los métodos de tratamiento descritos en esta memoria pueden comprender la evaluación de una neoactividad del genotipo o fenotipo. Los métodos de obtención y análisis de muestras, y los análisis in vivo en sujetos, se describe en otra parte en la presente memoria, por ejemplo, en la sección titulada "Métodos de evaluación de muestras y / o de sujetos", se pueden combinar con este método.

25 En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye la evaluación del crecimiento, tamaño, peso, capacidad de invasividad, etapa u otro fenotipo del trastorno relacionado con proliferación celular.

30 En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye evaluar el genotipo de neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, el genotipo de 2HG, o fenotipo de neoactividad, por ejemplo, fenotipo de 2HG, por ejemplo, de R-2HG. Evaluar el genotipo de 2HG puede comprender la determinación de si está presente una mutación IDH1 o IDH2 que tenga neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación divulgada aquí que tenga neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Fenotipo de neoactividad, por ejemplo, fenotipo de 2HG, por ejemplo, de R-2HG, por ejemplo, como se utiliza en la presente memoria, se refiere al nivel del producto de neoactividad (es decir, producto de neoactividad del hidroxilo alfa), por ejemplo, el nivel de neoactividad de 2HG, por ejemplo, de R-2HG, por ejemplo, la neoactividad de 2HG, o el nivel de enzima IDH mutante que tiene neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o del ARNm correspondiente). La evaluación puede ser por un método descrito en esta memoria.

40 En una realización, el sujeto puede ser evaluado, antes o después del tratamiento, para determinar si el trastorno relacionado con proliferación celular se caracteriza por un producto de neoactividad, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

45 En una realización, se puede analizar un cáncer, por ejemplo, un glioma o un tumor cerebral en un sujeto, por ejemplo, mediante análisis por formación de imágenes y / o espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, MRI y / o MRS, por ejemplo, antes o después del tratamiento, para determinar si se caracteriza por la presencia de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

50 En una realización, el método comprende la evaluación, por ejemplo, mediante examen o evaluación directa del sujeto, o una muestra del sujeto, o la recepción de tal información acerca del sujeto, el genotipo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, o un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, el fenotipo de 2HG, por ejemplo, R-2HG, del sujeto, por ejemplo, de una célula, por ejemplo, una célula cancerosa, caracterizada por el trastorno relacionado con la proliferación celular. (Como se describe en más detalle en algún lugar en la presente memoria, la evaluación puede ser, por ejemplo, por secuenciación de ADN, análisis de inmunológico, evaluación de la presencia, distribución o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, a partir de análisis espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, medición por MRI y / o MRS, análisis de la muestra tal como análisis de suero o del fluido de la médula espinal, o mediante análisis de material quirúrgico, por ejemplo, por espectroscopia de masa). En las realización, esta información se utiliza para determinar o confirmar que un trastorno relacionado con proliferación, por ejemplo, un cáncer, se caracteriza por un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En ciertas realizaciones esta información se utiliza para determinar o confirmar que un trastorno relacionad con proliferación celular, por ejemplo, un cáncer, se caracteriza por un alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en la presente memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene una mutación, por ejemplo, una His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu en el residuo 132, o un alelo IDH2 que tiene una mutación, por ejemplo, una mutación en el residuo 172 (por ejemplo, un K, M, S, G, o W) o en el residuo 140 (por ejemplo, un Q, W, o L).

- 5 En una realización, antes y / o después de que el tratamiento ha empezado, se evalúa o controla al sujeto por un método descrito en la presente memoria, por ejemplo, el análisis de la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar al sujeto, para seleccionar un inhibidor, o para evaluar la respuesta al tratamiento o avance de la enfermedad.
- 10 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, cáncer de próstata, fibrosarcoma, paraganglioma, cáncer de tiroides folicular, mieloma, cáncer de tiroides, sarcoma, osteosarcoma, neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML), o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico y la evaluación es: evaluación de la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG; o la evaluación de la presencia, distribución, o el nivel de una neoactividad, por ejemplo, la neoactividad de 2HG, de una proteína mutante IDH1 o IDH2.
- 15 En una realización, antes o después que ha empezado el tratamiento, se determina el genotipo de una mutación de IDH asociada con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, una mutación diferente a una mutación en el residuo 132 de IDH1 o diferente de una mutación en el residuo 140 o 172 de IDH2.
- 20 En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 71 de IDH1 asociado con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o ADNc genómico, de una célula afectada.
- 25 En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 100 o 109 de IDH1 asociada con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación diferente a Arg en el residuo 100 o 109, por ejemplo, mediante secuenciación del ADN o ADNc genómico, de una célula afectada.
- 30 En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 70 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70V)), 99 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M)), 130 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M)), 133 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q)), 134 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D)) o 178 (por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I)) asociado con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o ADNc genómico, de una célula afectada.
- 35 En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH2 en el residuo 140 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140W, o R140L), 172 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172 (por ejemplo, R172K, R172M, R172G, R172S, R172W) o 294 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M) asociada con la neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, se determina, por ejemplo, por secuenciación de ADN o ADNc genómico, a partir de una célula afectada.
- 40 En una realización, el trastorno es diferente de un tumor sólido. En una realización el trastorno es un tumor que, al momento del diagnóstico o el tratamiento, no tiene una porción necrótica. En una realización, el trastorno es un tumor en donde al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% de las células del tumor portan una mutación de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad de 2HG, al momento del diagnóstico o el tratamiento.
- 45 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en esta memoria, caracterizado por un mutante somático IDH1 tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el tumor se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, niveles mayores de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 55 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, en donde el tumor se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización, el tumor se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo
- 60
- 65

132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu), o cualquier residuo describe en Yan y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el residuo 132. En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el residuo 132.
- 5 En una realización, el alelo IDH1 tiene una A (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394, o una A (o cualquier otro nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395. En una realización, el alelo es una mutación C394A o G395A de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito aquí, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys.
- 15 En una realización, el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys.
- 20 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 25 En una realización, el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 35 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 u otro aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 otro aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que está caracterizado por niveles no deseados, es decir, mayores, de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 55 En una realización, el trastorno de proliferación celular es fibrosarcoma o paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 60 En una realización, el trastorno de proliferación celular es fibrosarcoma o paraganglioma el donde el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 65 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.
- Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Leu o Pro, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, 2009, Int. J. Cancer, 125: 353-355 en el residuo 132 (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu), de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132, específicamente, Cys.
- En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394, o un A (o cualquier otro nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395. En una realización, el alelo es una mutación C394T o G395A de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.

- 5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 15 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 20 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 30 En una realización, el alelo IDH1 que codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 u otro diferente de Arg en el residuo 109.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 45 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un cáncer hematológico, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML, o ALL, en donde el cáncer hematológico se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo.
- 50 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia linfoblástica aguda (algunas veces denominada aquí como ALL) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. La ALL puede ser, por ejemplo, B-ALL o T-ALL. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, en el residuo 132 (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu), de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el residuo 132.
- 55 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
- 60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizado por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
- 65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto con ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en un cáncer que se está siendo caracterizado por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene lle mentira en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene lle en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 10 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 u otro aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 u otro aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 20 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles indeseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo R-2HG.
- En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es la leucemia mielógena aguda (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia mielógena aguda (algunas veces denominada en la presente memoria como AML) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, en el residuo 132 (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu), de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, específicamente, Cys.
- 25 30 35 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML), caracterizada por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys, His, Leu o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, por ejemplo, Cys. En una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de lle en el residuo 99 (SEQ ID NO: 8), por ejemplo, el alelo que codifica Met en el residuo 99.
- 45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) con base en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys, His Leu o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, por ejemplo, Cys; o un alelo IDH1 que tiene Met en el residuo 99.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML), con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de los niveles, de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 55 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene lle en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene lle en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 65 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente del aminoácido Arg en el residuo 109.

- 5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente del aminoácido Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 15 En una realización el método comprende además la evaluación del sujeto por la presencia de una mutación en el gen NRAS o NPMc.
- 20 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, por ejemplo, en donde la mielodisplasia o el síndrome mielodisplásico se caracteriza por tener un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el trastorno se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val o Leu; por ejemplo, Ser, Cys, Gly, o Leu), de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el residuo 132.
- 25 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.
- 30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico con base en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 40 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico en donde el trastorno se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el trastorno que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 55 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico en donde el trastorno se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un IDH1 alelo diferente del aminoácido Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico con base en el trastorno que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- En una realización, el trastorno es cáncer de tiroides. En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides en donde el cáncer de tiroides se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene una mutación en el residuo 70, 130, 133, 134, o 178 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, G70D, I130M, H133Q, A134D o V178I).
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides, con base en el

cáncer de tiroides que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un IDH1 alelo que tiene la mutación en el residuo 70, 130, 133, 134, o 178 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, G70D, I130M, H133Q, A134D o V178I).

5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el trastorno es cáncer folicular de tiroides o mieloma. En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides folicular o mieloma, con base en el cáncer folicular de tiroides o mieloma que se caracteriza por niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una  
10 realización, el trastorno es neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML).

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene neoplasias mieloproliferativas en donde las neoplasias mieloproliferativas se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un  
15 alelo IDH1 que tiene una mutación en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, R132C o R132G).

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene neoplasias mieloproliferativas, con base en las neoplasias mieloproliferativas que se caracterizan por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por  
20 ejemplo, un alelo IDH1 que tiene la mutación en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, R132C o R132G).

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene neoplasias mieloproliferativas, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

25 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un glioma, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con un neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, por ejemplo, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID  
30 NO: 10 (véase también la Fig. 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140.

35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo Lys, Gly, Met, Trp o Ser; o Lys o Met (por ejemplo, Lys o Met); o un alelo que tiene IDH2 Gln o Trp en el residuo 140 (SEQ ID NO: 10).

40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el residuo 172 ( SEQ ID NO: 10), por ejemplo, Lys, Gly, Met, Trp o Ser; o Lys o Met (por ejemplo, Lys o Met); o un alelo IDH2 que tiene Gln o Trp en el residuo 140 (SEQ ID NO: 10).

45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, caracterizado por una mutación o un alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con un neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por  
50 ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, por ejemplo, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172.

55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

- 5 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172.
- 10 En una realización, el procedimiento comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en la presente memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).
- 15 En una realización, el procedimiento comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).
- 20 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 25 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es AML, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), por ejemplo, Lys, Gly, Met, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, el alelo codifica un Gln o Leu en el residuo 140).
- 30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo Lys. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, el alelo codifica un Gln o Leu en el residuo 140).
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo, Lys. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, el alelo codifica un Gln o Leu en el residuo 140).
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 45 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172 o diferente de Arg en el residuo 140. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, por ejemplo, Lys, Gly, Met, o Ser, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Leu (L) o Gln (Q) en el residuo 140.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10); o un alelo que IDH2 que tiene Leu o Gln en el residuo 140.
- 55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10); o un alelo IDH2 que tiene Leu o Gln en el residuo 140.
- 60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 65

- 5 En una realización, el trastorno es melanoma. En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es melanoma, que se caracteriza por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 294. Por ejemplo, el alelo codifica Met en el residuo 294 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22).
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene el melanoma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Met en el residuo 294 (SEQ ID NO: 10).
- 15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene melanoma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Met en el residuo 294 (SEQ ID NO: 10).
- 20 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene melanoma, con base en el cáncer que se caracteriza por no niveles deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 25 En una realización, el trastorno es neoplasia mieloproliferativa (por ejemplo, CML). En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es neoplasia mieloproliferativa (por ejemplo, CML), caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 o 172. Por ejemplo, el alelo codifica Trp (W) en el residuo 140 o un alelo que codifica Gly (G) en el residuo 172 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22).
- 30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene neoplasia mieloproliferativa (por ejemplo, CML), en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Trp en el residuo 140 o Gly en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene neoplasia mieloproliferativa (por ejemplo, CML), con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Trp en el residuo 140 o Gly en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).
- 40 En una realización, un producto de la neoactividad es 2HG (por ejemplo, R-2HG), que actúa como un metabolito. En otra realización, un producto de la neoactividad es 2HG (por ejemplo, R-2HG), que actúa como una toxina, por ejemplo, un carcinógeno.
- 45 En algunas realizaciones, los métodos descritos en esta memoria pueden resultar en efectos secundarios reducidos con relación a otros métodos conocidos del tratamiento del cáncer.
- 50 Los agentes y métodos terapéuticos de evaluación del sujeto descritos en la presente memoria se pueden combinar con otras modalidades terapéuticas, por ejemplo, con tratamientos conocidos en la técnica.
- 55 En una realización, el método comprende proporcionar un segundo tratamiento, al sujeto, por ejemplo, remoción quirúrgica, irradiación o administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, una administración de un agente de alquilación. La administración (o el establecimiento de niveles terapéuticos) del segundo tratamiento pueden: empezar antes del comienzo del tratamiento con (o antes del establecimiento de los niveles terapéuticos de) el inhibidor; empezar después del comienzo del tratamiento con (o después del establecimiento de niveles terapéuticos de) el inhibidor, o se puede administrar simultáneamente con el inhibidor, por ejemplo, para lograr niveles terapéuticos de ambos al mismo tiempo.
- 60 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, y la segunda terapia comprende la administración de uno o más de: radiación; un agente de alquilación, por ejemplo, temozolomida, por ejemplo, Temoader®, o BCNU; o un inhibidor de tirosina quinasa HER1/EGFR, por ejemplo, erlotinib, por ejemplo, Tarceva®.
- 65 La segunda terapia, por ejemplo, en el caso de glioma, puede comprender la implantación de BCNU o carmustina en el cerebro, por ejemplo, implantación de una oblea de Gliadel®.
- La segunda terapia, por ejemplo, en el caso de glioma, puede comprender la administración de imatinib, por ejemplo, Gleevec®.
- En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es cáncer de próstata y la segunda terapia comprende uno o más de: ablación de andrógenos; administración de un estabilizador de microtúbulos, por ejemplo, docetaxol, por ejemplo, Taxotere®; o la administración de un inhibidor de topoisomerasa II, por ejemplo, mitoxantrona.



Los ejemplos de donantes de enlaces de hidrógeno incluyen grupos hidroxilo y amino. Un ejemplo de un aceptor de enlaces de hidrógeno es un carbonilo.

5 En una realización, el análogo estructural celular del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, es un metabolito, por ejemplo, glutamato o cetoglutarato alfa.

10 En una realización, la competencia comprende competencia entre el producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, y un análogo estructural celular del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, cetoglutarato alfa, por la interacción con un componente celular, por ejemplo, una proteína celular, por ejemplo, una enzima. En una realización, la interacción puede comprender el enlazamiento con el componente celular. En una realización, la interacción puede comprender modificación, por ejemplo, modificación covalente, de uno o más de: el producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG; un análogo estructural celular del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, cetoglutarato alfa; o el componente celular, por ejemplo, una proteína celular, por ejemplo, una enzima. En una realización, la modificación es catalizada o mediada por el componente celular. Por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, puede competir con cetoglutarato alfa, por la modificación del cetoglutarato alfa, por el componente celular, por ejemplo, una enzima.

20 En una realización, el mayor nivel del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, altera la función celular, por ejemplo, el metabolismo celular o la función mitocondrial, mediante la competencia con componentes celulares que son estructuralmente similares al producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, para el acceso a los sustratos.

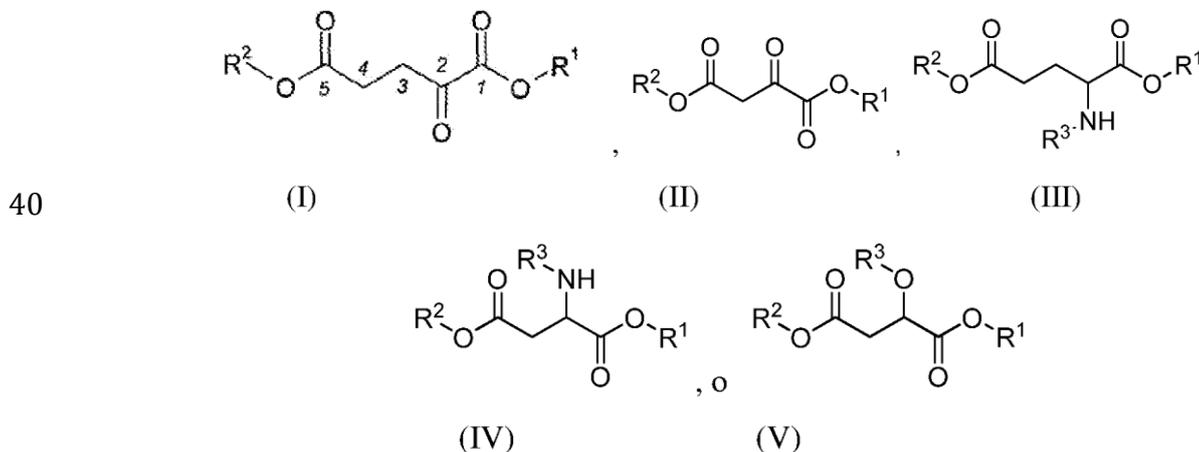
25 En una realización, el tratamiento comprende la administración de un compuesto, por ejemplo, un compuesto descrito en esta memoria, que es un análogo estructural celular de origen natural de 2HG, por ejemplo, R-2HG, o un profármaco del análogo estructural celular de origen natural.

30 Los compuestos adecuados comprenden, por ejemplo, un metabolito, por ejemplo, glutamato o cetoglutarato alfa, o un profármaco de los mismos. En una realización, el compuesto compite con 2HG, por ejemplo, R-2HG, por el enlazamiento con una enzima. Los ejemplos de enzimas comprenden prolil hidroxilasa celular, una dioxigenasa, y una histona desmetilasa tal como un miembro de la familia JHDM.

En una realización, el análogo estructural celular del producto neoactivo del hidroxilo alfa, o un profármaco del mismo, es un compuesto de la fórmula siguiente:



en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y n son como se describen en la presente memoria. El ejemplo estructural de un producto neoactivo del hidroxilo alfa, o profármaco del mismo, es un compuesto de Fórmula I, II, III, IV o V:



45 en donde R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>3</sup> son como se definen en la presente memoria.

En una realización, el tratamiento comprende la administración de un compuesto que reduce los niveles celulares del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, mediante la degradación o metabolización del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Por ejemplo, el tratamiento puede comprender la administración de un cofactor para una enzima que

metaboliza el producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, la administración de FAD (flavina adenina dinucleótido), o un precursor del mismo, por ejemplo, riboflavina, o un análogo de FAD, el cofactor para 2HG deshidrogenasa.

5 En una realización, el agente terapéutico secuestra un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, inactiva un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o aumenta la conversión metabólica de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, con otro producto. Por ejemplo, tal tratamiento puede incluir la administración de un anticuerpo, aptámero o molécula pequeña que se enlaza con e inactiva un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o la administración de una enzima, o un ácido nucleico que codifica una enzima, que convierte un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG en otro compuesto. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto una deshidrogenasa, por ejemplo, 2HG deshidrogenasa, o un gen que la codifica, o un tratamiento que aumenta su actividad.

15 En un aspecto, se describe un método de tratamiento de un sujeto con AML o MDS caracterizado por i) la presencia de un IDH mutante que tiene neoactividad de 2HG o ii) niveles elevados de 2HG, comprendiendo el método la administración al sujeto que requiera del mismo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de hipometilación, para tratar así al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que no tiene o no se le ha diagnosticado que tiene aciduria 2-hidroxiglutarica. En algunas realizaciones, el agente de hipometilación es decitabina (5-aza-desoxicitidina), zebularina, isotiocianatos, azacitidina (5-azacitidina), 5-flouro-2'-desoxicitidina, o 5,6-dihidro-5-azacitidina.

25 Se describe un método de evaluación, por ejemplo, diagnóstico de un sujeto, por ejemplo, de un sujeto que no tiene, o no se le ha diagnosticado que la tiene, aciduria 2-hidroxiglutarica. El método comprende el análisis de un parámetro relacionado con el genotipo o fenotipo de neoactividad del sujeto, por ejemplo, el análisis de uno o más de:

30 a) la presencia, distribución, o el nivel de un producto de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, un mayor nivel del producto, 2HG, por ejemplo, R-2HG (como se utiliza en esta memoria, un mayor nivel de un producto de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o un término similar, por ejemplo, un mayor nivel de un producto neoactivo o de producto de neoactividad, significa un aumento en comparación con una referencia, por ejemplo, el nivel observado en una célula por lo demás similar que carece de la mutación de IDH, por ejemplo, la mutación IDH1 o IDH2, o en un tejido o producto de un sujeto que no lo tiene);

35 b) la presencia, distribución, o el nivel de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, de una proteína mutante IDH1 o IDH2;

40 c) la presencia, distribución, o el nivel de una proteína mutante IDH neoactiva, por ejemplo, una proteína mutante IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad 2HG, o un ARN correspondiente; o

45 d) la presencia de un alelo o mutación somática seleccionada que confiere neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que codifica una proteína IDH con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un alelo descrito en esta memoria, en células caracterizadas por un trastorno relacionado con proliferación celular del sujeto,

evaluando así al sujeto.

50 En una realización, el análisis comprende la realización de un procedimiento, por ejemplo, una prueba, para proporcionar datos o información sobre uno o más de a-d, por ejemplo, llevando a cabo un método que resulta en un cambio físico en una muestra, en el sujeto, o en un dispositivo o reactivo utilizado en el análisis, o que resulta en la formación de una imagen representativa de los datos. Los métodos para obtener y analizar muestras y el análisis in vivo en sujetos, descritos en otra parte en esta memoria, por ejemplo, en la sección titulada "Métodos de evaluación de muestras y / o sujetos", se pueden combinar con este método. En otra realización, el análisis comprende el recibo de datos o de información a partir de tal prueba de un tercero. En una realización, el análisis comprende el recibo de datos o información de dicha prueba de otro tercero y, el método comprende, la respuesta a los datos o información administrando un tratamiento al sujeto.

60 Como se describe en la presente memoria, se puede utilizar la evaluación en una cantidad de aplicaciones, por ejemplo, para diagnóstico, pronóstico, estadificación, determinación de la eficacia del tratamiento, selección de la patente, o selección del fármaco.

65 Por lo tanto, en una realización, el método comprende además, por ejemplo, la sensibilidad al análisis de uno o más de a-d:

el diagnóstico del sujeto, por ejemplo, el diagnóstico del sujeto que tiene un trastorno relacionado con proliferación

- celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por a proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;
- 5 la estadificación del sujeto, por ejemplo, la determinación de la etapa de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;
- 10 proporcionar un pronóstico para el sujeto, por ejemplo, proporcionando un pronóstico para un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;
- 15 determinar la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, la eficacia de un agente quimioterapéutico, irradiación o cirugía;  
determinar la eficacia de un tratamiento con un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor, descrito en esta memoria;
- 20 seleccionar al sujeto para un tratamiento por un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso. La selección puede basarse en la necesidad de reducir la neoactividad del hidroxilo alfa o la necesidad de mejora una condición asociada con o resultante de neoactividad del hidroxilo alfa. Por ejemplo, si se determina que el sujeto tiene un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso caracterizado por niveles no deseado, es decir, mayores de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o por un IDH1 o IDH2 mutante, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, la selección del sujeto para el tratamiento con un agente terapéutico descrito en esta memoria, por ejemplo, un inhibidor (por ejemplo, una molécula pequeña o un inhibidor con base en ácido nucleico) o la neoactividad de ese mutante (por ejemplo, conversión de cetoglutarato alfa en 2HG, por ejemplo, R-2HG);
- 25 la correlación del análisis con un resultado o un pronóstico;
- 30 proporcionar un valor para un análisis en el cual se basa la evaluación, por ejemplo, el valor para un parámetro correlacionado con la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;
- 35 proporcionar una recomendación para el tratamiento del sujeto; o
- 40 memorizar un resultado del método, por ejemplo, una medición hecha en el trascurso de la realización del método, y opcionalmente transmitir la memorización a un tercero, por ejemplo, el sujeto, un proveedor de salud, o una entidad que paga para el tratamiento del sujeto, por ejemplo, un gobierno, una compañía de seguros, u otra tercera parte pagadora.
- 45 Como se describe en esta memoria, la evaluación puede proporcionar información sobre la cual se basan una cantidad de decisiones o tratamientos.
- 50 Por lo tanto, en una realización, el resultado de la evaluación, por ejemplo, un nivel no deseado, es decir, aumentado de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, la presencia de una neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, la presencia de una proteína mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, (o el ARN correspondiente) que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, la presencia de un alelo mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un alelo divulgado en la presente memoria, es indicativa de:
- 55 un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, es indicativo de una lesión primaria o metastásica;
- la etapa de un trastorno relacionado con proliferación celular;
- 60 un pronóstico o resultado de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, es indicativo de una forma menos agresiva del trastorno, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, en el caso de glioma, la presencia de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, puede indicar una forma menos agresiva del cáncer;
- la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, la eficacia de un agente quimioterapéutico, irradiación o cirugía;
- 65 la necesidad de una terapia descrita en esta memoria, por ejemplo, inhibición de la neoactividad de un mutante inactivo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria. En una realización, los niveles relativamente altos (o la presencia del mutante) se correlacionan con la necesidad de la inhibición de una neoactividad de una IDH,

por ejemplo, mutante IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria; o

5 sensibilidad a un tratamiento. El resultado se puede utilizar como un biomarcador no invasivo para una respuesta clínica. Por ejemplo, los niveles elevados pueden ser predictivos de un resultado mejor en pacientes con glioma (por ejemplo, mayor expectativa de vida).

Como se describe aquí, la evaluación puede proporcionar permitir la selección de un sujeto.

10 Por lo tanto, en una realización el método comprende, por ejemplo, la sensibilidad al análisis de uno o más de a-d, la selección de un sujeto, por ejemplo, para un tratamiento. El sujeto puede ser seleccionado con base en lo descrito en esta memoria, por ejemplo, con base en:

15 estando dicho sujeto en riesgo de, o que tiene, niveles superiores a los normales, dijo es decir, mayores de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2-hidroxiglutarato (por ejemplo, R-2HG) en una célula que tiene un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, una leucemia, tal como AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, o una lesión tumoral, por ejemplo un glioma o un tumor de próstata;

20 teniendo dicho sujeto un trastorno relacionado con proliferación caracterizado por un alelo IDH seleccionado, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una mutación IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG;

teniendo dicho sujeto un alelo IDH seleccionado, por ejemplo, un alelo IDH1 o IDH2 seleccionado; que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG;

25 teniendo dicho sujeto un trastorno relacionado con proliferación;

estando dicho sujeto con necesidad de, o siendo capaz de beneficiarse de, un agente terapéutico de un tipo descrito en esta memoria, dijo;

30 estando dicho sujeto con necesidad de, o siendo capaz de beneficiarse de, un compuesto que inhibe la neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG;

35 estando dicho sujeto con necesidad de, o siendo capaz de beneficiarse de, un compuesto que disminuye el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;

estando dicho sujeto con necesidad de, o siendo capaz de beneficiarse de, un agente antiglicolítico o un anti-oxidante, por ejemplo, para mejorar los efectos de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa no deseado, es decir, aumentado, por ejemplo, 2HG por ejemplo, R-2HG; o

40 estando dicho sujeto con necesidad de, o siendo capaz de beneficiarse de un tratamiento que mejora un efecto de la competición de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, con un componente celular, por ejemplo, cetoglutarato alfa, por interacción con un componente celular.

45 En una realización, la evaluación comprende la selección del sujeto, por ejemplo, por tratamiento con un agente antineoplásico, en el establecimiento de, o la determinación de que, el sujeto tiene un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, no deseado, es decir, aumentado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o neoactividad del hidroxilo alfa no deseada, es decir, aumentada, por ejemplo, neoactividad de 2HG, o que el sujeto requiere la inhibición de una neoactividad de un mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria.

50 Como se describe en esta memoria, las evaluaciones proporcionadas por los métodos descritos aquí permiten la selección de regímenes de tratamiento óptimos.

55 Por lo tanto, en una realización el método comprende, por ejemplo, la sensibilidad al análisis de uno o más de a-d, la selección de un tratamiento para el sujeto, por ejemplo, la selección de un tratamiento con base en lo divulgado en esta memoria. El tratamiento puede ser la administración de un agente terapéutico divulgado en la presente memoria. El tratamiento se puede seleccionar con base en que:

60 es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizada por uno o más de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, una proteína mutante IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente);

65 es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un alelo o mutación somática seleccionada de un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que codifica una proteína con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un alelo divulgado en la presente memoria, en células caracterizadas por un trastorno relacionado con proliferación celular de un sujeto;

- reduce el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;
- reduce el nivel de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG;
- 5 es útil en el tratamiento de un cáncer que tiene daño mitocondrial asociado con mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa no deseado, es decir, aumentado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, y es por ejemplo, un agente antiglicolítico o un antioxidante; o
- 10 es útil en el tratamiento de un cáncer que tiene niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, que compiten con un componente celular, por ejemplo, cetoglutarato alfa, por interacción con un componente celular.
- En una realización, la evaluación comprende la selección del sujeto, por ejemplo, para el tratamiento.
- 15 En las realizaciones, el tratamiento es la administración de un agente terapéutico descrito en esta memoria.
- Los métodos también pueden incluir el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, con un tratamiento seleccionado en respuesta a, o con base en una evaluación hecha en el método.
- 20 Por lo tanto, en una realización, el método comprende, por ejemplo, la sensibilidad al análisis de uno o más a-d, la administración de un tratamiento al sujeto, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico de un tipo descrito en la presente memoria.
- 25 En una realización, el agente terapéutico comprende un compuesto de la Tabla 24a o de la Tabla 24b o un compuesto que tiene la estructura de la Fórmula (X) o (XI) descrita más adelante, o un compuesto como se describe en la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/365.072.
- 30 En una realización, el agente terapéutico comprende un ácido nucleico, por ejemplo, ARNbc, por ejemplo, un ARNbc descrito en esta memoria.
- 35 En una realización, el agente terapéutico es un análogo estructural celular de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, de un profármaco del mismo, por ejemplo, como se describe en la sección titulada "Análogos estructurales celulares de productos de neoactividad, y profármacos de los mismos" en otra parte en la presente memoria.
- 40 En una realización, el agente terapéutico es un agente antiglicolítico, por ejemplo, un agente anti-glicolítico descrito en la sección titulada "compuestos antiglicolíticos" en esta memoria.
- 45 En una realización, el agente terapéutico es un antioxidante, por ejemplo, un agente antioxidante descrito en la sección titulada "Antioxidantes" en la presente memoria.
- 50 En una realización, el agente terapéutico es un agente hipometilante, por ejemplo, un agente de hipometilación descrito en la sección titulada "Agentes de hipometilación" en la presente memoria.
- 55 En una realización, el agente terapéutico disminuye la afinidad de una proteína mutante neoactiva de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2 por NADH, NADPH o un ión metálico divalente, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  o disminuye los niveles o disponibilidad de NADH, NADPH o de un ión metálico divalente, por ejemplo,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , por ejemplo, mediante la competición por el enlazamiento con la enzima mutante. En una realización, la enzima es inhibida reemplazando  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  con  $Ca^{2+}$ .
- 60 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de una neoactividad de una IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- 65 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante que tiene una neoactividad de un mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.

- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que:
- 5       inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
- inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- 10       En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que se selecciona con base en que:
- inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en la presente memoria, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
- 15       inhibe tanto la actividad de tipo silvestre y como la neoactividad de un IDH1, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de una proteína o un ARNm de IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2.
- 20       En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, el ARNm de IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2.
- 25       En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con, la proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de actividad de la enzima IDH neoactiva, por ejemplo, mediante interacción con, por ejemplo, enlazamiento con, proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2. En una realización, el inhibidor es diferente a un anticuerpo.
- 30       En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 mutante y reduce la interacción entre el residuo N96 o S94 con cetoglutarato alfa.
- 35       En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 y provoca una alteración en las posiciones de N96 o S94 del IDH1 mutante.
- En una realización, el inhibidor se enlaza con IDH1 y provoca una alteración en la posición del residuo Y139.
- 40       En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se enlaza con el ARN mutante, por ejemplo, ARNm IDH1 o IDH2 mutante.
- En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza, ya sea con la proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, o interactúa directamente con, por ejemplo, se enlaza con el ARNm de IDH mutante, por ejemplo, ARNm de IDH1 o IDH2.
- 45       En una realización se administra el agente terapéutico.
- 50       En una realización, el tratamiento: inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de IDH1 o IDH2; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de IDH1 o IDH2. En una realización, el sujeto es evaluado o controlado posteriormente por un método descrito en la presente memoria, por ejemplo, el análisis de la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, para evaluar la respuesta al tratamiento o el avance de la enfermedad.
- 55       En una realización, el tratamiento se selecciona con base en que: inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de IDH1 o IDH2, por ejemplo, neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria.
- 60       En una realización, el método comprende la determinación de la posibilidad de una mutación diferente de una mutación en IDH1 o en IDH2. En formas de realización, un nivel relativamente alto de 2HG, por ejemplo, R-2HG es indicativo de otra mutación.
- 65       En una realización, en donde la realización incluye la selección o administración de un tratamiento para el sujeto, el sujeto:
- no ha sido aún tratado el sujeto para el trastorno relacionado con proliferación celular y el tratamiento seleccionado o

- administrado es el tratamiento inicial o de primera línea;
- 5 ya ha sido tratado para el trastorno relacionado con proliferación celular relacionada y el tratamiento seleccionados o administrados resulta en una alteración del tratamiento existente;
- ya ha sido tratado para el trastorno relacionado con proliferación celular, y el tratamiento seleccionados resulta en una continuación del tratamiento existente; o
- 10 ya ha sido tratado por el trastorno relacionado con proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado es diferente, por ejemplo, en comparación con aquel que se administró antes de la evaluación o que sería administrado en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 15 En una realización, cuya realización incluye la selección o administración de un tratamiento para el sujeto, el tratamiento seleccionado o administrado puede comprender:
- un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico en diferente, por ejemplo, en diferentes dosis, por ejemplo, una dosis mayor (o menor) (por ejemplo, diferente en comparación con aquella administrada antes de la evaluación o con aquella que sería administrada en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG);
- 20 un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico con diferente frecuencia, por ejemplo, más o menos frecuentemente, o para nada (por ejemplo, diferente en comparación con aquella que fue administrada antes de la evaluación o que sería administrada en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG); o
- 25 un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico en un entorno terapéutico diferente (por ejemplo, adición o supresión de un segundo tratamiento el régimen de tratamiento) (por ejemplo, diferente en comparación con aquel que fue administrado antes de la evaluación o que sería administrado en la ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG).
- 30 Los métodos de evaluación de un sujeto descritos en esta memoria pueden comprender la evaluación de un genotipo o fenotipo de neoactividad. Los métodos ara obtener y analizar muestras, y el análisis in vivo en sujetos, descrito en otra parte en esta memoria, por ejemplo, en la sección titulada "Métodos de evaluación de muestras y / o sujetos", pueden combinarse con este método.
- 35 En una realización el método comprende:
- someter al sujeto (por ejemplo, un sujeto que no tiene aciduria 2-hidroxiglutarica) a un análisis con formación de imágenes y / o espectroscópico, por ejemplo, l análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, MRI y / o MRS por ejemplo, análisis de imágenes, para proporcionar una determinación de la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, como el asociado con un tumor, por ejemplo, un glioma, en el sujeto;
- 40 almacenar opcionalmente un parámetro relacionado con la determinación, por ejemplo, la imagen o un valor relacionado con la imagen del análisis de imágenes, en un medio tangible; y
- 45 sensible a la determinación, realizando uno o más de: correlacionar la determinación con un resultado o con un pronóstico; proporcionar una indicación del resultado o pronóstico; proporcionar un valor para un análisis en el cual se basa la evaluación, por ejemplo, la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;
- 50 proporcionar una recomendación para el tratamiento del sujeto; seleccionar el curso de tratamiento para el sujeto, por ejemplo, un curso de tratamiento descrito en la presente memoria, por ejemplo, seleccionar el curso del tratamiento que incluye la inhibición de una neoactividad de un alelo IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrito en esta memoria; administrar un curso de tratamiento al sujeto, por ejemplo, un curso de tratamiento descrito en esta memoria, por ejemplo, un curso de tratamiento que incluye la inhibición de una neoactividad de un alelo IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria; y memorizar un resultado del método o una medición hecha en el curso del método, por ejemplo, una o más de las memorias anteriores y / o de transmisión de uno o más de los anteriores a un tercero, por ejemplo, el sujeto, un proveedor de salud o una entidad que paga por el tratamiento del sujeto, por ejemplo, un gobierno, una compañía de seguros, o un tercer pagador.
- 55
- 60
- 65 En una realización el método comprende la confirmación o determinación, por ejemplo, mediante examen o evaluación directa del sujeto, o una muestra, por ejemplo, tejido, producto (por ejemplo, heces, sudor, semen, exhalación, cabello o uñas), o fluido corporal (por ejemplo, sangre (por ejemplo, plasma sanguíneo), orina, linfa, o

- 5 fluido cefalorraquídeo u otra muestra de otro origen descrito en esta memoria) del mismo, (por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o análisis inmunológico o evaluación de la presencia, distribución o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG), o recibir tal información el sujeto, que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por un alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8) o un alelo IDH2 que tiene una mutación en el residuo 172 o 140 tal como una mutación descrita en esta memoria.
- 10 En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye la evaluación del crecimiento, tamaño, peso, invasividad, etapa u otro fenotipo del trastorno relacionado con proliferación celular.
- 15 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, cáncer de próstata, o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, cáncer de tiroides, tal como cáncer folicular de tiroides, fibrosarcoma, paraganglioma, mieloma, melanoma, neoplasias mieloproliferativas tales como CML y la evaluación es a o b. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra, por ejemplo, una muestra descrita en esta memoria, por ejemplo, un tejido, por ejemplo, una muestra de cáncer, o un fluido corporal, por ejemplo, suero o sangre, para un mayor producto de neoactividad alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 20 En una realización, el tumor es diferente de un tumor del SNC, por ejemplo, diferente de un glioma, y el análisis incluye la determinación de la secuencia de una mutación en la posición 132 de IDH1, o una mutación en la posición 172 de IDH2. Por ejemplo, se puede determinar la secuencia de IDH1 en cualquiera de las posiciones 70, 71, 100, 109, 130, 132, 133, 134, o 178, por ejemplo, para detectar la presencia de una mutación que tiene neoactividad de 2HG. En una realización, el tumor es un glioma y se determina la presencia de una mutación neoactiva de 2HG de IDH1 diferente de una mutación en 132 de IDH1. En una realización, el tumor es un glioma y se determina la presencia de una mutación neoactiva de 2HG de IDH1 diferente de una mutación en 172 en IDH2, por ejemplo, una mutación ya sea en 140 o en 294.
- 25 En una realización, se somete un sujeto a MRS y la evaluación comprende la evaluación de la presencia o la cantidad elevada de un pico correlacionado con o correspondientes a 2HG, por ejemplo, R-2HG, como el determinado por resonancia magnética. Por ejemplo, se puede analizar un sujeto por la presencia y / o la fuerza de una señal aproximadamente en 2,5 ppm para determinar la presencia y / o la cantidad de 2HG, por ejemplo, R-2HG en el sujeto.
- 30 En una realización, el método comprende obtener de una muestra del sujeto y analizar la muestra, o analizar al sujeto, por ejemplo, mediante la obtención de imágenes del sujeto y opcionalmente, formar una representación de la imagen en un ordenador.
- 35 En una realización, los resultados del análisis se comparan con una referencia.
- 40 En una realización se determina un valor de un parámetro correlacionado con la presencia, distribución, o nivel, por ejemplo, de 2HG, por ejemplo, R-2HG. Se puede comparar con un valor de referencia, por ejemplo, el valor de un sujeto de referencia que no tiene presencia, nivel o distribución anormal, por ejemplo, una célula de un sujeto de referencia que no tiene una mutación en IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene una neoactividad descrita en la presente memoria.
- 45 En una realización el método comprende determinar si está presente un alelo mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que está asociado con neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en el caso de IDH1, se puede determinar la presencia de una mutación en el residuo 132 asociado con neoactividad de 2HG.
- 50 En una realización, se puede determinar la presencia de una mutación en el residuo 71 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 55 En una realización, se puede determinar la presencia de una mutación en el residuo 100 o 109 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o 109.
- 60 En una realización, se puede determinar la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 70 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D)), 99 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M)), 130 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M)), 133 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q)), 134 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D)) o 178 (por ejemplo, una mutación que tiene un residuo que no sea una Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I)) asociado con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En el caso de IDH2, se puede determinar la presencia de un mutación en el residuo 140, 172, o 294 (por ejemplo, 172) asociada con neoactividad de 2HG. La
- 65

determinación puede comprender la secuenciación de un ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ADNc genómico, de una célula afectada, que codifica el(los) aminoácido(s) relevante(s). La mutación puede ser una supresión, inserción, reordenamiento, o sustitución. La mutación puede involucrar un solo nucleótido, por ejemplo, una sola sustitución, o más de un nucleótido, por ejemplo, una supresión de más de un nucleótido.

5

En una realización, el método comprende la determinación de la secuencia en la posición 394 o 395 del gen de IDH1, o la determinación de la identidad del residuo aminoácido 132 (SEQ ID NO: 8) en el gen de IDH1 y en una célula caracterizada por el trastorno relacionado con proliferación celular.

10

En una realización, el método comprende, por ejemplo, la etapa d que comprende, la determinación del genotipo de una mutación de IDH asociada con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, diferente de una mutación en el residuo 132 de IDH1 o diferente de una mutación en el residuo 172 de IDH2.

15

En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 100 o 109 de IDH1 asociado con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutación diferente de un Arg en el residuo 100 o 109, por ejemplo, mediante la secuenciación del ADN o ADNc genómico, de una célula afectada.

20

En una realización, se determina la presencia de una mutación IDH1 en el residuo 70 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D)), 99 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M)), 130 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 130 (por ejemplo, H130M)), 133 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 133 (por ejemplo, A133D)), 134 (por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 134 (por ejemplo, V134I)), o 178 (por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I)) asociado con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o ADNc genómico, de una célula afectada.

25

En una realización, el método comprende la determinación de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN, en la posición 140, 172, o 294 (por ejemplo, 140 o 172) del gen de IDH2 en una célula caracterizada por la proliferación celular relacionada con el trastorno.

30

En una realización, un producto de la neoactividad es 2-HG, por ejemplo, R-2HG, que actúa como un metabolito. En otra realización, un producto de la neoactividad es 2HG, por ejemplo, R-2HG, que actúa como una toxina, por ejemplo, un carcinógeno.

35

En una realización, el trastorno es diferente de un tumor sólido. En una realización el trastorno es un tumor que, en el momento del diagnóstico o el tratamiento, no tiene una porción necrótica. En una realización el trastorno es un tumor en el cual al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90% de las células del tumor portan una mutación del IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad de 2HG, al momento del diagnóstico o el tratamiento.

40

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en esta memoria, caracterizado por una mutación somática IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el tumor se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo.

45

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

50

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, en donde el tumor se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización, el tumor se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo describe en Yan y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el residuo 132. En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el residuo 132.

55

60

En una realización, el alelo IDH1 tiene una A (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394, o un A (o cualquier otro nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395. En una realización, el alelo es una mutación C394A, C394G, C394T, G395C, G395T o G395A, específicamente una mutación C394A o G395A de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.

65

- 5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro, o Leu en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys).
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys).
- 15 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 20 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 30 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 50 En una realización, el trastorno de proliferación celular es fibrosarcoma en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 55 En una realización, el trastorno de proliferación celular es fibrosarcoma en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 60 En una realización, el trastorno de proliferación celular es fibrosarcoma en donde el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 65 En una realización, el trastorno de proliferación celular es paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys o His en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- En una realización, el trastorno de proliferación celular es paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys o His en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- En una realización, el trastorno de proliferación celular es paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo.
- Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Leu o Pro, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, 2009, Int. J. Cancer, 125: 353-355 en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). (Por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val o Leu). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132.

- 5 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394, o una A (o cualquier otro nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395. En una realización, el alelo es una mutación C394T o G395A de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
- 10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 20 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 35 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 55 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un cáncer hematológico, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML, o ALL, en donde el cáncer hematológico se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, una mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra de suero o de sangre por un producto aumentado neoactividad alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 60 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, una forma pediátrica o adulta), por ejemplo, en donde la leucemia linfoblástica aguda (algunas veces denominada aquí como ALL) se caracteriza por una mutación somática IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. La ALL puede ser, por ejemplo, B-ALL o T-ALL. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21) (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el residuo 132.
- 65 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizado por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto con ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).

5 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).

15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).

20 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.

25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.

30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.

35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra, por ejemplo, una muestra de suero o de sangre, para un producto de neoactividad alfa aumentada, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

40 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es leucemia mielógena aguda (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia mielógena aguda (algunas veces denominada aquí como AML) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el cáncer se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21) (por ejemplo, His, Ser, Cys, Gly, Val o Leu). En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser, Cys, Leu, o His en el residuo 132. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 99 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, I99M). En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.

45 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML), caracterizada por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, por ejemplo, Cys.

55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) con base en un cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8, específicamente, Cys.

60 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML), con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra, por ejemplo, una muestra de suero o de sangre, para un producto de neoactividad alfa aumentado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

65 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML en donde el cáncer se caracteriza

## ES 2 594 402 T3

- por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 10 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 20 En una realización, el método comprende además la evaluación del sujeto por la presencia de una mutación en el gen NRAS o NPMc.
- 25 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, por ejemplo, en donde la mielodisplasia o el síndrome mielodisplásico se caracteriza por tener un mutante somática IDH1 que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, el trastorno se caracteriza por mayores niveles de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, comparado con las células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo descrito en Kang y colaboradores, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21), por ejemplo, Ser, Cys, Gly, o Leu. En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el residuo 132.
- 30 En una realización, el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394. En una realización, el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5.
- 35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.
- 40 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico con base en un cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 45 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico en donde el trastorno se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el trastorno que se caracterizan por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene Ile en el residuo 71 (SEQ ID NO: 8).
- 60 En una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- 65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico en donde el trastorno se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un IDH1 alelo diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico con base en que el trastorno se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100 o diferente de Arg en el residuo 109.
- En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un

producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

5 En una realización, el trastorno es cáncer de tiroides. En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides en donde el cáncer de tiroides se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene una mutación en el residuo 70, 130, 133, 134, o 178 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, G70D, I130M, H133Q, A134D o V178I).

10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides, con base en el cáncer de tiroides que se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene una mutación en el residuo 70, 130, 133, 134, o 178 (SEQ ID NO: 8) (por ejemplo, G70D, I130M, H133Q, A134D o V178I).

15 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene cáncer de tiroides, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

20 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un glioma, caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172 u otro diferente de Arg en el residuo 140. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). por ejemplo, Lys, Gly, Met, Trp o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica un IDH2 que Gln (Q) o Trp (W) en el residuo 140.

25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un glioma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

40 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172.

45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene un cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

60 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizado por una mutación o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en describe en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172.

65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, en

donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en la presente memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 tener Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

5 En una realización, el procedimiento comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en la presente memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 tener Lys o Met en el residuo 172 ( SEQ ID NO: 10).

10 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra, por ejemplo, una muestra de suero o de sangre, para un producto de neoactividad alfa aumentada, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

15 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es AML, caracterizado por una mutación o un alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172 o diferente de Arg en el residuo 140. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica un IDH2 tener Gln (Q) o Leu (L) en el residuo 140.

25 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

30 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

35 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene AML, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el método comprende la evaluación de una muestra, por ejemplo, una muestra de suero o de sangre, para el producto de la neoactividad alfa aumentada, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

40 En una realización, el trastorno relacionado con proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, caracterizado por una mutación o un alelo preseleccionado, de IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172 o diferente de Arg en el residuo 140. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Gln (Q) o Leu (L) en el residuo 140.

45 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

50 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, sobre la base del ser cáncer caracterizado por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el residuo 172 (SEQ ID NO: 10).

55 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

60 En una realización, el trastorno es melanoma. En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene melanoma, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 294. Por ejemplo, el alelo codifica Met en el residuo 294 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22).

65 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene el melanoma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Met en el residuo 294 (SEQ ID NO: 10).

En una realización, el método comprende la selección de un melanoma sujeto que tiene, con base en el cáncer que se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene Met en el residuo 294 (SEQ ID NO: 10).

5 En una realización, el método comprende la selección de un sujeto que tiene melanoma, con base en el cáncer que se caracteriza por niveles no deseados, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

10 En otro aspecto, la invención se caracteriza por una composición farmacéutica de un inhibidor (por ejemplo, una molécula pequeña o un inhibidor con base en ácido nucleico) descrita en esta memoria.

En un aspecto, el método incluye un método de tratamiento de un sujeto con aciduria (por ejemplo, un sujeto con aciduria 2-hidroxiglutarica) que comprende:

15 determinar si el sujeto tiene una mutación de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una mutación de línea germinal, que tiene neoactividad de 2HG, o el establecimiento de la ausencia de una mutación de 2HG deshidrogenasa junto con niveles elevados de 2HG; y

20 en respuesta a dicha determinación, por ejemplo, en respuesta a la presencia de dicha mutación, la administración de uno o más de: un inhibidor de neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2; un tratamiento que disminuye la competencia entre 2HG y un análogo estructural celular de 2HG; un agente antiglicolítico; un antioxidante; o un agente de hipometilación, para tratar así a dicho sujeto.

25 En algunas realizaciones preferidas, el método incluye la determinación de si el sujeto tiene una mutación de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una mutación de línea germinal, que tiene neoactividad de 2HG.

Se puede determinar si un sujeto con aciduria tienen una mutación de IDH (por ejemplo, una mutación IDH2) usando métodos descritos en esta memoria. En una realización preferida, la mutación de IDH es IDH2R140Q.

30 En una realización, un reactivo específico de la proteína mutante, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente con una proteína mutante IDH, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente a una proteína mutante IDH1-R132H, se puede utilizar para detectar una enzima mutante neoactiva, véase, por ejemplo, lo descrito por Y. Kato y colaboradores, "A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation" (Kato, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009)).

35 En otro aspecto, se describe un método de evaluación de un sujeto con aciduria (por ejemplo, un sujeto con aciduria 2-hidroxiglutarica), comprendiendo el método, la determinación de si el sujeto tiene una mutación de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, (por ejemplo, una mutación de línea germinal tal como una mutación descrita en esta memoria), que tiene neoactividad de 2HG, o el establecimiento de la ausencia de una mutación de 2HG deshidrogenasa junto con niveles elevados de 2HG. En algunas realizaciones, el método comprende la determinación de si el sujeto tiene una mutación IDH2 tal como una mutación IDH2 descrita en esta memoria (por ejemplo, IDH2R140Q). La determinación se puede hacer usando métodos descritos en la presente memoria.

45 En algunas realizaciones, el sujeto no tiene o no ha sido diagnosticado con cáncer, por ejemplo, un cáncer del SNC.

En algunas realizaciones, la respuesta a dicha determinación, por ejemplo, en respuesta a la presencia de dicha mutación, el método comprende administrar uno o más de: un inhibidor de la neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2; un tratamiento que disminuye la competición entre 2HG y un análogo estructural celular de 2HG; un agente antiglicolítico; un antioxidante; o un agente de hipometilación, tratando así a dicho sujeto.

50 En otro aspecto, se describe un método para evaluar un compuesto candidato, por ejemplo, por la capacidad para inhibir una neoactividad de una enzima IDH mutante, por ejemplo, para uso como un agente antiproliferativo o un agente anticanceroso. En una realización, la neoactividad es la neoactividad de 2HG. El método comprende:

55 suministrar opcionalmente el compuesto candidato;

60 poner en contacto el compuesto candidato con una enzima IDH mutante que tiene una neoactividad, o con otra enzima, denominada aquí como una enzima proxy, que tiene una actividad, denominada en esta memoria como una actividad proxy, que es la misma que la neoactividad (o con una célula o lisado celular que comprende las mismas); y

la evaluación de la capacidad del compuesto candidato para modular, por ejemplo, inhibir o promover, la neoactividad o la actividad proxy,

65 evaluando así al compuesto candidato.

Los ejemplos de mutaciones asociadas con neoactividad de 2HG en IDH1 incluyen mutaciones en el residuo 132, por ejemplo, R132H o R132C.

5 Otras mutaciones IDH1 asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, incluyen mutaciones en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

10 Otras mutaciones IDH1 asociados con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, incluyen mutaciones en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, y mutaciones en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.

15 Aún otras mutaciones asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), mutaciones en el residuo 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).

20 En una realización, la enzima mutante es una IDH2 mutante, por ejemplo, un mutante IDH2 descrito en esta memoria, y la neoactividad es neoactividad de 2HG. Las mutaciones asociadas con neoactividad de 2HG en IDH2 incluyen mutaciones en el residuo 172, por ejemplo, R132H o R132C. Otros ejemplos de mutaciones IDH2 incluyen aquellas en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) y en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).

25 En una realización, el método incluye la evaluación de la capacidad del compuesto candidato para inhibir la neoactividad o actividad proxy.

30 En una realización, el método comprende además la evaluación de la capacidad del compuesto candidato para inhibir la reacción directa de la actividad de la enzima no mutante o de tipo silvestre, por ejemplo, IDH1 o IDH2, la conversión de isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato (o un compuesto intermedio del mismo, incluyendo el compuesto intermedio hidroxilo reducido).

35 En una realización, la etapa de contacto comprende poner en contacto el compuesto candidato con una célula o un lisado celular del mismo, en donde la célula comprende una enzima mutante que tiene la neoactividad o una enzima que tiene la actividad.

40 En una realización, la célula comprende una mutación o alelo preseleccionado, de un gen mutante IDH1. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo puede codificar His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier otro residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser.

45 En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el residuo 132.

En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el residuo 132.

50 En una realización, el alelo es una mutación Arg132His, o una mutación Arg132Ser, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase las figuras 2 y 21).

En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

55 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.

60 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).

65 En una realización, la célula comprende una mutación, o un alelo preseleccionado, de un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo

- 5 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140W o R140L) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 10 En una realización, la célula incluye una copia heteróloga de un gen mutante IDH, por ejemplo, un gen mutante IDH1 o IDH2. (Una copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación por ingeniería genética).
- 15 En una realización, la célula se transfecta (por ejemplo, se transfecta en forma transitoria o estable) o transduce (por ejemplo, o se transduce en una forma transitoria o estable) con una secuencia de ácido nucleico que codifica un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en la presente memoria, por ejemplo, un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. En una realización, el IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, está etiquetado con un epítipo, por ejemplo, etiquetado con myc.
- 20 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 25 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 30 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 35 En una realización, el alelo comprende un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 40 En una realización, la célula, por ejemplo, una célula cancerosa, es no mutante o de tipo silvestre para el IDH, por ejemplo, el alelo IDH1 o IDH2. La célula puede incluir un mutante IDH1 o IDH2 heterólogo.
- 45 En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula cancerosa de próstata, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, una célula de B-ALL o de T-ALL, o una célula de AML), una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, una célula de fibrosarcoma o paraganglioma, una célula cancerosa de tiroides, una célula de melanoma, o una célula caracterizada por neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML). En una realización, la célula es una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (por ejemplo, ATCC HTB-14 o CRL-2610).
- 50 En una realización, la célula es de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer caracterizado por un IDH, por ejemplo, un alelo IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 55 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 60 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 65 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un

- 5 residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 10 En una realización, el alelo comprende un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO.: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140W R140L o) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 15 En una realización, la etapa de evaluación comprende la evaluación de la presencia y / o la cantidad de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, en un lisado celular o medio de cultivo, por ejemplo, mediante LC-MS.
- 20 En una realización, la etapa de evaluación comprende la evaluación de la presencia y / o la cantidad de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, en un lisado celular o medio de cultivo.
- 25 En una realización, el método comprende además la evaluación de la presencia / cantidad de un o más del(de los) metabolito(s) TCA, por ejemplo, citrato,  $\alpha$ -KG, succinato, fumarato, y / o malato, por ejemplo, mediante LC-MS, por ejemplo, como control.
- 30 En una realización, el método comprende además la evaluación de la presencia / cantidad de un o más del(de los) metabolito(s) TCA, por ejemplo, citrato,  $\alpha$ -KG, succinato, fumarato, y / o malato, por ejemplo, mediante LC-MS, por ejemplo, como control.
- 35 En una realización, el método comprende además la evaluación de la capacidad del compuesto candidato para inhibir una segunda actividad enzimática, por ejemplo, la reacción directa de la actividad de la enzima no mutante o de tipo silvestre, por ejemplo, en el caso de IDH1, la conversión de isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato (o un compuesto intermedio del mismo, incluyendo el compuesto intermedio hidroxilo reducido).
- 40 En una realización, el compuesto candidato es una molécula pequeña, un polipéptido, un péptido, una molécula con base en un carbohidrato, o un aptámero (por ejemplo, un aptámero de ácido nucleico, o un aptámero de péptido). El método se puede usar ampliamente y, por ejemplo, e puede usar como uno o más de un cribado primario, para confirmar los candidatos producidos por este u otros métodos o cribados, o en general para guiar el descubrimiento de fármacos o la optimización de candidatos a fármacos.
- 45 En una realización, el método comprende la evaluación, por ejemplo, la confirmación, la capacidad de un compuesto candidato (por ejemplo, un compuesto candidato que reúne un nivel predeterminado de inhibición en la etapa de evaluación) para inhibir la neoactividad no la actividad proxy en un segundo ensayo.
- 50 En una realización, el segundo ensayo comprende la repetición de una o más de las etapas de poner en contacto y / o la evaluación del método básico.
- 55 En otra realización, el segundo ensayo es diferente del primero. Por ejemplo, cuando el primer ensayo puede utilizar una célula o lisado celular u otro modelo animal no completo, el segundo ensayo puede utilizar un modelo animal, por ejemplo, un modelo de trasplante de tumor, por ejemplo, un ratón que tiene un mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, una célula o tumor trasplantado en él. Por ejemplo, una célula U87, o una célula de glioma, por ejemplo, de glioblastoma, que alberga un mutante neoactivo transfectado de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, como un xenoinjerto y se utiliza en un ensayo. Células de glioma humano primario o de tumor de AML pueden ser injertadas en ratones para permitir la propagación del tumor y el uso en un ensayo. También se puede utilizar en un ensayo un modelo de ratón modificado genéticamente (GEMM) que alberga una mutación IDH1 o IDH2 y / o otra mutación, por ejemplo, una mutación nula p53.
- 60 En una realización el método comprende:  
 suministrar opcionalmente el compuesto candidato;
- 65 poner en contacto el compuesto candidato con una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia heteróloga, que codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132 (por ejemplo, IDH1R132H); y  
 evaluar la presencia y / o la cantidad de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por

ejemplo, R-2HG, en el lisado celular o el medio de cultivo, mediante LC-MS,

evaluando de este modo el compuesto.

5 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

10 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.

15 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).

20 En una realización, el alelo comprende un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).

25 En una realización, el resultado de la evaluación se compara con una referencia, por ejemplo, el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG por ejemplo, R-2HG, en una célula de control, por ejemplo, una célula que tiene insertada en ella una copia de tipo silvestre o no mutante de IDH1.

30 En otro aspecto, se describe un método de evaluación de un compuesto candidato, por ejemplo, por la capacidad para inhibir un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad, por ejemplo, para uso como un agente antiproliferativo o anticanceroso. En una realización, la enzima mutante es una IDH, por ejemplo, un mutante IDH1 o IDH2, por ejemplo, un mutante descrito en esta memoria. En una realización, la neoactividad es una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. El método comprende:

35 suministrar opcionalmente el compuesto candidato, por ejemplo, un inhibidor con base en ácido nucleico (por ejemplo, un ARNbc (por ejemplo, ARNp de pequeño de interferencia o ARN de una sola hélice), un ARN antisentido, o un microARN);

40 poner en contacto el compuesto candidato con un ARN, por ejemplo, un ARNm, que codifica IDH, por ejemplo, un IDH1 o IDH2, por ejemplo, un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad (o con una célula o lisado celular que comprende al mismo); y

45 evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir el ARN,

50 evaluando de este modo al compuesto candidato. Mediante la inhibición del ARN significa, por ejemplo, escindir o bien inactivar el ARN.

55 En una realización, el ARN codifica una fusión de todo o parte de la proteína IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, de tipo silvestre o mutante con una segunda proteína, por ejemplo, una proteína reportera, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

60 En una realización, la enzima mutante es una IDH1 mutante, por ejemplo, un mutante IDH1 descrito en esta memoria, y la neoactividad es neoactividad de 2HG.

65 En una realización, la enzima mutante es una IDH2 mutante, por ejemplo, un mutante IDH2 descrito en esta memoria, y la neoactividad es neoactividad de 2HG.

En una realización, la etapa de poner en contacto comprende poner en contacto al compuesto candidato con una célula o un lisado celular del mismo, en donde la célula comprende ARN que codifica una enzima IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, por ejemplo, una enzima IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene la neoactividad.

En una realización, la célula comprende una mutación o alelo preseleccionado, de un gen mutante IDH1. Por

- ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo puede codificar His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier otro residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21), específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu.
- 5 En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el residuo 132.
- En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el residuo 132.
- 10 En una realización, el alelo es una mutación Arg132His, o una mutación Arg132Ser, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véanse las figuras 2 y 21).
- En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 15 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 20 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Gly en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 25 En una realización, la célula comprende una mutación o alelo preseleccionado, de un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L o R140W) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 30 En una realización, la célula incluye una copia heteróloga de un gen de tipo silvestre o mutante IDH, por ejemplo, un gen de tipo silvestre o mutante IDH1 IDH2. (Copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación por ingeniería genética). En una realización, el gen heterólogo comprende una fusión con una proteína reportera, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.
- 40 En una realización, la célula se transfecta (por ejemplo, se transfecta en forma transitoria o estable) o se transduce (por ejemplo, se transduce de forma transitoria o estable) con una secuencia de ácido nucleico que codifica un IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en la presente memoria, por ejemplo, un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. En una realización, el IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, está etiquetado con un epítipo, por ejemplo, etiquetado con myc.
- 45 En una realización, la célula se transfecta con un alelo IDH1 que comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 50 En una realización, la célula se transfecta con un alelo IDH1 que comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 55 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 60 En una realización, el alelo comprende una mutación de un gen mutante IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o
- 65

- Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica un IDH2 tener un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140K) o un resto diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 5 En una realización, la célula, por ejemplo, una célula cancerosa, es no mutante o de tipo silvestre para el alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2. La célula puede incluir un mutante IDH1 o IDH2 heterólogo.
- 10 En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, una célula de B-ALL o T-ALL o una célula de AML) una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, una célula de fibrosarcoma o una célula de paraganglioma, una célula de cáncer de tiroides, una célula de melanoma o una célula caracterizada por neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML). En una realización, la célula es una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (por ejemplo, ATCC HTB-14 o CRL-2610).
- 15 En una realización, la célula es de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer caracterizado por un alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).
- 20 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.
- 25 En una realización, el alelo de IDH comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.
- 30 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, que tiene una mutación un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 35 En una realización, el alelo comprende una mutación de un gen IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M). En una realización, el método comprende un segundo ensayo y el segundo ensayo comprende la repetición de una o más de las etapas de el contacto y / o evaluación del método básico.
- 40 En otra realización, el segundo ensayo es diferente del primero. Por ejemplo, cuando el primero ensayo puede usar un lisado celular o una célula u otro modelo animal no entero el segundo ensayo puede usar un modelo animal.
- 45 En una realización, la eficacia del candidato se evalúa por su efecto sobre la actividad de la proteína reportera.
- 50 En otro aspecto, se describe un método de evaluación de un compuesto candidato, por ejemplo, por la capacidad para inhibir la transcripción de un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad, por ejemplo, para uso como un agente antiproliferativo o anticanceroso. En una realización, la enzima mutante es un mutante IDH1 o IDH2. El método comprende:
- 55 suministrar opcionalmente el compuesto candidato, por ejemplo, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptámero, una molécula basada en un carbohidrato, o molécula a basada en ácido nucleico;
- 60 poner en contacto el compuesto candidato con un sistema que comprende un lisado celular o una célula; y
- evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la traducción del ARN de IDH, por ejemplo, de IDH1 o IDH2, por ejemplo, evaluando así al compuesto candidato.
- 65 En una realización, el sistema comprende un gen de fusión que codifica todo o parte de la proteína tipo silvestre o mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, con una segunda proteína, por ejemplo, una proteína reportera, por

ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

En una realización, la enzima mutante es una IDH1 mutante, por ejemplo, una IDH1 mutante descrita en esta memoria, y la neoactividad es neoactividad de 2HG.

5 En una realización, la enzima mutante es una IDH2 mutante, por ejemplo, una IDH2 mutante descrita en esta memoria, y la neoactividad es neoactividad de 2HG.

10 En una realización, el sistema incluye una copia heteróloga de un gen de tipo silvestre o mutante IDH, por ejemplo, un gen de tipo silvestre o mutante IDH1 o IDH2. (Copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación por ingeniería genética). En una realización, el gen heterólogo comprende una proteína de fusión o una reportera, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

15 En una realización, la célula, por ejemplo, una célula cancerosa, es no mutante o de tipo silvestre para el alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2. La célula puede incluir un mutante IDH1 o IDH2 heterólogo.

20 En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, una célula de B-ALL o T-ALL, o una célula de AML) o una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico. En una realización, la célula es una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (por ejemplo, ATCC HTB-14 o CRL-2610).

25 En una realización, la célula es de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer caracterizado por un alelo de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el residuo 132 (SEQ ID NO: 8).

30 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 71, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Val en el residuo 71, por ejemplo, V71I.

35 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, o una mutación en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109.

40 En una realización, el alelo IDH1 comprende una mutación en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); 130, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); 133, una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); 134, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o 178, una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).

45 En una realización, el alelo comprende una mutación de un gen IDH2. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172. En una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) o un residuo diferente de Val en el residuo 294 (por ejemplo, V294M). En una realización, el procedimiento comprende un segundo ensayo y el segundo ensayo comprende la repetición del método.

50 En otra realización, el segundo ensayo es diferente del primero. Por ejemplo, cuando el primero ensayo se puede usar un lisado celular o una célula u otro modelo animal no completo, el segundo ensayo se puede utilizar un modelo animal.

55 En una realización, la eficiencia del candidato se evalúa por su efecto sobre la actividad de la proteína reportera.

60 En otro aspecto, se describe un método de evaluación de un compuesto candidato, por ejemplo, se describe en esta memoria un agente terapéutico, o inhibidor, en un modelo animal. El compuesto candidato puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptámero, una molécula basada en un carbohidrato o una molécula basada en ácido nucleico. El método comprende, poner en contacto al candidato con el modelo animal y evaluar el modelo animal.

65 En una realización, la evaluación comprende:

- la determinación de un efecto del compuesto sobre la salud general del animal;
- la determinación de un efecto del compuesto en el peso del animal;
- 5 la determinación de un efecto del compuesto sobre la función hepática, por ejemplo, en una enzima del hígado;
- la determinación de un efecto del compuesto sobre el sistema cardiovascular del animal;
- 10 la determinación de un efecto del compuesto sobre la función neuronal, por ejemplo, sobre el control o la respuesta neuromuscular;
- la determinación de un efecto del compuesto sobre el consumo de alimentos o líquidos;
- 15 la determinación de la distribución del compuesto en el animal;
- la determinación de la persistencia del compuesto en el animal o en un tejido u órgano del animal, por ejemplo, la determinación de la vida media en el plasma; o
- 20 la determinación de un efecto del compuesto sobre una célula seleccionada en el animal;
- la determinación de un efecto del compuesto sobre el crecimiento, el tamaño, el peso, la invasividad u otro fenotipo de un tumor, por ejemplo, un tumor endógeno o un tumor que surge de la introducción células de la misma especie o de una especie diferente.
- 25 En una realización, el animal es un primate no humano, por ejemplo, un mono cynomolgus o chimpancé.
- En una realización, el animal es un roedor, por ejemplo, una rata o ratón.
- 30 En una realización, el animal es un animal grande, por ejemplo, un perro o un cerdo, diferente de un primate no humano.
- En una realización de la evaluación se guarda en una memoria y opcionalmente se transmite a un tercero.
- 35 En un aspecto, se describe un método de evaluación o procesamiento de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico mencionado en la presente memoria, por ejemplo, un agente terapéutico que resulta en una disminución del nivel de un producto de un mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene una neoactividad. En una realización, se disminuye el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 40 El método incluye:
- proporcionar, por ejemplo, mediante el análisis de una muestra, un valor (por ejemplo, un valor de prueba) para un parámetro relacionado con una propiedad del agente terapéutico, por ejemplo, la capacidad para inhibir la conversión de cetoglutarato alfa en 2 hidroxiglutarato (es decir, 2HG), por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato (es decir, R-2HG), y,
- 45 opcionalmente, proporcionar una determinación de si el valor determinado para el parámetro reúne un criterio preseleccionado, por ejemplo, está presente, o está presente dentro de un intervalo preseleccionado,
- 50 evaluando o de procesando así al agente terapéutico.
- En una realización, el agente terapéutico está aprobado para uso en humanos por una agencia del gobierno, por ejemplo, la FDA.
- 55 En una realización, el parámetro está correlacionado con la capacidad para inhibir la neoactividad de 2HG, y, por ejemplo, el agente terapéutico es un inhibidor que se enlaza con la proteína IDH1 o IDH2 y reduce un neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- 60 En una realización, el parámetro se correlaciona con el nivel de proteína mutante IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, y por ejemplo, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de proteína mutante IDH1 o IDH2.
- En una realización, el parámetro se correlaciona con el nivel de un ARN que codifica una proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, y por ejemplo, el agente terapéutico reduce el nivel de ARN, por ejemplo, ARNm, que codifica a la proteína mutante IDH1 o IDH2.
- 65 En una realización, el método incluye poner en contacto el agente terapéutico con una proteína IDH mutante, por

ejemplo, IDH1 o IDH2 (o un ARN correspondiente).

- 5 En una realización, el método incluye proporcionar una comparación del valor determinado por un parámetro con un valor o valores de referencia, para evaluar así al agente terapéutico. En una realización, la comparación incluye la determinación de si un valor de prueba determinado para el agente terapéutico tiene una relación preseleccionada con el valor de referencia, por ejemplo, determinando si cumple con el valor de referencia. El valor no necesita ser un valor numérico, sino que simplemente puede ser, por ejemplo, una indicación de si está presente una actividad.
- 10 En una realización, el método incluye la determinación de si un valor de prueba es igual o mayor que un valor de referencia, es menor que o igual a un valor de referencia, o cae dentro de un intervalo (ya sea inclusivo o exclusivo de uno o ambos puntos finales). En una realización, el valor de prueba, o una indicación de si se cumple el criterio preseleccionado, puede ser registrado en una memoria, por ejemplo, en un registro legible por un ordenador.
- 15 En una realización, se toma una decisión o medida, por ejemplo, una muestra que contiene el agente terapéutico, o un lote del agente terapéutico, se clasifica, se selecciona, se acepta o se descarta, se libera o se retiene, se procesa en un producto farmacéutico, se embarca, se mueve a un lugar diferente, se formula, se etiqueta, se empaca, en pone en contacto con, o se coloca en un contenedor, por ejemplo, un contenedor hermético a gases o líquidos, se comercializa, o se vende o se ofrece para la venta, o se hace un registro o se altera para reflejar la determinación, dependiendo de si se cumple con el criterio preseleccionado. Por ejemplo, con base en el resultado de la
- 20 determinación o de si está presente una actividad, o tras la comparación con un estándar de referencia, se puede procesar el lote del cual se toma la muestra, por ejemplo, como se acaba de describir.
- 25 La evaluación de la presencia o nivel de actividad puede mostrar si el agente terapéutico satisface un estándar de referencia.
- En una realización, los métodos y composiciones divulgados aquí son útiles desde el punto de vista del proceso, por ejemplo, para controlar o garantizar la consistencia o calidad de un lote a otro, o para evaluar una muestra con relación a una referencia, por ejemplo, un valor preseleccionado.
- 30 En una realización, se puede utilizar el método para determinar si se puede esperar que un lote de prueba de un agente terapéutico tenga una o más de las propiedades. Tales propiedades pueden incluir una propiedad enlistada en el inserto del producto de un agente terapéutico, una propiedad que aparece en un compendio, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos, o una propiedad requerida por una agencia reguladora, por ejemplo, la FDA, para uso comercial.
- 35 En una realización, el método incluye probar el efecto del agente terapéutico sobre la actividad de tipo silvestre de una proteína IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, y proporcionar una determinación de si el valor determinado cumple con un criterio preseleccionado, por ejemplo, está presente, o está presentar dentro de un intervalo preseleccionado.
- 40 En una realización, el método incluye:
- poner en contacto un agente terapéutico que es un inhibidor de IDH1 o IDH2 (por ejemplo, IDH1), neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, con un mutante IDH1 o IDH2 (por ejemplo, IDH1) que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG,
- 45 determinar un valor relacionado con la inhibición de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, y
- comparar el valor determinado con un valor de referencia, por ejemplo, un intervalo de valores, para la inhibición de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización el valor de referencia es un
- 50 valor requerido por la FDA, por ejemplo, un criterio de liberación.
- En una realización, el método incluye:
- 55 poner en contacto un agente terapéutico que es un inhibidor de ARNm que codifica una IDH1 mutante que tiene una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, con un ARNm que codifica un mutante IDH1 que tiene una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG,
- determinar un valor relacionado con la inhibición del ARNm, y,
- 60 comparar el valor determinado con un valor de referencia, por ejemplo, un intervalo de valores para la inhibición del ARNm. En una realización el valor de referencia es un valor requerido por la FDA, por ejemplo, un criterio de liberación.
- 65 En un aspecto, se describe un método para evaluar una muestra de un agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico mencionado aquí, que incluye el recibo de datos con relación a una actividad del agente terapéutico; proporcionar un registro que incluye dichos datos y que incluye opcionalmente un identificador para un lote o agente

- 5 terapéutico; enviar dicho registro a una entidad con capacidad de decisión, por ejemplo, una agencia del gobierno, por ejemplo, la FDA; opcionalmente, recibir una comunicación de dicha entidad con capacidad de decisión; opcionalmente, decidir si liberar al mercado el lote del agente terapéutico con base en la comunicación enviada por la entidad con capacidad de decisión. En una realización, el método incluye además libera, o bien procesar la muestra, por ejemplo, como describe en esta memoria.
- 10 En otro aspecto, se describe un método de selección de una clase de pago para el tratamiento con un agente terapéutico descrito en esta memoria, por ejemplo, un inhibidor de neoactividad de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, para un sujeto que tiene un trastorno relacionado con proliferación celular. El método incluye:
- 15 proporcionar (por ejemplo, recibir) una evaluación de si el sujeto es positivo para niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o neoactividad, por ejemplo, una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, un IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad, por ejemplo, una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, (o un ARN correspondiente), o un IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, un gen somático, por ejemplo, un mutante descrito en la presente memoria, y realizar al menos uno de (1) si el sujeto es positivo, seleccionar una primera clase de pago, y (2) si el sujeto no es positivo seleccionar una segunda clase de pago.
- 20 En una realización, la selección se registra en una memoria, por ejemplo, en un sistema de registros médicos.
- En una realización, el método incluye la evaluación de si el sujeto es positivo para niveles no deseado, es decir, aumentados de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o neoactividad, por ejemplo, neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG.
- 25 En una realización, el método incluye solicitar la evaluación.
- En una realización, la evaluación se realiza en el sujeto por medio de un método descrito en esta memoria.
- 30 En una realización, el método comprende comunicar la selección a un tercero, por ejemplo, un ordenador, un disco compacto, un teléfono, un facsímil, correo electrónico o carta.
- En una realización, el método comprende la elaboración o autorización del pago para dicho tratamiento.
- 35 En una realización, el pago es por un primer interesado a un segundo interesado. En algunas realizaciones, el primer interesado es diferente del sujeto. En algunas realizaciones, el primer interesado se selecciona de un tercero pagador, una compañía de seguros, un empleador, plan de salud patrocinado por el empleador, HMO, o una entidad del gobierno. En algunas realizaciones, el segundo interesado se selecciona entre el sujeto, un proveedor de salud, un médico tratante, un HMO, un hospital, una entidad del gobierno, o una entidad que vende o suministra el fármaco. En algunas realizaciones, el primer interesado es una compañía de seguros y el segundo interesado se selecciona entre el sujeto, un proveedor de salud, un médico tratante, un HMO, un hospital, una entidad del gobierno, o una entidad que vende o suministra el fármaco. En algunas realizaciones, el primer interesado es una entidad del gobierno y el segundo interesado se selecciona entre el sujeto, un proveedor de salud, un médico tratante, un HMO, un hospital, una compañía de seguros, o una entidad que vende o suministra el fármaco.
- 40
- 45 Como se utiliza en esta memoria, un trastorno relacionado con proliferación celular es un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada o por una predisposición que conduce a proliferación celular no deseada (algunas veces denominada como trastorno precanceroso). Los ejemplos de trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada incluyen cánceres, por ejemplo, tumores del SNC, por ejemplo, un glioma. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogliales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos, glioblastomas y neoplasias mieloproliferativas. Otros ejemplos incluyen cánceres hematológicos, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica) o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica), un cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, fibrosarcoma, y paraganglioma; específicamente una leucemia, por ejemplo, AML (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica) o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL (por ejemplo, una forma adulta o pediátrica) cáncer de
- 50
- 55 próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de colon y melanoma. Ejemplos de trastornos caracterizados por una predisposición que conduce a una proliferación no deseada de células incluyen mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, que son una colección diversa de condiciones hematológicas marcadas por una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación en AML.
- 60
- 65 Como se utiliza en esta memoria, un mayor nivel de un producto de una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o un término similar, por ejemplo, un mayor nivel de producto neoactivo o de producto de neoactividad, significa un aumento comparado con un nivel de referencia que es característico de una fuente que carece de una mutación IDH neoactiva, por ejemplo, IDH1 o IDH2. Por ejemplo, si se evalúa el nivel del producto de neoactividad en las células, un aumento significa un aumentaron en comparación con las células que son similares excepto que no portan la mutación de IDH neoactiva, por ejemplo, IDH1 o IDH2. A modo de ejemplo adicional, si se

- 5 evalúa el nivel del producto de neoactividad en una muestra, por ejemplo, suero, un aumento significa un aumento en comparación con una muestra que es o bien similar, pero de una fuente o de un sujeto que no tiene la mutación de IDH neoactiva, por ejemplo, Idh1 o IDH2, o que no tiene un trastorno caracterizado por una mutación de IDH neoactiva, por ejemplo, IDH1 o IDH2. A modo de ejemplo adicional, si se evalúa el nivel del producto de neoactividad en una muestra de tumor, por ejemplo, una muestra de tumor sólido o una muestra de células hematopoyéticas, un aumento significa un aumento en comparación con una muestra de tumor que es o bien similar, pero de una fuente o un sujeto que no tiene la mutación de IDH neoactiva, por ejemplo, IDH1 o IDH2, o no tiene un trastorno caracterizado por una mutación de IDH neoactiva, por ejemplo, IDH1 o IDH2.
- 10 Como se utiliza aquí, inhibe específicamente una neoactividad (y términos similares), significa que la neoactividad de la enzima mutante es inhibida hasta un grado significativamente mayor que la actividad de la enzima de tipo silvestre. A modo de ejemplo, "inhibe específicamente la neoactividad de 2HG de IDH1 mutante (o IDH2)" significa que se inhibe la neoactividad de 2HG hasta un grado significativamente mayor que la reacción directa (la conversión de isocitrato en cetoglutarato alfa) de la actividad de IDH1 de tipo silvestre (o IDH2). En formas de realización se
- 15 inhibe la neoactividad al menos 2, 5, 10, o 100 veces más que la actividad de tipo silvestre. En formas de realización, un inhibidor que es específico para la neoactividad de 2HG de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, también inhibirá otra deshidrogenasa, por ejemplo, malato deshidrogenasa. En otras realizaciones, el inhibidor específico no inhiben otras deshidrogenasas, por ejemplo, malato deshidrogenasa.
- 20 En la presente memoria, un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un cáncer, caracterizado por una mutación o un alelo, significa un trastorno relacionado con proliferación celular que tiene un número sustancial de células que portan esa mutación o alelo. En una realización, al menos 10, 25, 50, 75, 90, 95 o 99% de las células del trastorno relacionadas con la proliferación celular, por ejemplo, las células de un cáncer, o una muestra representante, promedio o típica células cancerosas, por ejemplo, de un tumor o de células sanguíneas afectadas,
- 25 porta al menos una copia de la mutación o alelo. Un ejemplo de trastorno relacionado con proliferación celular, caracterizado por una IDH mutante, por ejemplo, una IDH1 o IDH2 mutante, que tiene la neoactividad de 2HG. En una realización, la mutación o el alelo está presente como un heterocigoto a las frecuencias indicadas.
- 30 Como se utiliza en esta memoria, una "SNP" es una variación de la secuencia de ADN que se presenta cuando un nucleótido sencillo (A, T, C, o G) en el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre los miembros de una especie (o entre cromosomas pareados en un individuo).
- 35 En la presente memoria, un sujeto, puede ser un sujeto humano o no humano. Los sujetos no humanos incluyen primates no humanos, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, u otros animales no humanos.
- Los detalles de una o más realizaciones se exponen en la descripción más adelante. Otras características, objetivos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.
- 40 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 representa la verificación de la secuencia de ADN de pET41a-IDH1 y la alineación contra la CDS publicada de IDH1. La secuencia de IDH1 (CDS) corresponde a la SEQ ID NO: 5. La secuencia de pET41a-IDH1 corresponde a la SEQ ID NO: 6, y la secuencia de "consenso" corresponde a la SEQ ID NO: 7.
- 45 La figura 2 representa la verificación de la secuencia de ADN de los mutantes R132S y R132H de acuerdo con la SEQ ID NO: 8. La secuencia de aminoácidos de IDH1 (SEQ ID NO: 8) es proporcionada en la figura 21.
- La figura 3 representa la separación de la proteína IDH1 de tipo silvestre sobre una columna de Ni-Sefarosa.
- 50 La figura 4 representa el análisis de proteínas de IDH1 de tipo silvestre sobre el gel de SDS antes y después del fraccionamiento en la columna de Ni. T: proteína total; I: fracciones insolubles; S: fracción soluble; L: muestra para carga una columna de Ni. Los números en la figura indica los números de fracciones. Las fracciones # 17 ~ # 27 fueron recolectadas para purificación adicional.
- 55 La figura 5A representa la separación de proteína IDH1 de tipo silvestre través de una columna SEC, S-200.
- La figura 5B representa un análisis de proteína de IDH1 de tipo silvestre en gel de SDS antes y después del fraccionamiento en la columna S-200. M: marcador de peso molecular; Ni: fracción de la columna de níquel antes de S- 200; S200: fracción de la columna SEC.
- 60 La figura 6 representa la separación de la proteína R132S mutante sobre una columna Ni-Sefarosa.
- La figura 7 representa un análisis de proteínas de R132S mutante sobre gel SDS antes y después del fraccionamiento en una columna de Ni. M: marcador de proteína (kDa): 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 14,4; T: proteína celular total; So: fracción soluble; In: fracción insoluble; Ft: flujo a través de. # 3 - # 7 indica los correspondientes
- 65 números de la fracción eluida.

## ES 2 594 402 T3

- La figura 8A representa la separación de proteína R132S mutante a través de una columna SEC S-200.
- 5 La figura 8B representa análisis de proteína de R132S mutante sobre gel SDS después de fraccionamiento en columna S-200. M: marcador de peso molecular; R132S: fracción de la columna SEC.
- La figura 9 representa la separación de proteína R132H mutante sobre una columna de Ni-Sefarosa.
- 10 La figura 10 representa análisis de proteínas de R132H mutante sobre gel SDS antes y después del fraccionamiento en una columna de Ni. M: marcador de proteínas (kDa): 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 14,4; T: proteína celular total; So: fracción soluble; In: fracción insoluble; Ft: flujo a través de; # 5 - # 10 indica los números correspondientes de la fracción eluida; Ni: muestra de la columna de Ni-Sefarosa, combinación de # 5 - # 10 juntos.
- 15 La figura 11A representa la separación de proteína R132H mutante a través de la columna SEC S-200.
- La figura 11B representa el análisis de proteína de R132H mutante sobre gel SDS después del fraccionamiento sobre una columna S-200. M: marcador de peso molecular; R132H: fracción de la columna SEC.
- 20 La figura 12A representa la gráfica de Michaelis-Menten de IDH1 de tipo silvestre en la descarboxilación oxidativa de isocitrato hasta  $\alpha$ -cetoglutarato.
- La figura 12B representa la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima mutante R132H en la descarboxilación oxidativa del isocitrato hasta  $\alpha$ -cetoglutarato.
- 25 La figura 12C representa la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima mutante R132S en la descarboxilación oxidativa de isocitrato hasta  $\alpha$ -cetoglutarato.
- La figura 13A representa la inhibición de  $\alpha$ -KG de IDH1 de tipo silvestre.
- 30 La figura 13B representa la inhibición de  $\alpha$ -KG de la enzima mutante R132H.
- La figura 13C representa la inhibición de  $\alpha$ -KG de la enzima mutante R132S.
- 35 La figura 14 representa IDH1 e tipo silvestre, R132H, y R132S en la conversión  $\alpha$ -cetoglutarato hasta 2-hidroxiglutarato.
- La figura 15A representa la gráfica de sustrato-velocidad de concentración para la enzima mutante R132H.
- 40 La figura 15B representa la gráfica de sustrato-velocidad de concentración para la enzima mutante R132S.
- La figura 16 representa IDH1 de tipo silvestre, R132H, y R132S en la conversión  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato con NADH.
- 45 La figura 17A representa la inhibición de oxalomalato con IDH1 de tipo silvestre.
- La figura 17B representa la inhibición de oxalomalato con R132H.
- La figura 17C representa la inhibición de oxalomalato con R132S.
- 50 La figura 18A representa un análisis por LC-MS / MS de la reacción de control.  
La figura 18B representa un análisis por LC-MS / MS de la reacción que contiene la enzima.
- La figura 18C representa un análisis por LC-MS / MS de la reacción con el elemento de control.
- 55 La figura 19 representa el análisis por LC-MS / MS de alfa-hidroxiglutarato.
- La figura 20 representa el análisis por LC-MS / MS que muestra que R132H consume  $\alpha$ -KG para producir ácido 2-hidroxiglutarico.
- 60 La figura 21 representa la secuencia de aminoácidos de IDH1 (SEQ ID NO: 8) como se describe en el GenBank con acceso No. NP\_005887.2 (GI No. 28178825) (fecha de registro 10 de mayo de 2009).
- La figura 21A es la secuencia de ADNc de IDH1 tal como la representa en GenBank con acceso No. NM\_005896.2 (fecha de registro 10 de mayo de 2009; GI 28178824) (SEQ ID NO: 13).
- 65 La figura 21B representa la secuencia de ARNm de IDH1 como se describe en GenBank con acceso No. NM\_005896.2 (fecha de registro 10 de mayo de 2009; GI 28178824) (SEQ ID NO: 9).

- La figura 22 es la secuencia de aminoácidos de IDH2 como se presentó en GenBank con acceso No. NM\_002168.2 (fecha de registro 16 de agosto del 2009; GI 28178831) (SEQ ID NO: 10).
- 5 La figura 22A es la secuencia de ADNc de IDH2 como se presentó en GenBank con acceso No. NM\_002168.2 (fecha de registro 16 de agosto de 2009; GI 28178831) (SEQ ID NO: 11).
- La figura 22B es la secuencia de ARNm de IDH2 como se presentó en GenBank con acceso No. NM\_002168.2 (fecha de registro 16 de agosto de 2009; GI 28178831) (SEQ ID NO: 12).
- 10 La figura 23 representa el progreso de reacciones directas (isocitrato hasta  $\alpha$ -KG) para la enzima mutante R132H y R132S.
- La figura 24A representa el análisis por LC-MS / MS de la mezcla racémica 2-HG con formación de derivados.
- 15 La figura 24B representa el análisis por LC-MS / MS del estándar de R-2HG con formación de derivados.
- La figura 24C representa el análisis por LC-MS / MS de una inyección conjunta del racemato 2-HG y con formación de derivados y del estándar de R-2HG.
- 20 La figura 24D representa el análisis por LC-MS / MS del producto de reacción de neoactividad con formación de derivados.
- La figura 24E representa el análisis por LC-MS / MS de una inyección conjunta del producto de reacción de la enzima de neoactividad y el estándar de R-2-HG.
- 25 La figura 24F representa el análisis por LC-MS / MS de una inyección conjunta del producto de reacción de la enzima de neoactividad y la mezcla racémica de 2-HG.
- 30 La figura 25 representa el efecto inhibitorio de 2-HG derivado de la reducción de  $\alpha$ -KG por R132H de ICDH1 sobre la descarboxilación oxidativa catalítica de ICDH1 de tipo silvestre del isocitrato hasta  $\alpha$ -KG.
- La figura 26A representa los niveles de 2-HG en líneas celulares CRL-2610 que expresan la proteína mutante R132H de tipo silvestre o IDH-1.
- 35 La figura 26B representa los niveles de 2-HG en líneas celulares HTB-14 que expresan la proteína mutante R132H de tipo silvestre o de IDH-1.
- La figura 27 representa ADN genómico de IDH1 humano: secuencia de intrón / 2 exón.
- 40 La figura 28 representa las concentraciones de 2HG en gliomas malignos humanos que contienen mutaciones de R132 en IDH1. Las muestras de glioma humano obtenidas por resección quirúrgica se congelaron rápidamente, se tomó el genotipo para estratificar como de tipo silvestre (TS) (N = 10) o que porta un alelo mutante R132 (Mutante) (n = 12) y metabolitos extraídos para el análisis por LC-MS. Entre los 12 tumores mutantes, 10 portaban una mutación R132H, uno una mutación R132S, y uno una mutación R132G. Cada símbolo representa la cantidad del metabolito enumerado encontrado en cada muestra de tumor. Las líneas rojas indican la media de la muestra del grupo. La diferencia en 2HG observada entre tumores con IDH1 mutante, R132 mutante y TS fue estadísticamente significativa mediante la prueba t de Student ( $p < 0,0001$ ). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de  $\alpha$ -KG, malato, fumarato, succinato, isocitrato entre los tumores con IDH1 mutante, R132 mutante y TS.
- 45 La figura 29A representa el análisis estructural de IDH1 mutante R132H. A la izquierda se muestra una estructura de revestimiento de IDH1 mutante R132H y de IDH1 TS en la conformación "cerrada". A la derecha se muestra una estructura de revestimiento de IDH1 TS en la conformación "abierta" con IDH1 mutante para comparación.
- 50 La figura 29B representa una comparación estructural en primer plano del sitio activo de IDH1 R132H (izquierda) e IDH1 de tipo silvestre (TS) (derecha) que contiene tanto  $\alpha$ -KG como NADPH. Además de los cambios en el residuo 132, la posición de los residuos catalíticos Tyr 139 y Lys 212 son diferentes y  $\alpha$ -KG se orienta de forma diferente con relación a NADPH para la transferencia del hidruro catalítico en las enzimas TS versus R132H mutante.
- 55 La figura 30A representa las propiedades enzimáticas de los mutantes R132H de IDH1 cuando se evaluaron las enzimas IDH1 R132H mutante (R132H) y de tipo silvestre (TS) humanas recombinantes para descarboxilación oxidativa del isocitrato hasta  $\alpha$ -KG con NADP<sup>+</sup> como cofactor. Se usaron diferentes concentraciones de enzima para generar las curvas.
- 60 La figura 30B representa las propiedades enzimáticas de los mutantes de R132 de IDH cuando se evaluaron las enzimas IDH1 mutantes R132H y TS por la reducción de  $\alpha$ -KG con NADPH como cofactor. Se utilizaron diferentes
- 65

concentraciones de enzima para generar las curvas.

La figura 30C representa los parámetros cinéticos de reacciones oxidativas y reductoras, como se midió para las enzimas IDH1 R132H y de TS como se muestra. Los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  para la actividad reductora de la enzima de TS no pudieron ser determinados ya que no se pudo detectar actividad medible de la enzima con ninguna concentración de sustrato.

La figura 31A representa el análisis por LC-MS / MS que identifica 2HG como el producto de reacción reductor de IDH1 mutante R132H humana recombinante.

La figura 31B representa la formación de derivados del anhídrido diacetil-L-tartárico y el análisis por LC-MS / MS de la quiralidad de 2HG producido por IDH1 mutante R132H. La señal normalizada de LC-MS / MS para el producto de la reacción reductora (rxn) solo, un estándar de R(-) - 2HG solamente, y los dos juntos (Rxn + R(-) - 2HG) se muestran como es la señal para la mezcla racémica de las formas R(-) y S(+) (racemato de 2HG), únicamente o con los productos de reacción (Rxn + racemato).

La figura 32A representa análisis SDS-PAGE y de transferencias tipo Western de la proteína R132S IDH1 etiquetada y purificación por afinidad del terminal C usada para cristalización.

La figura 32B representa el cromatograma del análisis por FPLC de la muestra de proteína R132S IDH1.

La figura 33 representa los cristales obtenidos a partir de una solución de proteína que contenía NADP 5 mM, isocitrato 5 mM,  $Ca^{2+}$  10 mM. El precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,0) y 20% de PEG 6000 usando un método de gota suspendida de cristalización.

La figura 34 representa un cristal obtenido a partir de una solución de proteína que contenía NADP 5 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM,  $Ca^{2+}$  10 mM. El precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,5) y 12% de PEG 20000.

La figura 35 es una gráfica de barras que representa la actividad elevada de catálisis reductiva de NADPH en la enzima IDH2-R172K comparado con IDH2 de tipo silvestre.

Las figuras 36A-C son gráficas que representan lo siguiente: (A) extractos de células de leucemia de un paciente con IDH1 / 2 ( $n = 10$ ), e IDH1 / 2 mutante ( $n = 16$ ) obtenidos en la presentación y la recaída, y células de leucemia con IDH1 R132 mutante que se desarrollaron en cultivo durante 14 días ( $n = 14$ ) analizadas por LC-MS para medir los niveles de 2-HG; y (B) 2-HG medido en suero de pacientes con leucemia con IDH1 de tipo silvestre o IDH1 R132 mutante. En (A) y (B), cada punto representa una muestra de un paciente individual. Los diamantes representan el tipo silvestre, los círculos representan mutantes IDH1, y los triángulos representan mutantes IDH2. Las barras horizontales indican la media. (\*) indica la diferencia estadísticamente significativa con relación a las células de tipo silvestre del pacientes ( $p < 0,05$ ). (C) representa las curvas de crecimiento in vitro de células de AML con IDH1 R132 mutante y IDH1 de tipo silvestre.

La figura 37 es una gráfica que representa los resultados de los extractos de células de leucemia de pacientes con AML que portan un alelo mutante IDH1 / 2 ( $n = 16$ ) o de tipo silvestre ( $n = 10$ ) obtenido en la presentación y recaída inicial evaluada por LC-MS para los niveles de  $\alpha$ -KG, succinato, malato, y fumarato. Cada punto representa una muestra de un paciente individual. Los círculos abiertos representan tipo silvestre, los círculos cerrados representan mutantes IDH1, y los triángulos representan mutantes IDH2. Las barras horizontales representan la media. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de AML de tipo silvestre y con IDH1 / 2 mutante.

La figura 38 muestra representaciones gráficas del análisis por LC-MS de reacciones in vitro usando IDH1 R132C e IDH2 R172K recombinantes lo que confirman que 2-HG y no isocitrato es el producto final de las reacciones de la enzima mutante.

Las Figuras 39A y B representan (A) la catálisis de la enzima IDH1 de tipo silvestre de la descarboxilación oxidativa del isocitrato hasta alfa-cetoglutarato con la reducción concomitante de NADP hasta NADPH; y (B) la reducción de IDH1 R132C mutante de alfa-cetoglutarato hasta 2-hidroxisglutarato mientras NADPH se oxida hasta NADP. Estas se denominan como las reacciones "directa" y "parcialmente inversa", respectivamente.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que ciertas formas mutadas de una enzima IDH (por ejemplo, IDH1 o IDH2) tienen una ganancia de función, denominada aquí como un neoactividad, que puede ser utilizada en el tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un trastorno proliferativo tal como cáncer. Se describen aquí métodos y composiciones para el tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un trastorno proliferativo tal como cáncer. Los métodos incluyen, por ejemplo, el tratamiento de un sujeto que tiene un glioma o tumor cerebral caracterizado por un alelo IDH1 preseleccionado, por ejemplo, un alelo que tiene A en la posición 394 (por ejemplo, un mutante C394A) o una A en la posición 395 (por ejemplo, un mutante G395A) de

5 acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 5, que codifica una IDH1 que tiene His en la posición 132 (por ejemplo, una mutación Arg132His) o una Ser en la posición 132 (por ejemplo, un mutante Arg132Ser) y que tiene una neoactividad divulgada en la presente memoria, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de IDH1, por ejemplo, una molécula pequeña o ácido nucleico. El inhibidor con base en ácido nucleico es, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNbc que comprende las secuencias primarias de la cadena sentido y de las cadenas antisentido de las Tablas 7-14. El ARNbc se compone de dos cadenas separadas, o una cadena sola plegada para formar una estructura de horquilla (por ejemplo, un ARN de horquilla corta (ARNhc)). En algunas realizaciones, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido, tal como un ácido nucleico antisentido que tiene una secuencia que se superpone, o incluye, una secuencia antisentido proporcionada en las Tablas 7-14.

10 La presente invención está dirigida a un método in vitro de evaluación de un sujeto con aciduria 2-hidroxiglutarica, comprendiendo el método la determinación de si el sujeto tiene una mutación de isocitrato deshidrogenasa (IDH) que tiene la capacidad de convertir  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (2HG).

15 Neoactividad de una enzima

20 Como se utiliza en la presente memoria, neoactividad se refiere a neoactividad del hidroxilo alfa. La neoactividad y neoactividad del hidroxilo alfa se utilizan aquí en forma intercambiable. La neoactividad del hidroxilo alfa es la capacidad para convertir una cetona alfa en un hidroxilo alfa. La neoactividad puede surgir como resultado de una mutación, por ejemplo, una mutación puntual, por ejemplo, una sustitución, por ejemplo, en el sitio activo de una enzima. En una realización, el neoactividad está sustancialmente ausente de la enzima no mutante o de tipo silvestre. Algunas veces se la denomina aquí como neoactividad de primer grado. Un ejemplo de una neoactividad de primer grado es una "ganancia de función" en donde la enzima mutante gana una nueva actividad catalítica. En una realización, la neoactividad está presente en una enzima de tipo silvestre o no mutante, pero en un nivel que es inferior a 10, 5, 1, 0.1, 0.01 o 0.001% de la observada en la enzima mutante. Esto se denomina aquí algunas veces como una neoactividad de segundo grado. Un ejemplo de una neoactividad de segundo grado es una "ganancia de función" en donde la enzima mutante tiene un aumento, por ejemplo, un aumento de 5 veces en la velocidad de la actividad catalítica poseída por la enzima cuando carece de la mutación.

30 En algunas realizaciones, una forma no mutante de la enzima, por ejemplo, una forma de tipo silvestre, convierte la sustancia A (por ejemplo, isocitrato) en la sustancia B (por ejemplo,  $\alpha$ -cetoglutarato), y el neoactividad convierte sustancia B (por ejemplo,  $\alpha$ -cetoglutarato) en la sustancia C, algunas veces denominada como el producto de la neoactividad (por ejemplo, 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato).

35 Isocitrato deshidrogenasas

40 Las isocitrato deshidrogenasas (IDH) catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato (es decir,  $\alpha$ -cetoglutarato). Estas enzimas pertenecen a dos subclases distintas, una de las cuales utiliza NAD(+) como el aceptor de electrones y la otra NADP(+). Se han reportado cinco isocitrato deshidrogenasas: tres isocitrato deshidrogenasas dependen de NAD(+), que se localiza en la matriz mitocondrial, y dos isocitrato deshidrogenasas que dependen de NADP(+), una de las cuales es mitocondrial y la otra predominantemente citosólica. Cada isozima que depende de NADP(+) es un homodímero.

45 IDH1 (isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), citosólica) también se conoce como IDH; IDP; IDCD; IDPC o PICD. La proteína codificada por este gen es la isocitrato deshidrogenasa que depende de NADP(+) encontrada en el citoplasma y los peroxisomas. Contiene la secuencia de señalización de direccionamiento peroxisomas PTS-1. La presencia de esta enzima en peroxisomas sugiere su intervención en la regeneración de NADPH para reducciones intraperoxisomales, tal como la conversión de 2,4-dienoil-CoA en 3-enoil-CoA, así como en reacciones peroxisomales que consumen 2-oxoglutarato, a saber, la alfa-hidroxilación del ácido fitánico. La enzima citoplasmática cumple un papel significativo en la producción de NADPH citoplasmático.

50 El gen IDH1 humano codifica una proteína de 414 aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para IDH1 humana puede encontrarse en el GenBank con las entradas NM\_005896.2 y NP\_005887.2, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para IDH1 se describen también en, por ejemplo, Nekrutenko y colaboradores, Mol. Biol. Evol. 15: 1674-1684 (1998); Geisbrecht y colaboradores, J. Biol. Chem. 274: 30527 a 30533 (1999); Wiemann y colaboradores, Genome Res. 11: 422-435 (2001); El Equipo del Proyecto MGC, Genome Res. 14: 2121-2127 (2004); Lubec y colaboradores, enviado a UniProtKB (diciembre de 2008); KuUmann y colaboradores, enviado a las bases de datos EMBL / GenBank / DDBJ (junio de 1996); y Sjoeblohm y colaboradores, Science 314: 268-274 (2006).

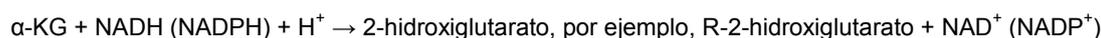
55 La IDH2 (isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial) es también conocida como IDH; IDP; IDHM; IDPM; ICD-M; o mNADP-IDH. La proteína codificada por este gen es la isocitrato deshidrogenasa que depende de NADP(+) encontrada en las mitocondrias. Juega un papel en el metabolismo intermediario y la producción de energía. Esta proteína puede asociarse o interactuar estrechamente con el complejo piruvato deshidrogenasa. El gen IDH2 humano codifica una proteína de 452 aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para

IDH2 pueden encontrarse en el GenBank con las entradas NM\_002168.2 y NP\_002159.2, respectivamente. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para IDH2 humana también se describen, por ejemplo, en Huh y colaboradores, enviado a las bases de datos EMBL / GenBank / DDBJ (noviembre de 1992); y The MGC Project Team, Genome Res. 14: 2121-2127 (2004).

La IDH1 no mutante, por ejemplo, de tipo silvestre, cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato educiendo así  $\text{NAD}^+$  ( $\text{NADP}^+$ ) en  $\text{NADP}$  ( $\text{NADPH}$ ), por ejemplo, en la reacción directa:



En algunas realizaciones, la neoactividad de una IDH1 mutante puede tener la capacidad de convertir  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato:



En algunas realizaciones, la neoactividad puede ser la reducción de piruvato o malato en los correspondientes compuestos  $\alpha$ -hidroxilo.

En algunas realizaciones, la neoactividad de una IDH1 mutante puede surgir de una IDH1 mutante que tiene una His, Ser, Cys o Lys, o cualquier otras mutaciones descritas en Yan y colaboradores, en el residuo 132. En algunas realizaciones, la neoactividad de una IDH2 mutante puede surgir de una IDH2 mutante que tiene una Gly, Met o Lys, o cualquier otra mutaciones descritas en Yan H y colaboradores, en el residuo 172. Los ejemplos de mutaciones incluyen los siguientes: R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, y R132V.

En algunas realizaciones, la IDH1 y/o IDH2 mutante (por ejemplo, una IDH1 y / o IDH2 mutante que tiene una neoactividad descrita en esta memoria) podría conducir a un mayor nivel de ácido 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato en un sujeto. La acumulación de 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato en un sujeto, por ejemplo, en el cerebro de un sujeto, puede ser nociva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, niveles elevados de 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato pueden conducir a y / o ser predictivos de cáncer en un sujeto tal como un cáncer del sistema nervioso central, por ejemplo, tumor cerebral, por ejemplo, glioma, por ejemplo, glioblastoma multiforme (GBM). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un método descrito en la presente memoria incluye la administración a un sujeto de un inhibidor de la neoactividad.

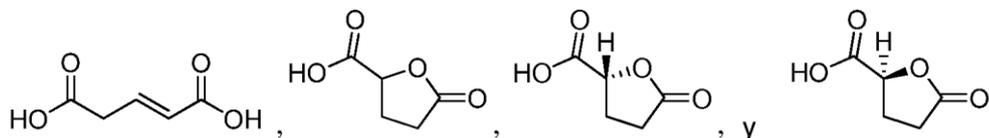
#### Detección de 2-hidroxioglutarato

El 2-hidroxioglutarato puede ser detectado, por ejemplo, mediante LC / MS. Para detectar el 2-hidroxioglutarato secretado en medios de cultivo, se pueden recolectar 500  $\mu\text{L}$  de alícuotas de medios acondicionados, mezcladas 80:20 con metanol, y centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 grados Celsius. El sobrenadante resultante puede ser recolectado y almacenado a -80 grados Celsius antes de LC-MS / MS para evaluar los niveles de 2-hidroxioglutarato. Para medir los metabolitos asociados con células enteras, se puede aspirar el medio y se pueden recolectar las células, por ejemplo, a una densidad no confluyente. Se pueden utilizar una variedad de diferentes métodos de separación de cromatografía líquida (LC). Cada método se puede acoplar mediante ionización por electroaspersión negativa (ESI, -3,0 kV) con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo que opera en modo múltiple de seguimiento de la reacción (MRM), con parámetros optimizados de MS en soluciones estándar preparadas de metabolitos. Los metabolitos se pueden separar mediante cromatografía en fase inversa utilizando tributilamina 10 mM como agente de apareamiento de iones en la fase móvil acuosa, de acuerdo con una variante del método reportado anteriormente (Luo y colaboradores. J Chromatogr A 1147, 153-64, 2007). Un método permite la resolución de metabolitos TCA: t = 0, 50% de B; t = 5, 95% de B; t = 7, 95% de B; t = 8, 0% de B, en donde B se refiere a una fase móvil orgánica de 100% de metanol. Otro método es específico para 2-hidroxioglutarato, que corre en un gradiente lineal rápido de 50% - 95% de B (reguladores como se definió anteriormente) durante 5 minutos. Se puede utilizar como columna una Synergi Hydro-RP, 100 mm x 2 mm, tamaño de partícula 2,1  $\mu\text{m}$  (Phenomex), como la columna, como se describió anteriormente. Los metabolitos se pueden cuantificar por comparación de las áreas de los picos con estándares de metabolitos puros de una concentración conocida. Los estudios de flujo de metabolitos de  $^{13}\text{C}$ -glutamina se pueden realizar como se describe, por ejemplo, en Munger y colaboradores. Nat Biotechnol 26, 1179-86, 2008.

En una realización, se evalúa 2HG, por ejemplo, R-2HG, y el analito en el cual se basa la determinación es 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el analito en el cual se basa la determinación es un derivado de 2HG, por ejemplo, R-2HG, formado en el proceso de realización del método analítico. A manera de ejemplo, tal derivado puede ser un derivado formado en el análisis por MS. Los derivados pueden incluir un aducto salino, por ejemplo, un aducto de Na, una variante de hidratación, o una variante de hidratación que también es un aducto salino, por ejemplo, un aducto de Na, por ejemplo, como se forma en el análisis por MS. En una realización, un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, se puede ensayar indirectamente. En un ensayo indirecto el analito es un derivado metabólico de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, u otro(s) compuesto(s), por ejemplo, un compuesto celular, que está correlacionado con el nivel del producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Los ejemplos incluyen

especies que se acumulan o se elevan, o se reducen, como resultado de la presencia de 2HG, por ejemplo, R-2HG. Por ejemplo, en formas de realización, las células cancerosas con el mutante neoactivo tienen niveles elevados de glutarato o glutamato que se correlacionan con 2HG, por ejemplo, R-2HG.

- 5 Los ejemplos de derivados de 2HG incluyen derivados deshidratados tales como los compuestos proporcionados más adelante o un aducto salino de los mismos:



- 10 Métodos de evaluación de las muestras y/o de los sujetos

Esta sección proporciona métodos para la obtención y análisis de muestras y el análisis de los sujetos.

- 15 Las realizaciones del método comprenden la evaluación de uno o más parámetros relacionados con IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, para evaluar el genotipo o fenotipo de la neoactividad de 2HG, IDH1 o IDH2. La evaluación se puede realizar, por ejemplo, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar al sujeto, para seleccionar un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor, o para evaluar la respuesta al tratamiento o el avance de la enfermedad. En una realización, la evaluación, que se puede realizar antes y / o después de haber iniciado el tratamiento, se basa, al menos, en parte, en el análisis de una muestra de tumor, muestra de una células cancerosa, o muestra de una células precancerosas, por ejemplo, del sujeto. Por ejemplo, se puede analizar una muestra del paciente por la presencia o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, mediante la evaluación de un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Se puede determinar un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en la muestra mediante un método cromatográfico, por ejemplo, mediante análisis por LC-MS. También se puede determinar por contacto con un agente de enlazamiento específico, por ejemplo, un anticuerpo, que se enlaza con el producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, y permite la detección. En una realización, se analiza la muestra por el nivel de neoactividad, por ejemplo, una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización, se analiza la muestra por la presencia de una proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente). Por ejemplo, se puede utilizar un reactivo específico de una proteína mutante, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente con una proteína mutante IDH, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente con una proteína mutante IDH1-R132H o una proteína mutante IDH2, para detectar una enzima mutante neoactiva en una realización se secuencian un ácido nucleico de la muestra para determinar si está presente un alelo seleccionado o mutación de IDH1 o IDH2 descrito en esta memoria. En una realización, el análisis es diferente de la determinación directamente de la presencia de una proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, (o el ARN correspondiente) o la secuenciación de un gen IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2. En una realización, el análisis es diferente de la determinación directa, por ejemplo, es diferente de la secuenciación del ADN o ADNc genómico, la presencia de una mutación en el residuo 132 de IDH1 y/o una mutación en el residuo 172 de IDH2. En una realización, el tumor es diferente de un tumor del SNC, por ejemplo, diferente de un glioma, y el análisis incluye la determinación de la secuencia de una mutación en la posición 132 de IDH1, o una mutación en la posición 172 de IDH2. Por ejemplo, se puede determinar la secuencia de IDH1 en cualquier posición descrita en esta memoria (por ejemplo, de la posición 71, o 100 o 109), por ejemplo, para detectar la presencia de una mutación que tiene neoactividad de 2HG. En una realización, el tumor es un glioma, y se determina la presencia de una mutación neoactiva 2HG de IDH1 diferente de una mutación en 132 de IDH1. En una realización, el tumor es un glioma y se determina la presencia de una mutación neoactiva 2HG de IDH1 diferente de una mutación en 172 en IDH2. Por ejemplo, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o la medición de la mutación de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización, se remueve la muestra del paciente y se analiza. En una realización, la evaluación puede incluir una o más entre la realización del análisis de la muestra, solicitando análisis de la muestra, solicitando resultados del análisis de la muestra, o recibiendo los resultados del análisis de la muestra. (Generalmente en esta memoria, la determinación, el análisis o la evaluación pueden incluir uno o ambos entre la realización del método subyacente o el recibo de datos de otro que ha realizado el método subyacente).

- 55 En una realización, la evaluación, que puede ser realizada antes y/o después de que el tratamiento ha comenzado, se basa, al menos en parte, en el análisis de un tejido (por ejemplo, un tejido diferente de una muestra de tumor), o fluido corporal, o producto corporal. Los ejemplos de tejidos incluyen ganglios linfáticos, piel, folículos pilosos y uñas. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen sangre, suero, plasma, orina, linfa, lágrimas, sudor, saliva, semen y fluido cerebroespinal. Los ejemplos de productos corporales incluyen aire exhalado. Por ejemplo, el tejido, fluido o producto pueden ser analizados por la presencia o nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, mediante evaluación de un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Un producto de

5 neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en la muestra puede determinarse mediante un método cromatográfico, por ejemplo, mediante análisis LC-MS. También puede determinarse por contacto con un agente de enlazamiento específico, por ejemplo, un anticuerpo, que se enlaza al producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, y permite la detección. En realizaciones donde están presentes niveles suficientes, se pueden analizar el tejido, fluido o producto por el nivel de neoactividad, por ejemplo, una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, la neoactividad de 2HG. En una realización, se analiza la muestra por la presencia de una proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene una neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente). Por ejemplo, se puede utilizar un reactivo específico de la proteína mutante, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente con una proteína mutante IDH, por ejemplo, un anticuerpo que se enlaza específicamente a una proteína mutante IDH1-R132H o una proteína mutante IDH2 tal como la descrita en la presente memoria, para detectar enzima mutante neoactiva. En una realización se secuencian un ácido nucleico de la muestra para determinar si está presente un alelo seleccionado o mutación de IDH1 o IDH2 divulgada en esta memoria. En una realización, el análisis es diferente a la determinación directamente la presencia de una proteína IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2, (o el ARN correspondiente) o la secuenciación de un gen IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2. Por ejemplo, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o la medición de la neoactividad de 2HG. En una realización, se remueve el tejido, fluido o producto del paciente y se analiza. En una realización, la evaluación puede incluir uno o más de la realización del análisis del tejido, fluido o producto, solicitando el análisis del tejido, fluido o producto, solicitando los resultados de los análisis del tejido, fluido o producto, o recibiendo los resultados del análisis del tejido, fluido o producto.

25 En una realización, la evaluación, que puede realizarse antes y/o después que el tratamiento ha comenzado, se basa, al menos en parte, en el producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, obteniendo imágenes del sujeto. En ciertas realizaciones, se utilizan métodos de resonancia magnética para evaluar la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en el sujeto. En una realización, se somete al sujeto a la formación de imágenes y/o análisis espectroscópico, por ejemplo, análisis con base en resonancia magnético, por ejemplo, análisis de MRI y/o MRS, y opcionalmente se forma una imagen correspondiente a la presencia, distribución, o el nivel de un producto de neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, o del tumor. Opcionalmente, se almacena la imagen o un valor relacionado con la imagen en un medio tangible y/o se la transmite a un segundo sitio. En una realización, la evaluación puede incluir uno o más de la realización del análisis de imágenes, solicitando el análisis de imágenes, solicitando los resultados de análisis de imágenes, o la recibiendo los resultados de análisis de imágenes.

### 35 Métodos de tratamiento de un trastorno proliferativo

Se describen aquí métodos de tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, un cáncer, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, mediante la inhibición de una neoactividad de una enzima IDH mutante, por ejemplo, IDH1 o IDH2. El cáncer se puede caracterizar por la presencia de una neoactividad. En algunas realizaciones, la ganancia de función es la conversión de un  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato.

#### Compuestos para el tratamiento del cáncer

45 Los compuestos divulgados aquí para el tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, cáncer, incluyen: moduladores, por ejemplo, inhibidores, de una enzima neoactiva; compuestos, o profármacos de los mismos, que son estructuralmente análogos de un producto de neoactividad; agentes antiglicolíticos; antioxidantes; agentes de hipometilación; y agentes terapéuticos con base en ácido nucleico. Estos compuestos pueden ser usados solos, o en combinación con otro agente, tal como un compuesto descrito en esta memoria.

#### Moduladores de una neoactividad

55 Un compuesto candidato puede ser evaluado por modulación (por ejemplo, inhibición) de neoactividad, por ejemplo, usando un ensayo descrito en la presente memoria. Un compuesto candidato también puede ser evaluado por modulación (por ejemplo, inhibición) de actividad de tipo silvestre o no mutante. Por ejemplo, se puede analizar la formación de un producto o subproducto de cualquier actividad (por ejemplo, actividad enzimática), evaluando por lo tanto un compuesto candidato. En algunas realizaciones, se puede evaluar la actividad (por ejemplo, de tipo silvestre / no mutante o neoactividad) mediante la medición de una o más lecturas de un ensayo enzimático. Por ejemplo, se puede medir el cambio en la naturaleza y / o cantidad del sustrato y / o producto, por ejemplo, usando métodos tales como sustratos fluorescentes o marcados en forma radioactiva. Los ejemplos de sustratos y / o productos incluyen  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\text{CO}_2$ , NADP, NADPH, NAD, NADH, y 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato. En algunas realizaciones, la velocidad de reacción de la enzima también se puede evaluar así como la naturaleza y / o cantidad de un producto de la reacción enzimática. Además de las mediciones de las actividades enzimáticas potenciales, se puede detectar la actividad (por ejemplo, de tipo silvestre / no mutante o neoactividad) por la extinción de la fluorescencia de la proteína tras el enlazamiento de un sustrato potencial, cofactor, o modulador de la

actividad enzimática para la enzima.

En una realización, se puede hacer seguimiento del progreso del ensayo mediante los cambios en la DO340 o la fluorescencia del cofactor NAD o NADP. En otra realización, el progreso de la reacción se puede acoplar a un sistema de ensayo enzimático secundario en modo continuo o en modo de punto final para aumentar el intervalo dinámico del ensayo. Por ejemplo, un ensayo de punto final se puede realizar mediante la adición a la reacción de un exceso de diaforasa y rezasarina. La diaforasa consume el resto de NADPH o NADH mientras que produce resorufina de rezasarina. La resorufina es un producto altamente fluorescente que puede ser medido por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 544 nm y de emisión de 590 nm. Esto no solamente termina la reacción, sino que también genera una señal fácilmente detectable con mayor rendimiento cuántico que la fluorescencia del cofactor.

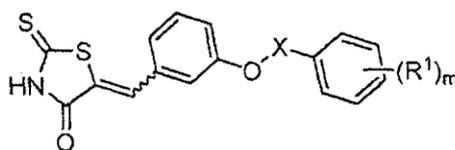
Se puede implementar un ensayo continuo a través del acoplamiento de un producto de la reacción primaria con una reacción de la enzima secundaria que produce resultados detectables de mayor intervalo dinámico o modo de detección más conveniente. Por ejemplo, la inclusión en la mezcla de reacción de aldehído deshidrogenasa (ALDH), que es una enzima dependiente de NADP<sup>+</sup>, y 6-metoxi-2-naftaldehído, un sustrato cromogénico para ALDH, resultará en la producción del producto fluorescente 6-metoxi-2-naftoato (excitación 310 emisión 360) a una velocidad que depende de la producción de NADP<sup>+</sup> por isocitrato deshidrogenasa. La inclusión de una enzima de acoplamiento tal como aldehído deshidrogenasa tiene el beneficio adicional de permitir la detección de neoactividad independientemente de si se produce NADP<sup>+</sup> o NAD<sup>+</sup>, ya que esta enzima es capaz de utilizarlos ambos. Adicionalmente, ya que el cofactor NADPH o NADH requerido para el ensayo "inverso" se regenera, un sistema enzimático acoplado que retorna el cofactor a la enzima IDH tiene la ventaja adicional de permitir la realización de ensayos continuos con concentraciones de cofactor muy por debajo de K<sub>m</sub> con el fin de mejorar la detección de inhibidores competitivos del enlazamiento del cofactor.

En aún una tercera realización de una detección de actividad (por ejemplo, de tipo silvestre/no mutante o neoactividad), uno o una cantidad de sustratos, cofactores, o productos de IDH pueden ser isotópicamente marcados con elementos radioactivos o "pesados" con átomos definidos con el propósito de seguir los sustratos específicos o átomos de sustratos a través de la reacción química. Por ejemplo, el carbono alfa de α-KG, isocitrato, o 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato puede ser <sup>14</sup>C o <sup>13</sup>C. La cantidad, velocidad, identidad y estructura de los productos formados puede ser analizada por medios conocidos para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo espectroscopía de masas o HPLC radiométrica.

Los compuestos que inhiben una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, pueden incluir, por ejemplo, una molécula pequeña, ácido nucleico, proteína y anticuerpo.

Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria. El enlazamiento de un inhibidor puede evitar que un sustrato entre al sitio activo de la enzima y / o impide que la enzima catalice su reacción. El enlazamiento del inhibidor es o bien reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles usualmente reaccionan con la enzima y la cambian químicamente. Estos inhibidores pueden modificar residuos de aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática. Por el contrario, los inhibidores reversibles se enlazan en forma no covalente y se producen diferentes tipos de inhibición dependiendo de si estos inhibidores se enlazan con la enzima, el complejo enzima-sustrato, o ambos. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es oxalomalato, oxalofumarato, u oxalosuccinato. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un compuesto de Fórmula (X) o Fórmula (XI), o un compuesto que se enumeran en la Tabla 24a o la Tabla 24b, o un compuesto como se describe en la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos No. 61/365,072.

A continuación se proporciona el compuesto de fórmula (X):



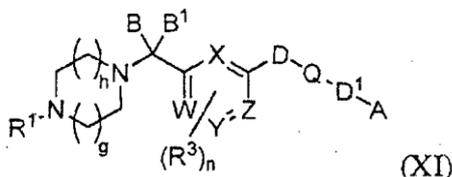
Fórmula (X)

en donde X es alquileo de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, metileno), C(O), o C(O)-alquileo de 1 a 6 átomos de carbono; en donde X está opcionalmente sustituido;

R<sup>1</sup> es halógeno (por ejemplo, flúor), alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono, hidroxilo, alcoxi de 1 a 6 átomos de carbono, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, amido, -C(O)OH, o C(O)O-alkilo de 1 a 6 átomos de carbono; y

m es 0, 1, 2, o 3.

En algunas realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula (XI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o un compuesto enumerado en la Tabla 24b



en donde:

W, X, Y y Z se seleccionan cada uno independientemente de CH o N;

B y B<sup>1</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo o cuando se toman junto con el carbono al cual están unidos forman un grupo carbonilo;

Q es C=O o SO<sub>2</sub>;

D y D<sup>1</sup> se seleccionan independientemente de un enlace, oxígeno o NR<sup>c</sup>;

A es arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido;

R<sup>1</sup> se selecciona independientemente de alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, cicloalquilalquilo, aralquilo, y heteroaralquilo; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 0-3 apariciones de R<sup>d</sup>;

cada R<sup>3</sup> se selecciona independientemente de halógeno, haloalquilo, alquilo y -OR<sup>a</sup>;

cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente de alquilo y haloalquilo;

cada R<sup>b</sup> es independientemente alquilo;

cada R<sup>c</sup> se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo;

cada R<sup>d</sup> se selecciona independientemente de halógeno, haloalquilo, alquilo, nitro, ciano, y -OR<sup>a</sup>, o dos R<sup>d</sup> tomados junto con los átomos de carbono a los cuales están unidos forman un heterociclilo opcionalmente sustituido;

n es 0, 1, o 2;

h es 0, 1, 2; y

g es 0, 1 o 2.

Los ejemplos adicionales de inhibidores de moléculas pequeñas de la neoactividad se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 61 / 365,072, presentada el 16 de julio de 2010.

En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un inhibidor selectivo de la neoactividad (por ejemplo, con relación a la actividad de tipo silvestre).

Los ácidos nucleicos se pueden utilizar para inhibir una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, por ejemplo, mediante la disminución de la expresión de la enzima. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, ARNpi, ARNhp, ARN antisentido, aptámero y ribozima. Se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica para seleccionar moléculas inhibitoras, por ejemplo, moléculas de ARNpi, para una secuencia génica particular.

También se pueden utilizar proteínas para inhibir una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria, mediante el enlazamiento directo o indirecto con la enzima y / o el sustrato, o el enlazamiento compitiendo con la enzima y / o el sustrato. Los ejemplos de proteínas incluyen, por ejemplo, receptores solubles, péptidos y anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que retiene su capacidad para enlazarse a la enzima o sustrato.

Los ejemplos de compuestos candidatos, que pueden ser analizados por la inhibición de una neoactividad descrita en esta memoria (por ejemplo, una neoactividad asociada con IDH1 o IDH2 mutante), se describen en las siguientes

referencias:

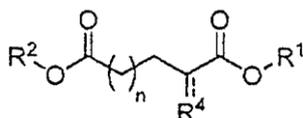
5 Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008), 16 (7), 3580-3586; Free Radical Biology & Medicine (2007), 42 (1), 44-51; KR 2005036293 A; Applied & Environmental Microbiology (2005), 71 (9), 5465-5475; KR 2002095553 A; la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004067234 A1; solicitud internacional PCT (2002), WO 2002033063 A1; Journal of Organic Chemistry (1996), 61 (14), 4527 a 4531; Biochimica et Biophysica Acta, Enzymology (1976), 452 (2), 302-9; Journal of Biological Chemistry (1975), 250 (16), 6351-4; Bollettino - Societa Italiana di Biologia Sperimentale (1972), 48 (23), 1031-5; Journal of Biological Chemistry (1969), 244 (20), 5709-12.

10 Análogos estructurales celulares de productos de neoactividad, y profármacos de los mismos

15 Un ejemplo de análogo estructural celular de un producto de neoactividad es alfa-cetoglutarato. Por lo tanto, se describe un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de  $\alpha$ -cetoglutarato (por ejemplo, una cantidad suficiente para producir niveles altos en comparación con la cantidad presente bajo condiciones metabólicas normales), un profármaco de  $\alpha$ -cetoglutarato, o un compuesto que aumenta el nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato al sujeto. El cáncer puede ser uno descrito en esta memoria.

20 Los ejemplos de análogos estructurales incluyen aquellos de la fórmula presentada a continuación:

En una realización, el análogo estructural celular de un producto neoactivo o profármaco del mismo, es un compuesto de la fórmula siguiente:



25 en donde

$R^1$  y  $R^2$  son como se describe a continuación;

30  $\text{---}$  un enlace sencillo o doble; y

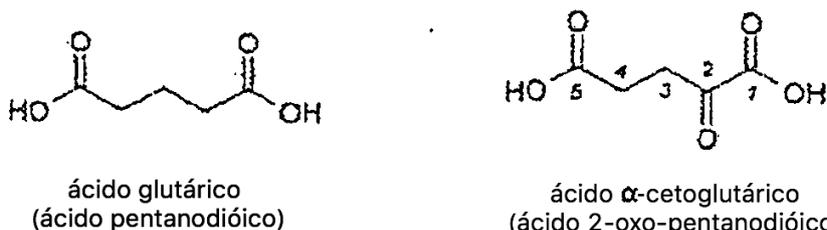
$R^4$  es O, cuando  $\text{---}$  es un enlace doble, o se selecciona de -OH, -O- (fracción hidrófoba), -NH y -N- (fracción hidrófoba) cuando  $\text{---}$  es un enlace sencillo.

35 Una representación estructural de alfa-cetoglutarato y un ejemplo de profármacos relacionados de alfa-cetoglutarato se proporciona en la fórmula (I) más adelante.

40 En algunas realizaciones, ciertos compuestos (denominados aquí como "compuestos  $\alpha$ -cetoglutarato" o " $\alpha$ -cetoglutarato" o "ésteres de  $\alpha$ -cetoglutarato"), se pueden administrar a un sujeto para tratar un cáncer descrito en esta memoria. (Estos compuestos se pueden describir como  $\alpha$ -cetoglutaratos que soportan (por ejemplo, conjugados a, o acoplados a) una fracción hidrófoba. Un ejemplo de compuestos se describen, por ejemplo, en el documento WO2006016143.

45 Por ejemplo, estos compuestos incluyen ésteres de  $\alpha$ -cetoglutarato (es decir, ésteres de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico) que tienen una fracción hidrófoba que es, o hace parte de, un grupo éster (es decir, -C(=O)OR) formado a partir de un de los grupos ácidos del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico.

50 Para referencia, se muestran a continuación los compuestos originales relacionados, ácido glutarico y ácido  $\alpha$ -cetoglutarico.

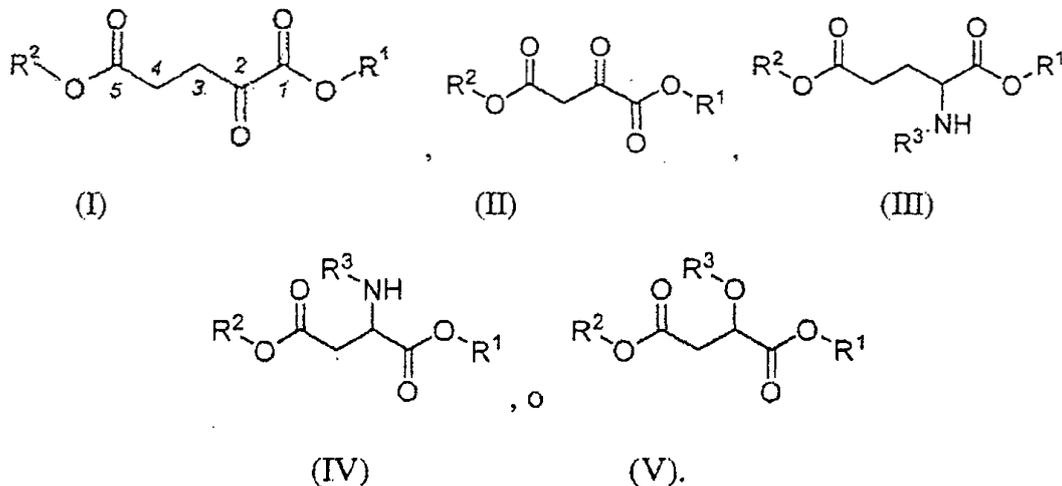


Otros análogos estructurales de alfa-cetoglutarato también se pueden usar para el tratamiento de un trastorno proliferativo descrito en esta memoria tal como cáncer. Ejemplos adicionales de análogos estructurales y

profármacos de los mismos se proporcionan en los compuestos de las fórmulas (II), (III), (IV) y (V) a continuación.

Por lo tanto, en una realización, alfa-cetoglutarato, un análogo estructural, o un profármaco del mismo es un compuesto de una de las siguiente fórmula (I), (II), (III), (IV), o (V):

5



10 en donde

cada  $R^1$  y  $R^2$  se selecciona independientemente de: (i) H; y (ii) una fracción hidrófoba; y

$R^3$  es H o una fracción hidrófoba,

15

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, en donde los compuesto incluye cada uno  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$ , al menos uno de  $R^1$ ,  $R^2$ , y  $R^3$  no es H.

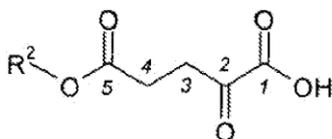
20 En una realización,  $R^1$  y  $R^2$  ninguno es H

En una realización, ni  $R^1$  ni  $R^2$  son H (es decir, diésteres).

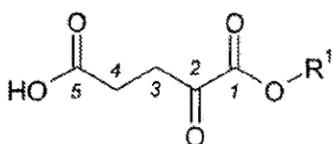
25 En una realización, ni  $R^1$  ni  $R^2$  son H; y  $R^1$  y  $R^2$  son diferentes. En una realización, ni  $R^1$  ni  $R^2$  son H; y  $R^1$  y  $R^2$  son idénticos.

En una realización, exactamente uno de  $R^1$  y  $R^2$  es H (es decir, monoésteres).

30 En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (I) y  $R^1$  es H (y  $R^2$  no es H):

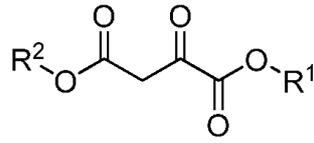


En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (I) y  $R^2$  es H (y  $R^1$  no es H):

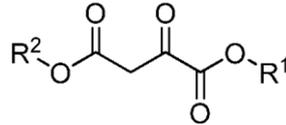


35

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (II) y  $R^1$  es H (y  $R^2$  no es H):

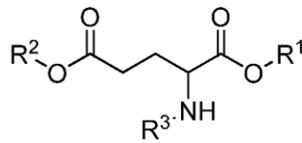


En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (II) y R<sup>2</sup> es H (y R<sup>1</sup> no es H):



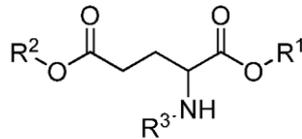
5

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y R<sup>1</sup> es H (y R<sup>2</sup> no es H):



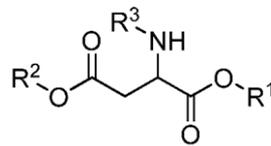
10

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y R<sup>2</sup> es H (y R<sup>1</sup> no es H):



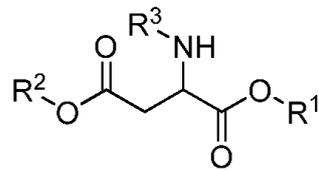
15

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV) y R<sup>1</sup> es H (y R<sup>2</sup> no es H):

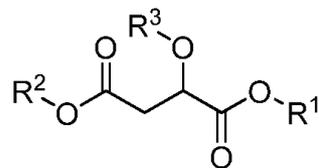


20

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV) y R<sup>2</sup> es H (y R<sup>1</sup> no es H):

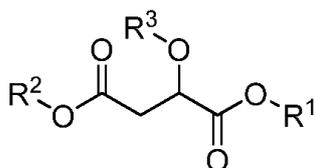


En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (V) y R<sup>1</sup> es H (y R<sup>2</sup> no es H):



25

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (V) y R<sup>2</sup> es H (y R<sup>1</sup> no es H):



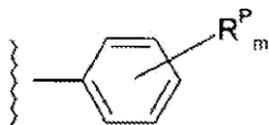
La fracción/fracciones hidrófobas

- 5 Como se utiliza aquí, el término "fracción hidrófoba" incluye, pero no se limita a, fracciones químicas con átomos o grupos no polares que tienen una tendencia a interactuar entre sí en lugar de con agua u otros átomos o grupos polares. Las fracciones hidrófobas son sustancialmente insolubles o sólo pobremente solubles en agua. Opcionalmente, la fracción hidrófoba puede ser seleccionada de acuerdo con sus propiedades fusogénicas o sus interacciones con componentes de membranas celulares, tales como lectinas y grupos de cabeza lipídica. Por
- 10 ejemplo, la fracción hidrófoba puede comprender un polímero (por ejemplo, un polímero lineal o ramificado); un grupo alquilo, alquenilo, y / o alquinilo, que puede ser, por ejemplo, lineal, ramificado o cíclico (por ejemplo, alquilo de 1 a 30 átomos de carbono, alquenilo de 2 a 30 átomos de carbono, alquinilo de 2 a 30 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 30 átomos de carbono, cicloalquenilo de 3 a 30 átomos de carbono, cicloalquinilo de 3 a 30 átomos de carbono); un grupo aromático (por ejemplo, carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono, heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono); o una combinación de los mismos.
- 15 Opcionalmente, la fracción hidrófoba puede comprender uno o más de: un heteroátomo, un grupo heterocíclico, un péptido, un peptoide, un producto natural, un compuesto sintético, un esteroide, y un derivado esteroide (por ejemplo, fracciones hidrófobas que comprenden un núcleo esteroideo, por ejemplo, un sistema de anillos de colesterol).
- 20 Se pretende que la fracción hidrófoba se seleccione para que el compuesto de  $\alpha$ -cetoglutarato sea capaz de realizar su función pretendida, por ejemplo, para a través las membranas lipídicas hasta el citosol/mitocondria.
- 25 Los ejemplos de fracciones hidrófobas incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de: lípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, esfingolípidos, acilgliceroles, ceras, esteroides, esteroides (por ejemplo, colesterol), terpenos, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, isoprenoides, retenoides, biotina, y amino ácidos hidrófobos (por ejemplo, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina, prolina y tirosina).
- 30 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: alquilo de 1 a 30 átomos de carbono; alquenilo de 2 a 30 átomos de carbono; alquinilo de 2 a 30 átomos de carbono; cicloalquilo de 3 a 30 átomos de carbono; cicloalquenilo de 3 a 30 átomos de carbono; cicloalquinilo de 3 a 30 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida. En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: alquilo de 1 a 30 átomos de carbono; alquenilo de 2 a 30 átomos de carbono; alquinilo de 2 a 30 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida.
- 35 En una realización, la parte baja del intervalo (para alquilo, alquenilo, alquinilo) es 4 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 6 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 8 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 10 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 12 átomos de carbono.
- 40 En una realización, la parte superior del intervalo (para alquilo, alquenilo, alquinilo) es 30 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 24 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 22 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 20 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 18 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 16 átomos de carbono.
- 45 En una realización, el intervalo (para alquilo, alquenilo, alquinilo) es de 4 a 20 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 6 a 18 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 8 a 16 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 10 a 24 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 12 a 22 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 14 a 20 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 16 a 18 átomos de carbono.
- 50 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, es independientemente alquilo de 1 a 30 átomos de carbono y está sustituida o no sustituida.
- 55 En una realización, la parte baja del intervalo (para alquilo) es 4 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 6 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 8 átomos de carbono. En una
- 60

- realización, la parte baja del intervalo es 10 átomos de carbono. En una realización, la parte baja del intervalo es 12 átomos de carbono.
- 5 En una realización, la parte superior del intervalo (por alquilo) es 30 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 24 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 22 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 20 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 18 átomos de carbono. En una realización, la parte superior del intervalo es 16 átomos de carbono.
- 10 En una realización, el intervalo (por alquilo) es de 4 a 20 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 6 a 18 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 8 a 16 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 10 a 24 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 12 a 22 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 14 a 20 átomos de carbono. En una realización, el intervalo es de 16 a 18 átomos de carbono.
- 15 En una realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo lineal o ramificado y está sustituido o no sustituido, por ejemplo, en una realización, la fracción hidrófoba es un alquilo de 1 a 30 átomos de carbono lineal o ramificado y está sustituida o no sustituida.
- 20 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, es independientemente  $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ , en donde n es independientemente un número entero de 0 a 29.
- 25 En una realización, la parte baja del intervalo para n es 3. En una realización, la parte baja del intervalo para n es 5. En una realización, la parte baja del intervalo para n es 7. En una realización, la parte baja del intervalo para n es 9. En una realización, la parte baja del intervalo para n es 11.
- 30 En una realización, la parte superior del intervalo para n es 29. En una realización, la parte superior del intervalo para n es 23. En una realización, la parte superior del intervalo para n es 21. En una realización, la parte superior del intervalo para n es 19. En una realización, la parte superior del intervalo para n es 17. En una realización, la parte superior del intervalo para n es 15. En una realización, n es independientemente un número entero de 3 a 19. En una realización, n es independientemente un número entero de 5 a 17. En una realización, n es independientemente un número entero de 7 a 15.
- 35 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida.
- 40 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: carboarilo de 6 a 12 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 12 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 12 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 12 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida.
- 45 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: carboarilo de 6 a 10 átomos de carbono; heteroarilo 5 a 10 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 10 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 10 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida.
- 50 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida.
- 55 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, se selecciona independientemente de: carboarilo de 6 a 12 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 12 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y está sustituida o no sustituida
- En relación con la frase "sustituida o no sustituida", cualquiera de los sustituyentes, si está presente, puede ser, en una realización, como se define más adelante para Rp.
- 60 Por ejemplo, en una realización, cada grupo carboarilo y heteroarilo, si está presente, está sustituido o no sustituido con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) sustituyentes independientemente seleccionados de: halógeno; ciano; nitro; hidroxilo; alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; haloalquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y alquilo de 8 a 30 átomos de carbono.
- 65 En una realización, los grupos alquilo anteriores de 8 a 30 átomos de carbono son alquilo de 10 a 24 átomos de carbono. En una realización, los grupos alquilo anteriores de 8 a 30 átomos de carbono son alquilo de 12 a 22

átomos de carbono. En una realización, los grupos alquilo anteriores de 8 a 30 átomos de carbono son alquilo de 14 a 20 átomos de carbono. En una realización, los grupos alquilo de 8 a 30 átomos de carbono anteriores son alquilo de 16 a 18 átomos de carbono.

- 5 En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, es independientemente un grupo fenilo opcionalmente sustituido de fórmula:



- 10 en donde m es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5, y cada  $R_p$ , si está presente, es independientemente un sustituyente.

En una realización, la fracción hidrófoba, o cada fracción hidrófoba, es independientemente un grupo bencilo opcionalmente sustituido de fórmula:

15



en donde m es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5, y cada  $R_p$ , si está presente, es independientemente un sustituyente. En una realización, m es 0, 1, 2, o 3. En una realización, m es 0, 1, o 2. En una realización, m es 0 o 1.

20

En una realización, los sustituyentes,  $R_p$ , se seleccionan independientemente entre los siguientes:

25

(1) ácido carboxílico; (2) éster; (3) amido o tioamido; (4) acilo; (5) halógeno; (6) ciano; (7) nitro; (8) hidroxilo; (9) éter; (10) tiol; (11) tioéter; (12) aciloxi; (13) carbamato; (14) amino; (15) acilamino o tioacilamino; (16) aminoacilamino o aminotioacilamino; (17) sulfonamino; (18) sulfonilo; (19) sulfonato; (20) sulfonamido; (21) aril de 5 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; (22) arboarilo de 6 a 20 átomos de carbono y heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono; (23) heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono; (24) alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; alquilo de 8 a 30 átomos de carbono; alqueno de 2 a 7 átomos de carbono; alquino de 2 a 7 átomos de carbono; cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono; cicloalqueno de 3 a 7 átomos de carbono; cicloalquino de 3 a 7 átomos de carbono.

30

En una realización, los sustituyentes,  $R_p$ , se seleccionan independientemente de los siguientes:

35

(1) -C(O)OH; (2) -C(=O)OR<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (3) -C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> o -C(=S)NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, en donde cada uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tomados junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo; (4) -C(=O)R<sup>4</sup>, en donde R<sup>4</sup> es independientemente -H, o como se define en (21), (22), (23) o (24); (5) -F, -Cl, -Br, -I; (6) -CN; (7) -NO<sub>2</sub>; (8) -OH; (9) -OR<sup>5</sup>, en donde R<sup>5</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (10) -SH; (11) -SR<sup>6</sup>, en donde R<sup>6</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (12) -OC(=O)R<sup>7</sup>, en donde R<sup>7</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (13) -OC(O)NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>, en donde cada uno de R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R<sup>8</sup> y R<sup>9</sup> tomados conjuntamente con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo; (14) -NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>, en donde cada uno de R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo; (15) -NR<sup>12</sup>C(=O)R<sup>13</sup> o -NR<sup>12</sup>C(=S)R<sup>13</sup>, en donde R<sup>12</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y R<sup>13</sup> es independientemente -H, o como se define en (21), (22), (23) o (24); (16) -NR<sup>14</sup>C(=O)NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup> o -NR<sup>14</sup>C(=S)NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>, en donde R<sup>14</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y cada uno de R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> tomados en conjunto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo; (17) -NR<sup>17</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>18</sup>, en donde R<sup>17</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y R<sup>18</sup> es independientemente -H, o como se define en (21), (22), (23) o (24); (18) -SO<sub>2</sub>R<sup>19</sup>, en donde R<sup>19</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (19) -OSO<sub>2</sub>R<sup>20</sup> y en donde R<sup>20</sup> es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (20) -SO<sub>2</sub>NR<sup>21</sup>R<sup>22</sup>, en donde cada uno de R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R<sup>21</sup> y R<sup>22</sup> tomados en conjunto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos en el anillo; (21) arilo de 5 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, por ejemplo, en donde arilo de 5 a 20 átomos de carbono es como se define en (22); sustituido o no sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se define en (1) a (24); (22) carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono; heteroarilo de 5 a 20 átomos de carbono; sustituido o no sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se define en (1) a (24); (23)

55

heterociclilo de 3 a 20 átomos de carbono; sustituido o no sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se define en (1) a (24); (24) alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; alquilo de 8 a 30 átomos de carbono; alqueno de 2 a 7 átomos de carbono; cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono; cicloalqueno de 3 a 7 átomos de carbono; cicloalquino de 3 a 7 átomos de carbono; sustituido o no sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se define en (1) a (23), por ejemplo, halógeno-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; por ejemplo, amino-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo,  $-(CH_2)_w$ -amino, w es 1, 2, 3, o 4); por ejemplo, carboxi-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo,  $-(CH_2)_w$ -COOH, w es 1, 2, 3, o 4); por ejemplo, acil-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo,  $-(CH_2)_w$ -C(=O)R<sup>n</sup>, w es 1, 2, 3, o 4); por ejemplo, hidroxialquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo,  $-(CH_2)_w$ -OH, w es 1, 2, 3, o 4); por ejemplo, alcoxi de 1 a 7 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo,  $-(CH_2)_w$ -O-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono, w es 1, 2, 3, o 4).

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de los siguientes:

(1) -C(=O)OH; (2) -C(=O)OMe, -C(=O)OEt, -C(=O)O(iPr), -C(=O)O(tBu); -C(=O)O(CPR); -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe, -C(=O)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt; -C(=O)OPh, -C(=O)OCH<sub>2</sub>Ph; (3) -C(=O)NH<sub>2</sub>, -C(=O)NMe<sub>2</sub>, -C(=O)NEt<sub>2</sub>, -C(=O)N(DPI) 2, -C(=O)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; -C(=O) morfolino, -C(=O)NHPh, -C(=O)NHCH<sub>2</sub>Ph; (4) -C(=O)H, -C(=O)Me, -C(=O)Et, -C(=O)(tBu), -C(=O)-cHex, -C(=O)Ph; -C(=O)CH<sub>2</sub>Ph; (5) -F, -Cl, -Br, -I; (6) -CN; (7) -NO<sub>2</sub>; (8) -OH; (9) OMe, -OEt, -O(DPI), -O(tBu), -OPh, -OCH<sub>2</sub>Ph; -OCF<sub>3</sub>; -OCH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt; -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(JPR)<sub>2</sub>; -OPh-Me, -OPh-OH, OMe-OPh, -OPh-F, -OPh-Cl, -OPh-Br, -OPh-I; (10) -SH; (11) -SMe, -SEt, -SPh, -SCH<sub>2</sub>Ph; (12) -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -OC(=O)(iPr), -OC(=O)(tBu); -OC(=O)(cPr); -OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe, -OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt; -OC(=O)Ph, -OC(=O)CH<sub>2</sub>Ph; (13) -OC(=O)NH<sub>2</sub>, -OC(=O)NHMe, -OC(=O)NMe<sub>2</sub>, -OC(=O)NHEt, -OC(=O)NEt<sub>2</sub>, -OC(=O)NHPh, -OC(=O)NCH<sub>2</sub>Ph; (14) -NH<sub>2</sub>, -NHMe, -NHEt, -NH(DPI), -NMe<sub>2</sub>, -NEt<sub>2</sub>, -N(JPR)<sub>2</sub>, -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>; -NHPh, -NHCH<sub>2</sub>Ph; piperidino, piperazino, morfolino; (15) -NH(C=O)Me, -NH(C=O)Et, -NH(C=O)nPr, -NH(C=O)Ph, -NHC(=O)CH<sub>2</sub>Ph; -NMe(C=O)Me, -NMe(C=O)Et, -NMe(C=O)Ph, -NMeC(=O)CH<sub>2</sub>Ph; (16) -NH(C=O)NH<sub>2</sub>, -NH(C=O)NHMe, -NH(C=O)NHEt, -NH(C=O)NHPh, -NH(C=O)NHCH<sub>2</sub>Ph; -NH(C=S)NH<sub>2</sub>, -NH(C=S)NHMe, -NH(C=S)NHEt, -NH(C=S)NHPh, -NH(C=S)NHCH<sub>2</sub>Ph; (17) -NHSO<sub>2</sub>Me, -NHSO<sub>2</sub>Et, -NHSO<sub>2</sub>Ph, -NHSO<sub>2</sub>PhMe, -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph; -NMeSO<sub>2</sub>Me, -NMeSO<sub>2</sub>Et, -NMeSO<sub>2</sub>Ph, -NMeSO<sub>2</sub>PhMe, -NMeSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph; (18) -SO<sub>2</sub>Me, -SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>Et, -SO<sub>2</sub>Ph, -SO<sub>2</sub>PhMe, -SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph; (19) -OSO<sub>2</sub>Me, -OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -OSO<sub>2</sub>Et, -OSO<sub>2</sub>Ph, -OSO<sub>2</sub>PhMe, -OSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph; (20) -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NHMe, -SO<sub>2</sub>NHEt, -SO<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>-morfolino, -SO<sub>2</sub>NHPh, -SO<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>Ph; (21) -CH<sub>2</sub>Ph, -CH<sub>2</sub>Ph-Me, -CH<sub>2</sub>Ph-OH, -CH<sub>2</sub>Ph-F, -CH<sub>2</sub>Ph-Cl; (22) -Ph-Ph-Me, Ph-OH, Ph-OMe, Ph-NH<sub>2</sub>, Ph-F, Cl-Ph, Ph-Br, Ph-I; piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo; furanilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo; (23) pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, azepinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropirano, morfolinilo, azetidino; (24) -Me, Et, -nPr, iPr, -nBu, -iBu, -sBu, -tBu, -nPe, -nHex; -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>19</sub>CH<sub>3</sub>; -cPr, -cHex; -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>; -CF<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CCD, -CBr<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>OMe, -CH<sub>2</sub>OEt, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de: halógeno; ciano; nitro; hidroxilo; alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; alquilo de 8 a 30 átomos de carbono; haloalquilo de 1 a 7 átomos de carbono; y alquilo de 8 a 30 átomos de carbono.

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de: halógeno; ciano; nitro; hidroxilo; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; haloalquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y alquilo de 12 a 22 átomos de carbono.

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de: halógeno; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y haloalquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de: flúor; alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y fluoroalquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

En una realización, los sustituyentes, R<sub>p</sub>, se seleccionan independientemente de: H, -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>.

Como se utiliza aquí, el término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Como se utiliza aquí, el término "alquilo" se refiere a fracciones hidrocarbonadas monovalente, monodentado, alifático (lineal o ramificado) saturadas, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, etc.

Ejemplos de grupos alquilo (no sustituidos) incluyen metilo (un átomo de carbono), etilo (dos átomos de carbono), propilo (tres átomos de carbono), butilo (cuatro átomos de carbono), pentilo (cinco átomos de carbono), hexilo (seis átomos de carbono), heptilo (siete átomos de carbono), octilo (ocho átomos de carbono), nonilo (nueve átomos de carbono), decilo (diez átomos de carbono), undecilo (once átomos de carbono), dodecilo (doce átomos de carbono), tridecilo (trece átomos de carbono), tetradecilo (catorce átomos de carbono), pentadecilo (quince átomos de carbono), y eicodécilo (veinte átomos de carbono). Ejemplos de grupos alquilo lineales (sin sustituir) incluyen metilo (un átomo de carbono), etilo (dos átomos de carbono), n-propilo (tres átomos de carbono), n-butilo (cuatro átomos de

carbono), n-pentilo (amilo) (cinco átomos de carbono), n-hexilo (seis átomos de carbono), y n-heptilo (siete átomos de carbono).

5 Ejemplos de grupos alquilo ramificados (no sustituidos) incluyen iso-propilo (tres átomos de carbono), iso-butilo (cuatro átomos de carbono), sec-butilo (cuatro átomos de carbono), terc-butilo (cuatro átomos de carbono), iso-pentilo (cinco átomos de carbono), y neo-pentilo (cinco átomos de carbono).

10 Tal como se utiliza aquí, el término "alqueno" se refiere a fracciones hidrocarbonadas alifáticas (lineales, ramificadas), monovalentes, monodentadas, que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono.

Ejemplos de grupos alqueno (no sustituidos) incluyen etenilo (vinilo,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1-propenilo ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ ), 2-propenilo (alilo,  $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), isopropenilo (1-metilvinilo,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ), butenilo (cuatro átomos de carbono), pentenilo (cinco átomos de carbono), y hexenilo (seis átomos de carbono).

15 Tal como se utiliza aquí, el término "alquino" se refiere a fracciones hidrocarbonadas alifáticas (lineales, ramificadas), monovalentes, monodentadas, que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono.

Ejemplos de grupos alquino (no sustituidos) incluyen etinilo (etinilo,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) y 2-propinilo (propargilo,  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ).

20 Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalquilo" se refiere a fracciones hidrocarbonadas alifáticas (lineales, ramificadas), monovalentes, monodentadas, que tienen al menos un anillo de átomos de carbono (que tiene preferiblemente de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo).

25 Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen aquellos derivados de compuestos hidrocarbonados monocíclicos saturados: ciclopropano (tres átomos de carbono), ciclobutano (cuatro átomos de carbono), ciclohexano (seis átomos de carbono), cicloheptano (siete átomos de carbono), metilciclopropano (cuatro átomos de carbono), dimetilciclopropano (cinco átomos de carbono), metilciclobutano (cinco átomos de carbono), dimetilciclobutano (seis átomos de carbono), metilciclopentano (seis átomos de carbono), dimetilciclopentano (siete átomos de carbono), metilciclohexano (siete átomos de carbono), dimetilciclohexano (ocho átomos de carbono), mentano (diez átomos de carbono); y compuestos hidrocarbonados policíclicos saturados: tujano (diez átomos de carbono), carano (diez átomos de carbono), pinano (diez átomos de carbono), bornano (diez átomos de carbono), norcarano (siete átomos de carbono), norpinano (siete átomos de carbono), norbornano (siete átomos de carbono), adamantano (diez átomos de carbono), decalina (decahidronaftaleno) (diez átomos de carbono).

35 Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalqueno" se refiere a fracciones hidrocarbonadas no aromáticas monovalentes, monodentadas, que tiene al menos un anillo de átomos de carbono (que tiene preferiblemente de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo) y al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos cicloalqueno incluyen aquellos derivados de compuestos hidrocarbonados monocíclicos insaturados: ciclopropeno (tres átomos de carbono), ciclobuteno (cuatro átomos de carbono), ciclohexeno (seis átomos de carbono), metilciclopropeno (cuatro átomos de carbono), dimetilciclopropeno (cinco átomos de carbono), metilciclobuteno (cinco átomos de carbono), dimetilciclobuteno (seis átomos de carbono), metilciclopenteno (seis átomos de carbono), dimetilciclopenteno (siete átomos de carbono), metilciclohexeno (siete átomos de carbono), dimetilciclohexeno (ocho átomos de carbono); y compuestos hidrocarbonados policíclicos insaturados: canfeno (diez átomos de carbono), limoneno (diez átomos de carbono), pineno.

40 Tal como se utiliza aquí, el término "cicloalquino" se refiere a fracciones hidrocarbonadas no aromáticas monovalentes, monodentadas, que tiene al menos un anillo de átomos de carbono (que tiene preferiblemente de 3 a 7 átomos de carbono en el anillo) y al menos un enlace triple carbono-carbono.

50 Tal como se utiliza aquí, el término "arilo" se refiere a fracciones monovalentes, monodentadas, que tienen un anillo aromático y el cual tiene de 3 a 20 átomos en el anillo (a menos que se especifique otra cosa). Preferiblemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos en el anillo. Los átomos del anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en grupos "carboarilo" o los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) (por ejemplo, seleccionados de N, O, y S), como en los grupos "heteroarilo". En este contexto, los prefijos (por ejemplo, de 5 a 20 átomos de carbono, de 5 a 12 átomos de carbono, de 5 a 10 átomos de carbono, etc.) denotan el número de átomos en el anillo, o el intervalo del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos.

60 Ejemplos de grupos carboarilo incluyen aquellos derivados de benceno (es decir, fenilo) (seis átomos de carbono), naftaleno (diez átomos de carbono), azuleno (diez átomos de carbono), antraceno (catorce átomos de carbono), fenantreno (catorce átomos de carbono), naftaceno (dieciocho átomos de carbono), y pireno (dieciséis átomos de carbono).

65 Ejemplos de grupos carboarilo que comprenden anillos condensados, por lo menos uno de los cuales es un anillo aromático, incluyen grupos derivados de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1-H-indeno) (nueve átomos de carbono), indeno (nueve átomos de carbono), isoindeno (nueve átomos de carbono), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (diez

átomos de carbono), acenafteno (doce átomos de carbono), fluoreno (trece átomos de carbono), fenaleno (trece átomos de carbono), acefenantreno (quince átomos de carbono), y aceantreno (dieciséis átomos de carbono).

5 Ejemplos adicionales de grupos carboarilo incluyen grupos derivados de: indeno (nueve átomos de carbono), indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1-H-indeno) (nueve átomos de carbono), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (diez átomos de carbono), acenafteno (doce átomos de carbono), fluoreno (trece átomos de carbono), fenaleno (trece átomos de carbono), acefenantreno (quince átomos de carbono), aceantreno (dieciséis átomos de carbono), colantreno (veinte átomos de carbono).

10 Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen aquellos derivados de: N1: pirrol (azol) (cinco átomos de carbono), piridina (azina) (seis átomos de carbono); O1: furano (oxol) (cinco átomos de carbono); S1: tiofeno (tiol) (cinco átomos de carbono); N1O1: oxazol (cinco átomos de carbono), isoxazol (cinco átomos de carbono), isoxazina (seis átomos de carbono); N2O1: oxadiazol (furazano) (cinco átomos de carbono); N3O1: oxatriazol (cinco átomos de carbono); N1S1: tiazol (cinco átomos de carbono), isotiazol (cinco átomos de carbono); N2: imidazol (1,3-diazol) (cinco átomos de carbono), pirazol (1,2-diazol) (cinco átomos de carbono), piridazina (1,2-diazina) (seis átomos de carbono), pirimidina (1,3-diazina) (seis átomos de carbono) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (seis átomos de carbono); N3: triazol (cinco átomos de carbono), triazina (seis átomos de carbono); y, N4: tetrazol (cinco átomos de carbono).

20 Los ejemplos de grupos heteroarilo policíclicos incluyen: grupos heterocíclicos con g átomos de carbono (con 2 anillos fusionados) derivados de benzofurano (O1), isobenzofurano (O1), indol (N1), isoindol (N1), indolizina (N1), indolina (N1), isoindolina (N1), purina (N4) (por ejemplo, adenina, guanina), bencimidazol (N2), indazol (N2), benzoxazol (N1O1), bencisoxazol (N1O1), benzodioxol (O2), benzofurazano (N2O1), benzotriazol (N3), benzotiofurano (S1), benzotiazol (N1S1), benzotiadiazol (N2S); grupos doheterocíclicos (con 2 anillos fusionados) derivados de cromeno (O1), isocromeno (O1), cromano (O1), isocromano (O1), benzodioxano (O2), quinolina (N1), isoquinolina (N1), quinolizina (N1), benzoxazina (N1O1), benzodiazina (N2), piridopiridina (N2), quinoxalina (N2), quinazolina (N2), cinolina (N2), ftalazina (N2), naftiridina (N2), pteridina (N4); grupos heterocíclicos con n átomos e carbono (con 3 anillos fusionados) derivados de benzodiazepina (N2); grupos heterocíclicos con trece átomos de carbono (con 3 anillos fusionados) derivados de carbazol (N1), dibenzofuranos (O1), dibenzotiofeno (S1), carbolina (N2), perimidina (N2), piridoindol (N2); y, grupos heterocíclicos de catorce átomos de carbono (con 3 anillos fusionados) derivados de acridina (N1), xanteno (O1), tioxanteno (S1), oxantreno (O2), fenoxatiina (O1S1), fenazina (N2), fenoxazina (N1O1), fenotiazina (N1S1), tiantreno (S2), fenantridina (N1), fenantrolina (N2), fenazina (N2).

35 Los grupos heteroarilo que tienen un átomo de nitrógeno en el anillo en forma de un grupo -NH- pueden ser sustituidos sobre N, es decir, como -NR-. Por ejemplo, pirrol puede estar sustituido sobre el N-metilo, para dar N-metilpirrol. Ejemplos de sustituyentes sobre N incluyen alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-alquilo de 1 a 7 átomos de carbono; alquilo de 1 a 7 átomos de carbono-acilo; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-acilo; carboarilo de 6 a 20 átomos de carbono-alquil de 1 a 7 átomos de carbono-acilo; etc.). Los grupos heteroarilo que tienen un átomo de nitrógeno en el anillo en forma de un grupo -N= pueden estar sustituidos en forma de un N-óxido, es decir, como -N(→ O)= (también indicado como -N+ (→ O")=). Por ejemplo, la quinolina puede ser sustituida para producir N-óxido de quinolina; piridina para producir N-óxido de piridina; benzofurazano para producir N-óxido de benzofurazano (también conocido como benzofuroxano).

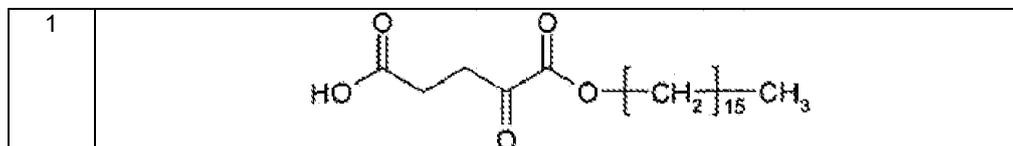
45 Peso molecular

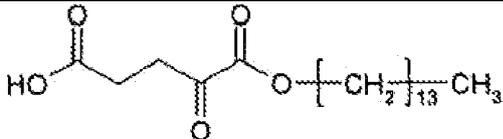
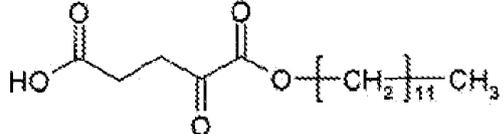
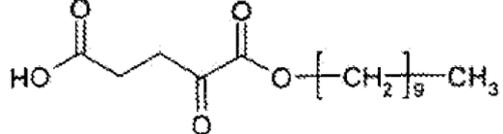
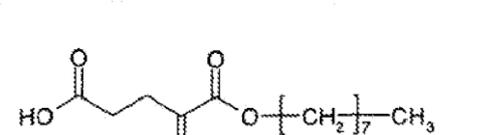
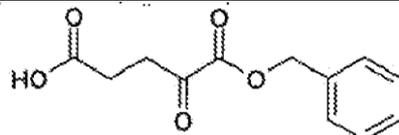
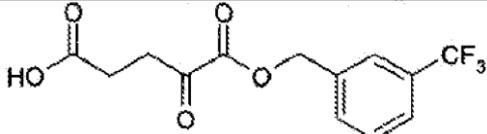
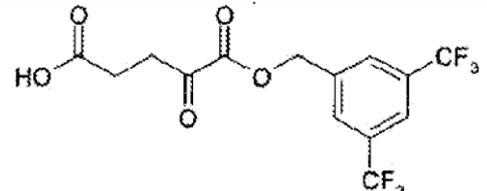
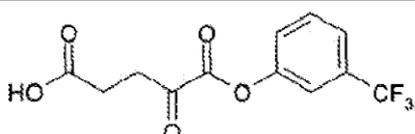
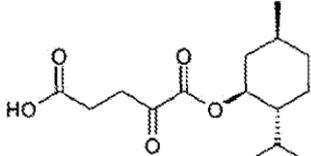
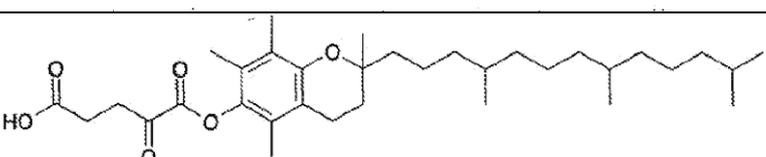
En una realización, el compuesto tiene un peso molecular de 250 a 1.000. En una realización, la parte inferior del intervalo es 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450. En una realización, la parte superior del intervalo es 900; 800; 700; 600; 500; 400. En una realización, el intervalo es de 250 a 900. En una realización, el intervalo es de 250 a 800. En una realización, el intervalo es de 250 a 700. En una realización, el intervalo es de 250 a 600. En una realización, el intervalo es de 250 a 500.

Algunos ejemplos preferidos

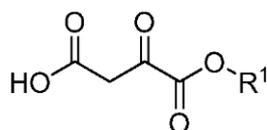
55 Todas las combinaciones posibles y compatibles de las realizaciones descritas anteriormente se dan a conocer en forma explícita en la presente memoria. Cada una de estas combinaciones se da a conocer en la presente memoria en la misma medida como si cada combinación individual se enumerara de forma específica e individual.

60 Ejemplos de algunos compuestos preferidos incluyen los siguientes:



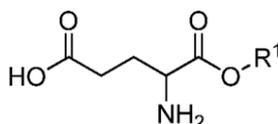
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

En formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (II) en donde R<sup>1</sup> es una fracción como se muestra en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 en la tabla anterior:



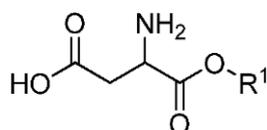
En formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) en donde R<sup>1</sup> es una fracción como se muestra en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 en la tabla anterior:

5



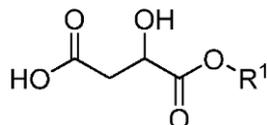
En formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV) en donde R<sup>1</sup> es una fracción como se muestra en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 en la tabla anterior:

10



En formas de realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (V) en donde R<sup>1</sup> es una fracción como se muestra en los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 en la tabla anterior:

15



#### Compuestos antiglicolíticos

En algunas formas de realización, se puede administrar un compuesto antiglicolítico o inhibidor glicolítico a un sujeto para el tratamiento de un trastorno proliferativo tal como cáncer, tal como un cáncer descrito en esta memoria. Los términos "compuesto antiglicolítico" e "inhibidor glicolítico" se utilizan aquí de forma intercambiable.

En formas de realización, un inhibidor glicolítico es un compuesto, que tras su administración, convierte un cáncer positivo por PET (por ejemplo, un tumor) en un cáncer negativo por PET.

En formas de realización, un inhibidor glicolítico es un compuesto, que tras la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva, inhibe una enzima en la ruta glicolítica o inhibe la absorción de glucosa (por ejemplo, inhibe directamente la absorción y/o la formación de glucosa).

En una realización, un inhibidor de glicolítico es un compuesto, que tras la administración, compite directamente con la glucosa, por ejemplo, para un sustrato celular tal como una enzima.

Como se discutió anteriormente, en algunas realizaciones, un inhibidor de glicolítico es un compuesto, que tras la administración, convierte en un cáncer positivo por PET (por ejemplo, un tumor) en un cáncer negativo por PET. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor glicolítico convierte una célula cancerosa que depende de la glicólisis en una célula cancerosa cuya capacidad para la glicólisis está tan deteriorada que es esencialmente incapaz de glicólisis. Los ejemplos de inhibidores glicolíticos, que puede volver una célula cancerosa esencialmente incapaz de glicólisis incluyen: agentes alquilantes; nitrosoureas; antibióticos antitumorales; hormonas corticosteroides; antiestrógenos; inhibidores de aromatasa; progestinas; antiandrógenos; agonistas de LHRH; terapias de anticuerpos; y otras terapias contra el cáncer. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen busulfán, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina dacarbazina (DTIC)<sub>5</sub> (mostaza de nitrógeno), y melfalán. Ejemplos de nitrosoureas incluyen carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina (Adriamicina), idambicina, y mitoxantrona. Ejemplos de hormonas corticosteroides incluyen prednisona y dexametasona. Ejemplos de antiestrógenos incluyen el tamoxifeno y fulvestrant. Ejemplos de inhibidores de aromatasa incluyen anastrozol y letrozol. Un ejemplo de una progestina es acetato de megestrol. Ejemplos de antiandrógenos incluyen bicalutamida, flutamida. Ejemplos de agonistas de LHRH incluyen leuprolida y goserelina. Ejemplos de terapias de anticuerpos incluyen Herceptina y Avastina. Ejemplos de otros compuestos contra el cáncer incluyen L-asparaginasa y tretinoína. En algunas realizaciones, se pueden usar combinaciones o dos o más compuestos contra el cáncer.

Existen numerosos métodos de determinación de si un cáncer depende de la glicólisis o no. Las muestras de

tumores pueden ser extirpadas y examinadas in vitro por cualquiera de varios análisis bien conocidos para determinar si las células son dependientes de la glicólisis. Tales métodos pueden determinar si las células utilizan o no la glicólisis aeróbica o anaeróbica. La tecnología de barrido FDG-PET utiliza altos niveles de absorción de glucosa como marcador para la detección. Las células cancerosas que absorben el derivado de glucosa detectable  $^{18}\text{F}$ fluoro-2-desoxiglucosa se pueden localizar en una imagen de ordenador de la anatomía del paciente. Aquellos cánceres que pueden ser detectados por la tecnología de barrido FDG-PET tienen una alta probabilidad de ser dependiente de la glicólisis.

Las metodologías PET se exponen en Czernin, J. 2002 Acta Medica Austriaca 29: 162-170. Muchos cánceres se caracterizan por una alta tasa de glicólisis en donde el cáncer tiene células que exhiben una mayor tasa de glicólisis que aquella del tejido que lo rodea. Tales células cancerígenas absorben cantidades superiores a la media de la glucosa del ambiente. El cáncer se caracteriza por una alta tasa de glicólisis puede ser identificado mediante la tecnología de formación de imágenes PET, preferiblemente con  $^{18}\text{F}$ fluoro-desoxiglucosa. La detección positiva de un tumor usando un ensayo de este tipo indica que el cáncer se caracteriza por la glicólisis.

Como se ha discutido aquí en otra parte, en algunas realizaciones, un inhibidor glicolítico es un compuesto, que tras la administración, inhibe una enzima en la ruta glicolítica o inhibe la absorción de glucosa (por ejemplo, inhibe directamente la absorción y/o la formación de glucosa). En algunas realizaciones preferidas, el compuesto inhibe selectivamente una isoforma de una enzima en la ruta glicolítica que está presente en las células cancerosas, por ejemplo, isoforma específica del cáncer de una quinasa o deshidrogenasa tal como PKM2 o LDHa. Otros ejemplos de enzimas que pueden ser direcciones por un inhibidor glicolítico en la ruta glicolítica incluyen GLUT1, hexokinasa2, fosofructoquinasa 3 y piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1). En consecuencia, se incluyen en esta memoria compuestos que inhiben una enzima en la ruta glicolítica tal como una enzima que se describe a continuación.

#### Transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1)

Un transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1), también conocido como la familia 2 transportadora de soluto, que facilita el elemento transportador de glucosa 1, o el transportador de glucosa HepG2, es una enzima de la familia de transportadores de azúcar y de la subfamilia transportadora de glucosa. Los transportadores de glucosa (GLUT) facilitan el transporte independiente de energía de la glucosa a través de la membrana celular hidrófoba por debajo de su gradiente de concentración, y cada uno de los GLUT posee diferentes afinidades por la glucosa y otros azúcares. GLUT1 tiene una amplia especificidad de sustrato y puede transportar una amplia gama de aldosas incluyendo tanto las pentosas como las hexosas. En particular, tiene una alta afinidad por la glucosa y puede ser responsable de la captación de glucosa basal o constitutiva requerida para mantener la respiración en las células.

GLUT1 se encuentra principalmente en la membrana de la célula y se expresa en niveles variables en muchos tejidos humanos. Tiene 12 dominios transmembrana  $\alpha$ -helicoidales, cada uno conteniendo 21 residuos de aminoácidos. El precursor de la proteína GLUT1 humana tiene 492 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 54 kDa, y es codificado por el gen SLC2A1 (también conocido como GLUT1). Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de GLUT1 humana y de ratón se describen por ejemplo, en Mueckler y colaboradores, Science 229: 941-945 (1985), y Kaestner y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 3150 - 3154 (1989), respectivamente.

La expresión aumentada y desregulada de GLUT1 se asocia con un aumento de transporte de glucosa en una variedad de células de cáncer (Macheda y colaboradores., J Cell Physiol. 202: 654 - 62 (2005)). La transformación oncogénica de células de mamífero cultivadas puede causar un aumento de la expresión de GLUT1 través de la interacción con los elementos potenciadores del promotor de GLUT1. GLUT1 se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama cultivadas y los niveles de GLUT1 corresponden a sus potenciales invasivos. Los niveles de GLUT1 y la captación de glucosa también se puede aumentar por hipoxia en las células de cáncer de ovario y de pulmón. En el ámbito clínico, la expresión elevada de GLUT1 se observa en una cantidad de cánceres, incluyendo, por ejemplo, cáncer hepático, pancreático, de mama, de esófago, de cerebro, renal, pulmonar, cutáneo, colorrectal, endometrial, de ovario y carcinoma cervical. Los altos niveles de expresión de GLUT1 en tumores también se asocian con una baja supervivencia.

Los inhibidores de GLUT1 son conocidos en la técnica. Los ejemplos de inhibidores de GLUT1 se describen, por ejemplo, en Macheda y colaboradores, J. Cell Physiol. 202: 654-62 (2005), Singh y colaboradores, Mol Cell Endocrinol. 160: 61-66 (2000) y Zhang y colaboradores. Bioconjug. Chem. 14: 709-714 (2003).

#### Hexoquinasa 2 (HK2)

La hexoquinasa 2 (HK2), también conocida como hexoquinasa tipo II o hexoquinasa formadora de músculo, es una enzima de la familia de la hexoquinasa. Las hexoquinasas son enzimas que fosforilan hexosa en fosfato de hexosa. En los vertebrados existen cuatro isoenzimas principales que fosforilan glucosa, denominadas hexoquinasa 1-4. La hexoquinasa 2 cataliza la reacción de  $\text{ATP} + \text{D-hexosa} = \text{ADP} + \text{D-hexosa 6-fosfato}$ . Es una isoenzima de  $K_m$  que tiene una alta afinidad por la glucosa a bajas concentraciones (por ejemplo, por debajo de 1 mM) y sigue la cinética de Michaelis-Menton en concentraciones fisiológicas de sustratos. La hexoquinasa 2 es una enzima alostérica

inhibida por su producto glucosa-6-fosfato.

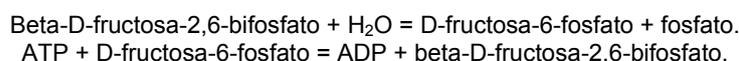
La hexoquinasa 2 se localiza principalmente en la membrana mitocondrial exterior y se expresa predominantemente en tejidos sensibles a insulina tales como el músculo esquelético. La hexoquinasa 2 humana tiene 917 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 102 kDa, y es codificada por el gen HK2. Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de la hexoquinasa 2 humana y de ratón son descritas, en Deeb y colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197: 68-74 (1993), y Heikkilä y colaboradores, *Mamm. Genome.* 11: 91-96 (2000), respectivamente.

La mayor expresión de la hexoquinasa 2 se asocia con una cantidad de cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón, hígado, gastrointestinal y de mama. La hexoquinasa 2 también se sobreexpresa en metástasis de cerebro en pacientes con cáncer de mama. En células cancerosas, el fenotipo altamente glicolítico es apoyado por la sobreexpresión de la hexoquinasa 2. La sobreexpresión de la hexoquinasa 2 conduce a la producción de glucosa-6-fosfato a una tasa elevada, promoviendo por lo tanto un ambiente desfavorable para las células normales y apoyando la proliferación celular. La hexoquinasa 2 también puede aumentar la metástasis por la supresión de la muerte de células cancerosas (Mathupala y colaboradores, *Oncogene* 25: 4777-4786 (2006)).

Los inhibidores de la hexoquinasa 2 se conocen en la técnica. Los ejemplos de los inhibidores de hexoquinasa 2 se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos serial No. 5.854.067, Mathupala y colaboradores, *Oncogene* 25: 4777-4786 (2006), y Kim y colaboradores, *Mol. Ther. cáncer.* 6: 2554-2562 (2007).

#### Fosfofructoquinasa 3 (PFKFB3)

La fosfofructoquinasa 3 (PFKFB3), también conocida como la isoenzima tipo cerebro-placenta 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa 3, 6PF-2-K / Fru-2,6-P2ASE, iPFK-2, o antígeno de carcinoma renal NY-REN-56, es una enzima de la familia 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK2 / FBPa), y la familia de la fosfoglicerato-mutasa. En los humanos existen cuatro PFK2 / FBPasas principales, denominadas PFK2 / FBPasas 1 - 4. Las PFK2 / FBPasas controlan la concentración de estado estacionario de la fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-BP). La PFKFB3 puede catalizar la siguiente reacción:



La PFKFB3 tiene tanto dominios de 6-fosfofructo-2-quinasa como fructosa-2,6-bisfosfatasa y se expresa en forma ubicua en los tejidos. Los precursores de las isoformas 1 y 2 de PFKFB3 humana tienen 520 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 60 kDa y 514 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 59 kDa, respectivamente. La PFKFB3 humana es codificada por el gen PFKFB3. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de PFKFB3 humana y de ratón se describen por ejemplo, en Sakai y colaboradores, *J. Biochem.* 119: 506-511 (1996), Manzano y colaboradores, *Cell Genet.* 83: 214-217 (1998), y el MGC Project Team, *Genome Res.* 14: 2121-2127 (2004).

La PFKFB3 se sobreexpresa en una cantidad de células cancerosas incluyendo, por ejemplo, leucemia, cáncer de colon, próstata, pulmón, mama, páncreas, tiroides, y de ovario y se requiere para el crecimiento de ciertas líneas celulares de leucemia y de cáncer de cuello uterino (Clem y colaboradores, *Mol. Cancer Ther.* 7: 110 - 20 (2008)). Mediante la regulación de la concentración de la fructosa-2,6-bisfosfato intracelular, la PFKFB3 controla el flujo glicolítico hasta lactato y la derivación de pentosa no oxidativa, y se requiere para la alta tasa glicolítica y el crecimiento independiente del anclaje de las células transformadas con ras (Chesney, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9: 535-539 (2006)).

Los inhibidores de PFKFB3 son conocidos en la técnica. Los ejemplos de inhibidores de PFKFB3 se describen por ejemplo, en la Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0074884 y Clem y colaboradores, *Mol. Ther. Cancer.* 7: 110-20 (2008).

#### Piruvato quinasa M2 (PKM2)

La piruvato quinasa M2 (PKM2), también conocida como isoenzima muscular piruvato quinasa, piruvato quinasa 2/3, proteína que se enlaza a la hormona tiroidea citosólica, THBP1, p58, M2-PK, o M2-PK de tumor, es una enzima de la familia de la piruvato quinasa. Existen cuatro isoenzimas de la piruvato quinasa en mamíferos: L, R, M1 y M2. El tipo L es la isoenzima principal, en el hígado, R se encuentra en los glóbulos rojos, M1 es la forma principal en el músculo, el corazón y el cerebro, y M2 se encuentra en tejidos fetales tempranos, así como en la mayoría de las células cancerosas. PKM2 es una enzima glicolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo desde fosfoenolpiruvato (PEP) hasta ADP, generando ATP. La PKM2 existe como un monómero en ausencia de FBP, y se asocia en forma reversiblemente un homotetrámero en presencia de FBP. La formación del tetrámero induce la actividad de la piruvato quinasa. La forma tetramérica tiene una alta afinidad por el sustrato y se asocia dentro del complejo de la enzima glicolítica. La relación entre la forma tetramérica altamente activa y la forma dimérica casi inactiva determina si los carbonos de la glucosa se canalizan hacia los procesos biosintéticos o se usan para la

producción de ATP glicolítico. La PKM2 es activada en forma alostérica por la D-fructosa-1,6-bifosfato (FBP) y se inhibe por el oxalato y la 3,3',5-triyodo-L-tironina (T3). La actividad de la forma tetramérica se inhibe por PML.

5 La PKM2 estimula la activación transcripcional mediada por POU5F1 y juega un papel en la muerte celular independiente de la caspasa de las células tumorales. Existe en una forma dimérica relativamente inactiva en células tumorales y la forma dimérica tiene menos afinidad por el sustrato. El enlazamiento con ciertas oncoproteínas, por ejemplo, con la oncoproteína HPV-16 E7 puede desencadenar la dimerización. La FBP estimula la formación de tetrámeros a partir de los atenuadores. La transición entre las formas tetramérica y dimérica contribuye al control de la glicólisis y es importante para proliferación y supervivencia de las células tumorales.

10 El precursor de la PKM2 humana tiene 531 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 58 kDa y es codificado por el gen PKM2 (también conocido como PK2, PK3, o PKM). Las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de PKM2 humano y de ratón se describen por ejemplo, en Tani y colaboradores, Gene 73: 509-516 (1988), Kato y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 7861 - 7865 (1989), Izumi y colaboradores, Biochim. Biophys. Acta 1267: 135-138 (1995), y de Luis y del Mazo, Biochim. Biophys. Acta 1396: 294-305 (1998).

15 Los inhibidores de PKM2 son conocidos en la técnica. Ejemplos de inhibidores de PKM2 se describen por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2008/0021116, publicación de las solicitudes internacionales de patentes Nos. WO 2008/019139 y WO 2006/125323, Spoden y colaboradores, Int. J. Cancer 123: 312-321 (2008), y el resumen # 4408, AACR reunión anual número cien (Denver, CO, EE.UU., 18-22 de abril de, 2009).

#### Lactato deshidrogenasa A (LDHa)

25 La lactato deshidrogenasa A (LDHa), también conocida como subunidad LDH del músculo, antígeno de carcinoma renal NY-REN-59, proteína del gen 19 que induce proliferación celular, es una enzima de la familia LDH y de la superfamilia LDH/MDH. LDHa cataliza la conversión de L-lactato y NAD<sup>+</sup> en piruvato y NADH en la etapa final de la glicólisis anaeróbica.

30 La LDHa se localiza principalmente en el citoplasma y puede formar una homotetrámero. Muchos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer testicular, sarcoma de Ewing, linfoma no Hodgkin, y algunos tipos de leucemia, así como otras enfermedades, pueden provocar que se eleven los niveles de LDHa. La reducción en la actividad de LDHa puede estimular la respiración mitocondrial y compromete la capacidad de las células tumorales para proliferar bajo hipoxia (Fantin y colaboradores, Cancer Cell. 9: 425-434 (2006)). Los defectos en LDHa son también una causa de mioglobinuria por esfuerzo.

35 El precursor de la isoforma 1 de LDHa humana tiene 332 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 37 kDa, y el precursor de la isoforma 2 de LDHa humana tiene 332 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 36 kDa. La LDHa humana es codificada por el gen LDHa. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos LDHa humana y de ratón se describen, por ejemplo, en Tsujibo y colaboradores, Eur. J. Biochem. 147: 9-15 (1985), de Ota y colaboradores, Nat. Genet. 36: 40-45 (2004), Li y colaboradores, Eur. J. Biochem. 149: 215-225 (1985), y Akai y colaboradores, Int. J. Biochem. 17: 645-648 (1985).

40 Los inhibidores de LDHa son conocidos en la técnica. Los ejemplos de inhibidores de LDHa se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.853.742 y 6.124.498, y en la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 98/36774.

#### Isoforma 1 de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1)

45 La isoforma 1 de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1), es una enzima de la familia de la proteína quinasa piruvato deshidrogenasa quinasa/alfa-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada PDK/BCKDK. Las piruvato deshidrogenasa quinasa inactivan la piruvato deshidrogenasa mediante su fosforilación usando ATP. La PDK tiene cuatro isozimas, denominadas como PDK1-4. La PDK1 inhibe al complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial mediante la fosforilación de la subunidad alfa E1, contribuyendo así a la regulación del metabolismo de la glucosa. La actividad catalítica de PDK1 se puede ilustrar como:

ATP + [piruvato deshidrogenasa (que transfiere acetilo)]=ADP + [piruvato deshidrogenasa (que transfiere acetilo)] fosfato.

50 La PDK1 se localiza principalmente en la matriz mitocondrial y se expresa predominantemente en el corazón. La inhibición de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) por la PDK1 contribuye al fenotipo maligno en una cantidad de cánceres, por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y está asociada con la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . La inhibición de la expresión de la PDK1 puede conducir a la reducción de los niveles de lactato, la expresión de HIF-1 $\alpha$ , y el grado del fenotipo maligno en las células cancerosas (McFate y colaboradores, J. Biol. Chem. 283: 22700-22708 (2008)).

El precursor de PDK1 tiene 436 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 49 kDa. La PDK1 humana es codificada por el gen PDK11. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la PDK1 humana se describen por ejemplo, en Gudi y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 270: 28989 - 28994 (1995), el MGC Project Team, *Genome Res.* 14: 2121-2127 (2004), y Carninci y colaboradores, *Ciencia* 309: 1559-1563 (2005).

Los inhibidores PDK1 son conocidos en la técnica. Los ejemplos de inhibidores de PDK1 se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.878.712, en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0209618, en las publicaciones de las solicitudes internacionales de patentes Nos: WO 2001/052825, WO 2002/081751 y WO 2005/092040, Cairns y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 104: 9445-9450 (2007), Mann y colaboradores, *Biochim. Biophys Acta.* 1480: 283-292 (2000), y Aicher y colaboradores, *J. Med. Chem.* 42: 2741-2746 (1999).

Los compuestos candidatos se pueden evaluar para la inhibición de una enzima descrita en la presente memoria, por ejemplo, una enzima glicolítica, usando métodos conocidos en la técnica.

Como se discutió anteriormente, en algunas realizaciones, un inhibidor glicolítico es un compuesto, que tras la administración, compite directamente con glucosa. Los ejemplos de compuestos incluyen derivados estructurales de glucosa tales como 2-desoxiglucosa (es decir, 2dg).

## 20 Antioxidantes

En algunas realizaciones, se puede administrar un compuesto antioxidante a un sujeto para el tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular tal como cáncer, tal como un cáncer descrito en esta memoria.

El término "antioxidante" como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que disminuye o evita la oxidación de una molécula, por ejemplo, la transferencia de electrones de un sustrato a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que pueden iniciar una reacción en cadena que dañan las células. Los antioxidantes pueden terminar estas reacciones en cadena mediante la eliminación de los compuestos intermedios de los radicales libres, e inhibir otras reacciones de oxidación porque ellos mismos se oxidan. Los ejemplos de antioxidantes incluyen agentes reductores tales como tioles, ácidos ascórbico, o fenoles (por ejemplo, un polifenol).

En general, los antioxidantes se clasifican en dos divisiones amplias, solubles en agua (es decir, hidrofílicos) o solubles en lípidos (es decir, hidrófobos). En general, los antioxidantes solubles en agua reaccionan con oxidantes en el citosol de la célula y el plasma celular, mientras que los antioxidantes solubles en lípidos protegen la membrana celular de la peroxidación lipídica. Los ejemplos de antioxidantes solubles en agua incluyen ácido ascórbico, glutatión, ácido lipoico y ácido úrico. Los ejemplos de antioxidantes solubles en lípidos incluyen carotenos, alfa-tocoferol, y ubiquinol. Los ejemplos de antioxidantes fenólicos incluyen resveratrol y flavonoides. En algunas realizaciones, el antioxidante es un antioxidante enzimático tal como superóxido dismutasa, catalasa, peroxirredoxina, tioredoxina y sistemas de glutatión.

Los compuestos candidatos se pueden evaluar por la actividad antioxidantes usando ensayos conocidos en la técnica.

## 45 Agentes de hipometilación

Se ha descubierto que ciertos genes en los pacientes (por ejemplo, pacientes con AML, MDS o glioma) albergan una mutación IDH (por ejemplo, una mutación IDH1 o IDH2) tienen mayor metilación (por ejemplo, la hipermetilación) en la región promotora. En algunas realizaciones, se puede administrar un agente de hipometilación a un sujeto para el tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular tal como cáncer, tal como un cáncer descrito en esta memoria.

El término "agente de hipometilación" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto que inhibe la metilación del ADN. El término "agente de hipometilación" se puede utilizar en forma intercambiable con el término agente de "desmetilación".

Los ejemplos de agentes de hipometilación incluyen los siguientes compuestos, decitabina (5-aza-desoxicitidina), zebularina, isotiocianatos, azacitidina (5-azacitidina), 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina, etionina, S-adenosil-L-homocisteína, mitoxantrona, neplanocina A, 3-desazaneplanocina A, cicloleucina, hidralazina, fenilhexil isotiocianato, curcumina, partenolida, y SGI-1027.

Compuestos terapéuticos adicionales - Compuestos que aumentan el nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato.

En algunas realizaciones, se puede usar un compuesto (generalmente) que aumenta el nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato (por ejemplo, en una célula) en un método descrito en esta memoria. Por ejemplo, un compuesto puede aumentar los niveles de  $\alpha$ -cetoglutarato mediante la inhibición de otras enzimas tales como  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y / o cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada. El bloqueo de estas enzimas puede tener un efecto dual de

aumentar los niveles de  $\alpha$ -cetoglutarato y disminuir los niveles de succinato.

Además, ambas enzimas son homólogas estructurales que utilizan el ácido lipoico como cofactor. Por lo tanto, un análogo de ácido lipoico puede ser otro inhibidor potencial de estas enzimas, y así ser un compuesto que aumenta el nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato.

Alternativamente, un compuesto puede aumentar el nivel de  $\alpha$ -cetoglutarato mediante el refuerzo de la actividad de la glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT). La glutamato por sí misma activará la actividad de GOT conduciendo a niveles mayores de  $\alpha$ -cetoglutarato.

Además, se puede seleccionar el compuesto a partir de metabolitos secuencia arriba del ciclo de la TCA que incluye oxaloacetato, citrato, isocitrato, y derivados de los mismos. Compuestos adicionales, generalmente  $\alpha$ -cetoglutaratos.

Se describen aquí ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, sales de  $\alpha$ -cetoglutarato, y derivados de ácido cetoglutarico (por ejemplo, ésteres de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, en general), y, especialmente, su uso en medicina, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer descrito en esta memoria.

En una realización, el compuesto es un  $\alpha$ -cetoglutarato que porta (por ejemplo, conjugado a, acoplado a) una fracción de aminoácido (por ejemplo, una fracción de aminoácidos  $\alpha$ ) (por ejemplo, una fracción de ornitina o arginina).

En una realización, el compuesto es un éster de  $\alpha$ -cetoglutarato (es decir, un éster de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico) que tiene una fracción de aminoácido (por ejemplo, una fracción de aminoácidos  $\alpha$ ) (por ejemplo, una fracción de ornitina o arginina) que es, o es parte de, un grupo éster (es decir,  $-C(=O)OR$ ) formado a partir de uno de los grupos ácidos del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico.

Tales compuestos son conocidos en la literatura (véase, por ejemplo Le Boucher y colaboradores (1997)) y / o están comercialmente disponibles y / o se pueden preparar utilizando procedimientos convencionales de síntesis conocidos por expertos en la técnica.

Isómeros

Ciertos compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantiómeras, diastereómeras, epiméricas, atrópicas, estereoisómeras, tautómeras, conformacionales, o anoméricas particulares, incluyendo pero sin limitarse a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t, y r; formas endo y exo; formas R, S, y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol, y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas  $\alpha$  y  $\beta$ ; formas axial y ecuatorial; formas de bote, de silla, de envoltura, y de silla media; y combinaciones de los mismos, en lo sucesivo denominadas como "isómeros" (o "formas isoméricas").

En una realización, un compuesto descrito en la presente memoria, por ejemplo, un inhibidor de una neoactividad o 2-HG es un isómero enriquecido enantioméricamente de un estereoisómero descrito en esta memoria. Por ejemplo, el compuesto tiene un exceso enantiomérico de al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Enantiómero, cuando se utiliza aquí, se refiere a cualquier par de compuestos químicos cuyas estructuras moleculares tienen una relación de imagen especular entre sí.

En una realización, una preparación de un compuesto descrito en la presente memoria se enriquece con un isómero del compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, que corresponde a un estereocentro seleccionado, por ejemplo, la posición 2 del ácido 2-hidroxiglutarico. 2HG puede ser adquirido a partir de fuentes comerciales o se puede preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Org. Syn. Coll vol., 7, página 99, 1990. Por ejemplo, el compuesto tiene una pureza correspondiente a un compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado de al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%.

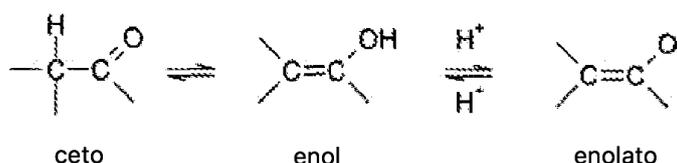
En una realización, una composición descrita en la presente memoria incluye una preparación de un compuesto divulgado en la presente memoria que se enriquece con una estructura o estructuras que tienen una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, en un estereocentro seleccionado, por ejemplo, la posición 2 del ácido 2-hidroxiglutarico. Los ejemplos de configuraciones R/ S pueden ser aquellos proporcionados de un ejemplo descrito en esta memoria.

Una "preparación enriquecida", como se utiliza en la presente memoria, se enriquece para una estereoconfiguración seleccionada de uno, dos, tres o más estereocentros seleccionados dentro del compuesto objetivo. Los ejemplos de estereocentros seleccionados y los ejemplos de estereoconfiguraciones de los mismos pueden ser seleccionados de los proporcionados en la presente memoria, por ejemplo, en un ejemplo descrito en esta memoria. Por enriquecido se entiende que al menos 60%, por ejemplo, de las moléculas del compuesto en la preparación, tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado. En una realización es al menos del 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Enriquecido se refiere al nivel de una(s) molécula(s) objetivo y no sugiere una limitación del proceso a menos que se especifique.

5 Obsérvese que, excepto como se discute más adelante para las formas tautómeras, específicamente excluidas del término "isómeros", como se utiliza en esta memoria, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en vez de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi,  $-\text{OCH}_3$ , no debe ser interpretado como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . En forma similar, una referencia a un orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir también formas estructuralmente isoméricas que caen dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo de 1 a 7 átomos de carbono incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n, iso, sec y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto, meta y para-metoxifenilo).

10 La exclusión anterior no pertenece a las formas tautómeras, por ejemplo, las formas ceto, enol, y enolato, como por ejemplo en, los siguientes pares de tautómeros: ceto / enol (ilustrado a continuación), imina / enamina, amida / imino alcohol, amidina / amidina, nitroso / oxima, tiocetona / enotiol, N-nitroso / hidroxiazó, y nitro / aci-nitro.



20 Obsérvese que se incluye específicamente en el término "isómero" a los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 1H, 2H (D), y 3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 12C, 13C, y 14C; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 16O y 18O; y similares. A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluye todas las formas isoméricas posibles, incluyendo mezclas (total o parcialmente) racémicas y otras mezclas de los mismos. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isómeras son o bien conocidas en la técnica o se obtienen fácilmente por adaptación de los métodos enseñados en la presente memoria, o de métodos conocidos, en una forma conocida.

30 Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y / o manejar una sal correspondiente de compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se discuten en Berge y colaboradores, 1977, "Pharmaceutically acceptable salts". J. Pharm. Sci. Vol. 66, páginas 1-19.

35 Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo,  $-\text{COOH}$  puede ser  $-\text{COO}^-$ ), entonces se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos tales como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , cationes alcalinotérreos tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y otros cationes tales como  $\text{Al}^{3+}$ . Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ion amonio (es decir,  $\text{NH}_4^+$ ) y iones amonio sustituidos (por ejemplo,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Los ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion amonio cuaternario común es  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

45 Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (por ejemplo,  $-\text{NH}_2$  puede ser  $-\text{NH}_3^+$ ), entonces una sal se puede formar con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico, y fósforo.

50 Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetiloxibenzóico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftaleno carboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, múcico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, y valérico. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

60 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye las formas salinas de los mismos.

## Formas químicamente protegidas

5 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y / o manejar el compuesto activo en una forma químicamente protegida. El término "forma químicamente protegida" se utiliza aquí en el sentido químico convencional y se refiere a un compuesto en el cual uno o más grupos funcionales se protegen de reacciones químicas indeseables bajo condiciones especificadas (por ejemplo, pH, temperatura, radiación, disolvente, y similares). En la práctica, se emplean procedimientos químicos bien conocidos para volver un grupo funcional no reactivo en forma reversible, que de lo contrario sería reactivo, bajo condiciones especificadas. En una forma químicamente protegida, uno o más

10 grupos funcionales están en la forma de un grupo protegido o de protección (también conocido como un grupo enmascarado o de enmascaramiento o un grupo bloqueado o de bloqueo). Mediante la protección de un grupo funcional reactivo, las se pueden proteger reacciones que involucran otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar el grupo protegido; el grupo de protección puede ser removido, usualmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente el resto de la molécula. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green y P. Wuts; 3ª Edición; John Wiley y Sons, 1999). A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye formas químicamente protegidas del mismo.

Se utilizan ampliamente una amplia variedad de tales métodos de "protección", "bloqueo", o "enmascaramiento" y son bien conocidos en síntesis orgánica. Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, ambos serían reactivos bajo las condiciones especificadas, puede formar derivados para volver a uno de los grupos funcionales "protegido", y por lo tanto no reactivo, bajo las condiciones especificadas; así protegido, el compuesto puede ser utilizado como un reactivo que tiene efectivamente solamente un grupo funcional reactivo. Después de que la reacción deseada (que involucra al otro grupo funcional) se completa, el grupo protegido puede ser "desprotegido" para devolverlo a su funcionalidad original.

25 Por ejemplo, un grupo hidroxilo puede ser protegido como un éter (-OR) o un éster (-OC(=O)R), por ejemplo, como: un t-butil éter; un bencilo, benzhidrido (difenilmetilo), o tritil (trifenilmetilo) éter; un trimetilsililo o t-butildimetilsilil éter; o un acetil éster (-OC(=O)CH<sub>3</sub>, -OAc).

30 Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona puede ser protegido como un acetal, (R-CH(OR)<sub>2</sub>) o cetal (R<sub>2</sub>C(OR)<sub>2</sub>), respectivamente en el cual el grupo carbonilo (>C=O) se convierte en un diéter (>C(OR)<sub>2</sub>), por reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. El grupo aldehído o cetona es fácilmente regenerado por hidrólisis utilizando un gran exceso de agua en presencia de ácido.

35 Por ejemplo, un grupo amina puede ser protegido, por ejemplo, como una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo, como: una metil amida (-NHCO-CH<sub>3</sub>); una benciloxi amida (-NHCO-OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -NH-Cbz); como una t-butoxi amida (-NHCO-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi amida (-NHCO-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -NH-Bpoc), como una 9-fluorenilmetoxi amida (-NH-Fmoc), como una 6-nitroveratriloxi amida (-NH-NVOC), como una 2-trimetilsililetiloxy amida (-NH-Teoc), como una 2,2,2-tricloroetiloxi amida (-NH-Troc), como una aliloxi amida (-NH-Aloc), como una 2-(fenilsulfonyl)etiloxi amida (-NH-Psec); o, en casos adecuados (por ejemplo, aminas cíclicas), como un radical nitróxido (>N-O«).

45 Por ejemplo, se puede proteger un grupo ácido carboxílico como un éster, por ejemplo, como: un C<sup>α</sup>alquil éster (por ejemplo, un metil éster; un t-butil éster); un C<sup>γ</sup>haloalquil éster (por ejemplo, un trihaloalquil éster de 1 a 7 átomos de carbono); un trialquilililo de 1 a 7 átomos de carbono-alquiléster de 1 a 7 átomos de carbono; o un aril de 5 a 20 átomos de carbono-alquil éster de 1 a 7 átomos de carbono (por ejemplo, un bencil éster; un nitrobencilo éster); o como una amida, por ejemplo, como una metil amida.

50 Por ejemplo, un grupo tiol puede ser protegido como un tioéter (-SR), por ejemplo, como: un bencil tioéter; un acetamidometil éter (-S-CH<sub>2</sub>NHC(=O)CH<sub>3</sub>).

## Profármacos

55 Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y / o manipular el compuesto activo en la forma de un profármaco. El término "profármaco", como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que, cuando se metaboliza (por ejemplo, in vivo), produce el compuesto activo deseado. Típicamente, el profármaco es inactivo, o menos activo que el compuesto activo, pero puede proporcionar propiedades ventajosas de manipulación, administración o metabólicas.

60 A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye profármacos de los mismos.

65 Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo, un éster fisiológicamente aceptable metabólicamente lábil). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) se escinde para producir el fármaco activo. Tales ésteres pueden formarse por esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos ácido carboxílico (-C(=O)OH) en el compuesto original, con, cuando es apropiado, protección previa de cualquier otro de

los grupos reactivos presentes en el compuesto original, seguido por desprotección si se requiere.

5 También, algunos profármacos son activados enzimáticamente para producir el compuesto activo, o un compuesto que, tras la reacción química adicional, produce el compuesto activo (por ejemplo, como en ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado glicósido, o puede ser un derivado éster del aminoácido.

#### Síntesis química

10 El método de síntesis puede emplear grupos protectores, por ejemplo, grupos de protección de O, tales como grupos que se sabe que son adecuado para la protección de grupos hidroxilo primarios y / o secundarios, por ejemplo, los grupos de protección de O mencionados en "Protective Groups in Organic Chemistry", editado por JWF McOmie, Plenum Press (1973), y "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª edición, T. W. Greene & P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1999). Algunos grupos de protección de O preferidos incluyen grupos alquilcarbonilo y arilcarbonilo (por ejemplo, acilo, por ejemplo, benzilo), grupos triarilmetilo (por ejemplo, trifenilmetilo (trilito) y dimetoxitritilo) y grupos sililo (por ejemplo, triarilsililo, tal como trimetilsililo).

#### Inhibidores basados en ácido nucleico

20 Los inhibidores basados en ácidos nucleicos para la inhibición de IDH, por ejemplo, IDH1, pueden ser, por ejemplo, ARN bicatenario (ARNbc) que funciona, por ejemplo, por una ARN de interferencia (mecanismo de ARNi), un ARN antisentido, o un microARN (miARN). En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico se enlaza con el ARNm objetivo e inhibe la producción de la proteína de la misma, por ejemplo, mediante escisión del ARNm objetivo.

#### 25 ARN bicatenario (ARNbc)

Un inhibidor con base en ácido nucleico útil para disminuir la función mutante IDH1 o IDH2 es, por ejemplo, un ARNbc, tal como un ARNbc que actúa por medio de un mecanismo de ARNi. ARNi se refiere a un proceso de silenciamiento génico post-transcripcional específico de la secuencia en animales mediado por los ARN cortos de interferencia (ARNci). Los ARNbc como se utilizan en la presente memoria se entiende que incluyen los ARNci. Típicamente, la inhibición de IDH, por ejemplo, IDH1, por los ARNbc no desencadena la respuesta del interferón que resulta de la activación mediada por ARNbc de la proteína quinasa PKR y 2',5'-oligoadenilato sintetasa que resulta en escisión no específica del ARNm por la ribonucleasa L.

35 Los ARNbc que direccionan una enzima IDH, por ejemplo, IDH1, por ejemplo, de tipo silvestre o mutante, pueden ser no modificadas o modificadas químicamente. Los ARNbc pueden ser sintetizados químicamente, expresados a partir de un vector o sintetizados enzimáticamente. La invención también presenta diversas moléculas de ARNbc sintéticas químicamente modificados capaces de modular la expresión del gene IDH1 o la actividad en células mediante ARN de interferencia (ARNi). El uso de ARNbc modificado químicamente mejora diversas propiedades de las moléculas ARNbc nativas, tal como a través de la mayor resistencia a la degradación por nucleasa in vivo y / o a través de una absorción celular mejorada.

40 Los ARNbc de direccionamiento del ácido nucleico pueden estar compuestos de dos ARN separados, o de una cadena de ARN, que se pliega para formar una estructura de horquilla. Los ARNbc de horquilla se denominan típicamente como los ARNhc.

45 Un ARNhc que dirige IDH, por ejemplo, un gen IDH1 mutante o de tipo silvestre puede expresado a partir de un vector, por ejemplo, un vector viral, tal como un vector lentiviral o adenoviral. En ciertas realizaciones, un ARNbc adecuados para inhibir la expresión de un gen IDH1 será identificado mediante el cribado de una biblioteca de ARNpi, tal como una biblioteca de ARNpi adenoviral o lentiviral.

50 En una realización, un ARNbc que dirige IDH, por ejemplo, IDH1, es de aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 pares de bases de longitud (por ejemplo, aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, o 29) pares de bases de longitud. En otra realización, el ARNbc incluye extremos sobresalientes de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, o 3) nucleótidos. Por "sobresaliente" se entiende que el extremo 3' de una cadena de ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa. El ARNbc puede tener una saliente en uno o ambos extremos de la molécula de ARNbc. En algunas realizaciones, la saliente monocatenaria se localiza en el extremo del terminal 3' de la cadena antisentido, o, alternativamente, en el extremo del terminal 3' de la cadena sentido. En algunas realizaciones, la saliente es una saliente de dinucleótidos TT o UU, una saliente de dinucleótido TT o UU. Por ejemplo, en una realización, el ARNbc incluye una cadena antisentido de 21-nucleotidos, una región dúplex de 19 pares de bases, y un dinucleótido en el terminal 3'. En aún otra realización, una ARNbc incluye un dúplex de ácido nucleico, en donde ambos extremos son romos, o alternativamente, en donde uno de los extremos es romo.

60 En una realización, el ARNbc incluye una primera y una segunda cadena, cada cadena es de aproximadamente 18 hasta aproximadamente 28 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 19 hasta aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, la primera cadena del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente

complementariedad con el ARN de IDH, por ejemplo, IDH1, para que el ARN dirija la escisión del ARNm de IDH, por ejemplo, IDH1, a través ARN de interferencia, y la segunda cadena de ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la primera cadena.

5 En una realización, un ARNbc que direcciona un gen IDH, por ejemplo, IDH1, puede tener como objetivo formas de tipo silvestre y formas mutantes del gen, o puede tener como objetivo diferentes isoformas alélicas del mismo gen. Por ejemplo, el ARNbc tendrá como objetivo una secuencia que es idéntica en dos o más de las diferentes isoformas. En una realización, el ARNbc direcciona una IDH1 que tiene G en la posición 395 o C en la posición 394 (por ejemplo, un ARN de IDH1 de tipo silvestre) y una IDH1 que tiene A en la posición 395 o A en la posición 394 (por ejemplo, un ARN de IDH1 que porta una mutación G395A y / o C394A) (Fig. 2).

10 En una realización, un ARNbc tendrá como objetivo preferencial o específicamente un ARN de IDH mutante, o un polimorfismo particular de IDH. Por ejemplo, en una realización, el ARNbc tendrá como objetivo un ARN de IDH1 que porta una A en la posición 395, por ejemplo, G395A, y en otra realización, el ARNbc que direcciona un ARN de IDH1 que porta una A en la posición 394, por ejemplo, la mutación C394A.

15 En una realización, un ARNbc que direcciona un ARN de IDH incluye una o más modificaciones químicas. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones químicas incluyen sin limitación, enlaces internucleótidos fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-O-metilribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "acíclicos", nucleótidos 5-C-metilo, y la incorporación de un residuo desoxi abásico invertido y / o glicerilo terminal. Tales modificaciones químicas han mostrado que preservan la actividad de ARNi en las células mientras que al mismo tiempo, se aumenta dramáticamente la estabilidad en suero de estos compuestos. Además, una o más sustituciones fosforotioato son bien toleradas y se ha demostrado que confieren aumentos sustanciales en estabilidad en suero para constructos de ARNbc modificados.

20 En una realización, un ARNbc que direcciona un ARN de IDH, por ejemplo, IDH1, incluye nucleótidos modificados mientras mantiene la capacidad para mediar ARNi. Los nucleótidos modificados se pueden usar para mejorar las características in vitro o in vivo tales como la estabilidad, la actividad, y / o biodisponibilidad. Por ejemplo, el ARNbc puede incluir nucleótidos modificados como un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula. Como tal, el ARNbc puede incluir generalmente aproximadamente 5% hasta aproximadamente 100% de nucleótidos modificados (por ejemplo, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de nucleótidos modificados).

25 En algunas realizaciones, el ARNbc que direcciona IDH, por ejemplo, IDH1, tiene aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. En otra realización, el ARNbc no contiene ningún ribonucleótido, y en otra realización, el ARNbc incluye uno o más ribonucleótidos. En una realización, cada cadena de la molécula de ARNbc incluye independientemente aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30) nucleótidos, en donde cada cadena comprende aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30) nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de la otra cadena. En una realización, una de las cadenas del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos o una porción de la misma del gen IDH1 o IDH2, y la segunda cadena del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a la secuencia de nucleótidos del gen IDH1 o IDH2 o una porción del mismo.

30 En una realización, el ARNbc que direcciona IDH1 o IDH2 incluye una región antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen IDH1 o IDH2 o una porción del mismo, y una región sentido que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a la secuencia de nucleótidos del gen IDH1 o IDH2 o una porción del mismo. En una realización, la región antisentido y la región sentido incluyen independientemente aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30) nucleótidos, en donde la región antisentido incluye aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30) nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de la región sentido.

35 Como se utiliza aquí, el término "ARNbc" se entiende que incluye una moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar la secuencia específica de ARNi, tal como ARN corto de interferencia (ARNci), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido corto de interferencia, ácido nucleico corto de interferencia, oligonucleótido modificado corto de interferencia oligonucleótido modificado, ARNci modificados químicamente, ARN que silencia al gen post-transcripcional (ARNsgpt), y otros. Además, como se utiliza en esta memoria, el término "ARNi" se entiende que incluye ARN de interferencia específico de la secuencia, tal como el silenciamiento del gen post-transcripcional, inhibición de la traducción, o epigenéticos.

Inhibidores de IDH con base en ácido nucleico

40 En una realización, el inhibidor es un inhibidor con base en ácido nucleico, tal como un ARN bicatenario (ARNbc) o ARN antisentido que direcciona un IDH mutante, por ejemplo, IDH1o IDH2 mutante.

- 5 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico, por ejemplo, una molécula de ARNbc o antisentido, disminuye o inhibe la expresión de una IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg, por ejemplo, que tiene un His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo describe en Yan y colaboradores, N. Eng. J. Med. 360: 765-73, en el residuo 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la figura 21), específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu. En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una enzima IDH1 que tiene His en el residuo 132. Otras mutaciones IDH1 asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, incluyen mutaciones en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, y mutaciones en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109. Aún otras mutaciones asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70D), mutaciones en el residuo 99, por ejemplo, una mutación que tiene un residuo diferente de Ile en el residuo 99 (por ejemplo, I99M); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I). En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona un ARNm que codifica un alelo IDH1 descrito en esta memoria, por ejemplo, un alelo IDH1 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier residuo describe en Yan y colaboradores, en el residuo 132, específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). Otras mutaciones IDH1 asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG, incluyen mutaciones en el residuo 100, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 100, y las mutaciones en el residuo 109, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 109. Aún otras mutaciones asociadas con neoactividad del hidroxilo alfa, por ejemplo, neoactividad de 2HG incluyen mutaciones en el residuo 70, por ejemplo, una mutación que tiene un aminoácido diferente de Gly en el residuo 70, (por ejemplo, G70V); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ile en el residuo 130 (por ejemplo, I130M); una mutación que tiene un aminoácido diferente de His en el residuo 133 (por ejemplo, H133Q); una mutación que tiene un aminoácido diferente de Ala en el residuo 134 (por ejemplo, A134D); o una mutación que tiene un residuo diferente de Val en el residuo 178 (por ejemplo, V178I).
- 30 En una realización, el alelo codifica un IDH1 que tiene His en el residuo 132.
- En una realización, el alelo codifica un IDH1 que tiene Ser en el residuo 132.
- 35 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona IDH1, por ejemplo, un IDH1 que tiene una A o una T (o un nucleótido diferente de C) en la posición del nucleótido 394 o una A (o un nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395, por ejemplo, un alelo mutante que porta una mutación C394T o una mutación G395A acuerdo con la secuencia de IDH1 de la SEQ ID NO: 13 (véase también la figura 21A).
- 40 En una realización, el ARNbc direcciona un IDH1 que tiene un aminoácido diferente de C, por ejemplo, una T o una A, en la posición del nucleótido 394 y / o diferente de G, por ejemplo, una A, en 395 (por ejemplo, un mutante) y una IDH1 que tiene una C en la posición del nucleótido 394 o una G en la posición del nucleótido 395 (por ejemplo, de tipo silvestre), por ejemplo, mediante direccionamiento de una región del ARNm de IDH1 que es idéntica entre los transcritos de tipo silvestre y mutantes. En aún otra realización, el ARNbc direcciona un mutante particular o polimorfismo (tal como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), pero no un alelo de tipo silvestre. En este caso, el inhibidor con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, direcciona la región de la IDH1 que contiene la mutación.
- 45 En algunas realizaciones, el inhibidor con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc inhibe preferencial o específicamente al producto de una IDH1 mutante comparado con el producto de una IDH1 de tipo silvestre. Por ejemplo, en una realización, un ARNbc direcciona una región de un ARNm de IDH1 que porta la mutación (por ejemplo, una mutación C394A de C394T o una G395A de acuerdo con la SEQ ID NO: 5).
- 50 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que incluye una cadena sentido y una cadena antisentido que tiene una secuencia primaria presentada en las Tablas 7-14. En otra realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido que incluye todo o parte de una secuencia primaria antisentido presentada en las Tablas 7-14 o que direcciona la misma región o sustancialmente la misma región que aquel ARNbc de las Tablas 7-14.
- 55 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una enzima IDH2 que tiene Lys en el residuo 172. Otro ejemplo de mutaciones IDH2 incluye aquellas en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) y en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 60
- 65

- 5 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona un ARNm que codifica un alelo IDH2 descrito en la presente memoria, por ejemplo, un alelo IDH2 que tiene un aminoácido diferente de Arg en el residuo 172. Por ejemplo, el alelo puede tener Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier residuo descrito en Yan y colaboradores, en el residuo 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la figura 22). Otros ejemplos de mutaciones IDH2 incluyen aquellas en el residuo 140 (por ejemplo, R140Q, R140L, o R140W) y en el residuo 294 (por ejemplo, V294M).
- 10 En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el residuo 172.
- 15 En una realización, el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el residuo 172.
- 20 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona IDH2, por ejemplo, un IDH2 que tiene una G o una T (o un nucleótido diferente de A o C) en la posición del nucleótido 514 o una A o T o C (o un nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 515, por ejemplo, un alelo mutante que porta una mutación A514G o una mutación G515T o G515A acuerdo con la secuencia de IDH2 de la SEQ ID NO: 11 (Fig. 22A). En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona IDH2, por ejemplo, un IDH2 que tiene una C o una T (o un nucleótido diferente de G o A) en la posición del nucleótido 516 de acuerdo con la secuencia de IDH2 de la SEQ ID NO: 11.
- 25 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que direcciona IDH2, por ejemplo, un IDH2 que tiene una G en la posición del nucleótido 514 o una T en la posición del nucleótido 515 o una A en la posición 515, de acuerdo con la secuencia de IDH2 de la SEQ ID NO: 11.
- 30 En una realización, el ARNbc que direcciona IDH2 que tiene una base nitrogenada diferente de A, por ejemplo, una G o una T, en la posición del nucleótido 514, o diferente de G, por ejemplo, una A o C o T en posición 515 (por ejemplo, un mutante), o diferente de G, por ejemplo, C o T, y un IDH2 que tiene una A en la posición del nucleótido 514 o una G en la posición del nucleótido 515 o una G en la posición 516 (por ejemplo, de tipo silvestre), por ejemplo, por direccionamiento de una región del ARNm de IDH2 que es idéntico entre los transcritos mutantes y de tipo silvestre. En aún otra realización, el ARNbc direcciona un mutante en particular o polimorfismo (tal como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), pero no un alelo de tipo silvestre. En este caso, el inhibidor con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, direcciona la región del IDH2 que contiene la mutación.
- 35 En algunas realizaciones, el inhibidor con base en ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, preferencialmente o específicamente inhibe al producto de un IDH2 mutante comparado con el producto de un IDH2 de tipo silvestre. Por ejemplo, en una realización, un ARNbc direcciona una región de un ARNm de IDH2 que porta la mutación (por ejemplo, una mutación A514G o G515T o G515U de acuerdo con la SEQ ID NO: 11).
- 40 En una realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un ARNbc que incluye una cadena con sentido y una cadena antisentido que tiene una secuencia primaria presentada en las Tablas 15-23. En otra realización, el inhibidor con base en ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido que incluye todo o una parte de una secuencia primaria antisentido presentada en las Tablas 15 - 23 o que direcciona la misma región o sustancialmente la misma región que aquel ARNbc de las Tablas 15-23.
- 45 En una realización, se administra el inhibidor con base en ácido nucleico al cerebro, por ejemplo, directamente al cerebro, por ejemplo, mediante administración intratecal o intraventricular. El inhibidor con base en ácido nucleico también puede ser administrado desde un dispositivo implantable. En una realización, se administra el inhibidor con base en ácido nucleico mediante infusión usando, por ejemplo, un catéter, y, opcionalmente, una bomba.
- 50 Antisentido
- 55 Los inhibidores adecuados con base en ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos antisentido. Aunque no se está ligado por la teoría se cree que la inhibición antisentido se basa típicamente en la hibridación con base en enlaces de hidrógeno de cadenas o segmentos de oligonucleótidos de tal manera que al menos una cadena o segmento se escinde, degrada, o bien se vuelve inoperable.
- 60 Un agente antisentido puede enlazar ADN de IDH1 o IDH2. En ciertas realizaciones, inhibe la replicación y la transcripción. Aunque no se está ligado por la teoría, se cree que un agente antisentido puede actuar también para inhibir la translocación del ARN objetivo, por ejemplo, a un sitio de traducción de proteína, traducción de proteína del ARN, empalme del ARN para producir una o más especies de ARN, y la actividad catalítica o formación de complejos que involucra al ARN.
- 65 Los agentes antisentido pueden tener una modificación química descrita anteriormente como adecuada para ARNbc.
- Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, aproximadamente desde 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases (es decir, aproximadamente desde 8 hasta aproximadamente 80 nucleótidos), por ejemplo, aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 nucleobases, o aproximadamente desde 12 hasta aproximadamente

30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas), y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico objetivo y modulan su expresión. Los compuestos anti-sentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen objetivo. Un oligonucleótido no necesita ser 100% complementaria con su secuencia de ácido nucleico objetivo para poder ser hibridado específicamente. Un oligonucleótido puede ser hibridado específicamente cuando el enlace del oligonucleótido con el objetivo interfiere con la función normal de la molécula objetivo para provocar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar un enlazamiento no específico del oligonucleótido con las secuencias no objetivo bajo condiciones en las cuales se desea un enlazamiento específico, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos in vitro, bajo condiciones en las cuales se llevan a cabo los ensayos.

La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm (por ejemplo, un ARNm que codifica IDH1) puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Aunque no se está ligado por la teoría se cree que las funciones del ARNm a ser interferidas incluyen todas las funciones clave tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, traducción de la proteína a partir del ARN, empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y actividad catalítica que puede estar involucrada con el ARN. El enlazamiento de proteína(s) específica(s) con el ARN también puede ser interferido por hibridación con oligonucleótido antisentido con el ARN.

Los ejemplos de compuestos antisentido incluyen secuencias de ADN o ARN que hibridan específicamente con el ácido nucleico objetivo, por ejemplo, el ARNm que codifica IDH1. La región complementaria puede extenderse entre aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden incluir, por ejemplo, pirimidinas sustituidas en posición 5, tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina y pirimidinas C5 propinilo tales como C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen  $N^4$  - (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) alquilaminocitosinas y  $N^4,N^4$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) dialquilaminocitosinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 5-aza-deazapurinas sustituidas en posición 7 y 7-deazapurinas-sustituidas en posición 7 tale como, por ejemplo, 7-yodo-7-deazapurinas, 7-ciano-7-deazapurinas, 7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Los ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-yodo-7-deazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-deazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-deazapurinas y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Además,  $N^6$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) alquilaminopurinas y  $N^6,N^6$ -(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) dialquilaminopurinas, incluyendo  $N^6$ -metilaminoadenina y  $N^6,N^6$ -dimetilaminoadenina, también son nucleobases modificadas adecuadas. Del mismo modo, otras purinas sustituidas en posición 6 incluyendo, por ejemplo, 6-tioguanina pueden constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina y 2-fluoroguanina. Los derivados de cualquiera de las nucleobases anteriormente modificadas mencionadas son también apropiadas. Los sustituyentes de cualquiera de los compuestos precedentes pueden incluir alquilo de 1 a 30 átomos de carbono, alquenilo de 2 a 30 átomos de carbono, alquínilo de 2 a 30 átomos de carbono, arilo, aralquilo, heteroarilo, halógeno, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, y similares.

#### 40 MicroARN

En algunas realizaciones, el inhibidor con base en ácido nucleico adecuado para direccionamiento de IDH, por ejemplo, IDH1, es un microARN (miARN). Un miARN es un ARN monocatenario que regula la expresión de los ARNm objetivo, ya sea mediante escisión del ARNm, represión / imbibición de la traducción o el silenciamiento heterocromático. El miARN es de 18 a 25 nucleótidos, típicamente de 21 a 23 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el miARN incluye modificaciones químicas, tales como una o más modificaciones descritas en esta memoria.

En algunas realizaciones, un inhibidor con base en ácido nucleico de direccionamiento de IDH tiene complementariedad parcial (es decir, menos del 100% de complementariedad) con el ARNm de IDH objetivo, por ejemplo, IDH1. Por ejemplo, la complementariedad parcial puede incluir varias faltas de correspondencia o no apareamiento de bases de nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más faltas de correspondencia o no apareamiento de bases de nucleótidos, tales como protuberancias de nucleótidos), que pueden resultar en protuberancias, bucles o salientes que resultan entre la cadena antisentido o la región antisentido del inhibidor con base en ácido nucleico y la correspondiente molécula de ácido nucleico objetivo.

Los inhibidores con base en ácido nucleico descritos en esta memoria, por ejemplo, ácido nucleico antisentido descrito en esta memoria, pueden ser incorporados en una constructo génico para ser utilizado como parte de un protocolo de terapia génica para suministrar ácidos nucleicos que pueden ser usados para expresar y producir agentes dentro de las células. Los constructos de expresión de tales componentes se pueden administrar en cualquier portador biológicamente efectivo, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de suministrar efectivamente el gen componente a las células in vivo. Los enfoques incluyen inserción del gen al sujeto en vectores virales que incluyen retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adeno asociado, lentivirus, y virus 1 del herpes simple, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Células transfectadas directamente por vectores virales; el ADN de plásmido puede ser suministrado con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectina)

o conjugados de polilisina con formación de derivados (por ejemplo, anticuerpo conjugado), gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros receptores intracelulares, así como inyección directa del constructo génico o precipitación con  $\text{CaPO}_4$  lleva a cabo in vivo.

5 En una realización, la introducción in vivo de ácido nucleico en una célula incluye el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células objetivo pueden recibir el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficientemente en células que han captado el ácido nucleico del vector viral.

10 Los vectores retrovirales y vectores de virus adeno-asociados se pueden utilizar como un sistema de suministro de genes recombinantes para la transferencia de genes exógenos in vivo particularmente en humanos. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera estable en el ADN cromosómico del huésped. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células in vitro o in vivo con tales virus pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. y colaboradores. (eds.) Greene Publishing Associates (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales estándar de laboratorio. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los ejemplos de líneas de virus de envoltura adecuados para preparar tanto sistemas retrovirales ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Crip, Cre, 2 y Am. Los retrovirus han sido utilizados para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo células epiteliales, in vitro y / o in vivo (véase, por ejemplo, Eglitis y colaboradores, (1985) Science 230: 1395-1398; Danos y Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: desde 6460 hasta 6464; Wilson y colaboradores. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 3014-3018; Armentano y colaboradores, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: desde 6141-6145; Huber y colaboradores. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 8039-8043; Ferry y colaboradores, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 8377 - 8.381; Chowdhury y colaboradores, (1991) Science 254: 1802-1805; van Beusechem y colaboradores, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7640 - 7644; Kay y colaboradores, (1992) Human Gene Terapia 3: 641-647; Dai y colaboradores, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10892-10895; Hwu y colaboradores, (1993) J. Immunol. 150: 4104-4115; La patentes de los Estados Unidos Nos. 4.868.116 y 4.980.286; Publicaciones PCT. Nos. WO 89/07136, WO 89/02468, WO 89/05345, y WO 92/07573).

20 Otro sistema de suministro de genes virales utilizan vectores derivados de adenovirus. Véase, por ejemplo, Berkner y colaboradores, (1988) Biotechniques 6: 616; Rosenfeld y colaboradores, (1991) Science 252: 431-434; y Rosenfeld y colaboradores, (1992) Cell 68: 143-155. Los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7, etc.) son conocidos por los expertos en la técnica.

25 Incluso, otro sistema de vector viral útil para el suministro del gen al sujeto es el virus adeno-asociado (AAV). Véase, por ejemplo, Flotte y colaboradores, (1992) Am. J. Respir. Celda. Mol. Biol. 7: 349-356; Samulski y colaboradores, (1989) J. Virol. 63: 3822-3828; y McLaughlin y colaboradores, (1989) J. Virol. 62: 1963-1973.

#### 30 Composiciones farmacéuticas

35 Las composiciones delineadas en la presente memoria incluyen los compuestos delineados aquí, así como agentes terapéuticos adicionales si están presentes, en cantidades efectivas para lograr una modulación de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad, incluyendo aquellos descritos en la presente memoria.

40 El término "portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o adyuvante que puede ser administrado a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del compuesto.

45 Los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de suministro de fármacos auto-emulsionantes (SEDDS) tales como d- $\alpha$ -tocopherol polietilenglicol 1000 succinato, surfactantes usados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices similares poliméricas de suministro, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias reguladoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturado, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, hidrogeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias con base en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de lana. Ciclodextrinas tales como  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2 y 3-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados pueden ser también utilizados convenientemente para mejorar el suministro de compuestos de las fórmulas descrito en esta memoria.

Las composiciones farmacéuticas que contienen compuestos descritos en esta memoria pueden ser administradas directamente al sistema nervioso central, tal como en el líquido cefalorraquídeo o en el cerebro. El suministro puede ser, por ejemplo, en un bolo o mediante infusión continua con bomba. En ciertas realizaciones, el suministro es por suministro intratecal o por inyección intraventricular directamente en el cerebro. Se puede usar un catéter y, opcionalmente, una bomba para el suministro. Los inhibidores se pueden suministrar en y liberar desde un dispositivo implantable, por ejemplo, un dispositivo que está implantado junto con la remoción quirúrgica del tejido tumoral. Por ejemplo, para el suministro al cerebro, el suministro puede ser análogo a aquel con Gliadel, una oblea de biopolímero diseñada para suministrar carmustina directamente en la cavidad quirúrgica creada cuando se reseca un tumor cerebral. La oblea de Gliadel se disuelve lentamente y suministra carmustina.

Los compuestos terapéuticos divulgados en esta memoria, por ejemplo, inhibidores con base en ácido nucleico, por ejemplo, ARNci pueden ser administrados directamente al SNC, por ejemplo, el cerebro, por ejemplo, usando un sistema de bomba y / o un catéter. En una realización, se implanta la bomba bajo la piel. En una realización, se inserta un catéter unido a una bomba en el SNC, por ejemplo, en el cerebro o la columna vertebral. En una realización, la bomba (tal como la IsoMed Drug Pump de Medtronic) suministra en forma dosificada, por ejemplo, dosificación constante, de un inhibidor con base en ácido nucleico. En una realización, la bomba puede ser programada para administrar dosis variables o constantes en intervalos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, la bomba IsoMed Drug de Medtronic (o un dispositivo similar) puede ser utilizada para administrar un suministro constante del inhibidor, o la SynchroMedII Drug Pump (o un dispositivo similar) puede ser utilizada para administrar un régimen de dosis variable.

Los métodos y dispositivos descritos en las patentes los Estados Unidos Nos. 7.044.932, 6.620.151, 6.283.949, y 6.685.452 pueden ser utilizados en los métodos descritos en esta memoria.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención puede ser administradas por vía oral, parenteral, mediante inhalación, en forma tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado, preferiblemente para administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier portador, adyuvante o vehículo convencional, no tóxico farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el pH de la formulación se puede ajustar con ácidos, bases o reguladores farmacéuticamente aceptables para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de suministro. El término parenteral como se utiliza aquí incluye técnicas de infusión o inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, o intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión oleaginosa o acuosa estéril inyectable. Esta suspensión puede ser formulada de acuerdo con técnicas conocidas en el arte usando agentes de dispersión o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo amable incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente de alcohol de cadena larga o dispersante, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros surfactantes usados comúnmente, tales como Tweens o Spans y/u otros agentes emulsionantes similares o reforzadores de biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas o de otro tipo, farmacéuticamente aceptable, también se pueden utilizar para los propósitos de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas en forma oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que son comúnmente utilizados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, también se añaden típicamente. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran suspensiones y/o emulsiones acuosas en forma oral, el ingrediente activo puede ser suspendido o disuelto en una fase oleosa que se combina con agentes emulsionantes y / o de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos edulcorantes y / o agente saborizantes y / o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de esta invención es útil cuando el tratamiento deseado involucra áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica. Para aplicación tópica a la piel, la composición farmacéutica debe ser formulado con una pomada adecuada que contiene los componentes activos suspendidos o disueltos en un portador. Los portadores para administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquido, vaselina blanco, propilenglicol, compuesto de polioxipropileno polioxietileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, la composición farmacéutica puede ser formulada con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo con agentes emulsionantes adecuados. Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de esta invención también se pueden aplicar en forma tópica al tracto intestinal inferior mediante una formulación de supositorio rectal o en una formulación de enema adecuada. Los parches tópicamente transdérmicos son también incluidos en esta invención.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y / u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Cuando las composiciones de esta invención comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas descritas en esta memoria y uno o más agentes adicionales terapéuticos o profilácticos, tanto el compuesto como el agente adicional deben estar presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente 1 a 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente 5 a 95% de la dosis administrada normalmente en un régimen de monoterapia. Los agentes adicionales pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosis múltiples, a partir de los compuestos de esta invención. Alternativamente, esos agentes pueden ser parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos de esta invención en una composición única.

Los compuestos descritos en esta memoria pueden, por ejemplo, ser administrados por inyección, por vía intravenosa, intraarterial, por vía subdérmica, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea; o por vía oral, bucal, nasal, transmucosa, tópica, en una preparación oftálmica, o por inhalación, con una dosificación que varía de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 100 mg / kg de peso corporal, las dosificaciones alternativamente entre 1 mg y 1000 mg / dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requisitos del fármaco particular. Los métodos en la presente memoria contemplan la administración de una cantidad efectiva de compuesto o composición de compuestos para lograr el efecto deseado o indicado. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se administrarán desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Dicha administración se puede usar como una terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Una preparación típica contendrá desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 95% de compuesto activo (p/p). Alternativamente, tales preparaciones contienen desde aproximadamente 20% hasta aproximadamente el 80% de compuesto activo.

Pueden ser necesarias dosis menores o mayores que las mencionadas anteriormente. Los regímenes de dosificación y tratamiento específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, la condición o los síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, la condición o síntomas, y el juicio del médico tratante.

Tras la mejora de la condición de un paciente, una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención se puede administrar, si es necesario. Posteriormente, la dosis o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en donde se retiene el estado mejorado cuando los síntomas se han aliviado hasta el nivel deseado. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir un tratamiento intermitente a largo plazo en cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Kits

Un compuesto descrito en la presente memoria se puede proporcionar en un kit.

En una forma de realización el kit incluye (a) un compuesto descrito en la presente memoria, por ejemplo, una composición que incluye un compuesto descrito en la presente memoria (en donde, por ejemplo, el compuesto puede ser un inhibidor descrito en esta memoria), y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, de instrucción, de mercadeo u otro material que se refiere a los métodos descritos en la presente memoria y/o al uso de un compuesto descrito en la presente memoria para los métodos descritos aquí.

En una realización, el kit proporciona materiales para la evaluación de un sujeto. La evaluación puede ser, por

ejemplo, para: identificar un sujeto que tiene niveles no deseados, es decir, aumentados (por ejemplo, más altos que los presentes en células normales o de tipo silvestre) de cualquiera de 2HG, neoactividad de 2HG, o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad de 2HG (o el correspondiente ARN), o que tiene una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por la neoactividad de 2HG; diagnosticar, pronosticar, o estadificación de un sujeto, por ejemplo, con base en los niveles no deseados, es decir, aumentados de 2HG, neoactividad de 2HG, o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad de 2HG (o el correspondiente ARN), o que tiene una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por neoactividad de 2HG; seleccionar un tratamiento para, o la evaluación de la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, con base en el sujeto que tiene niveles no deseados, es decir, aumentados de 2HG, neoactividad de 2HG, o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad de 2HG (o el correspondiente ARN) o que tiene una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por neoactividad de 2HG. El kit puede incluir uno o más de reactivos útiles en la evaluación, por ejemplo, los reactivos mencionados en otra parte en esta memoria. Un reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo u otro reactivo de enlazamiento específico puede ser incluido. Los estándares o muestras de referencia, por ejemplo, un estándar positivo o negativo de control puede ser incluido. Por ejemplo, si la evaluación se basa en la presencia de 2HG el kit puede incluir un reactivo, por ejemplo, estándares positivos o negativos de control para un ensayo, por ejemplo, un ensayo por LC-MS.

Si la evaluación se basa en la presencia de neoactividad de 2HG, el kit puede incluir un reactivo, por ejemplo, uno o más de aquellos mencionados en otra parte en esta memoria, para probar la neoactividad de 2HG. Si la evaluación se basa en la secuenciación, el kit puede incluir cebadores u otros materiales útiles para secuenciar los ácidos nucleicos relevantes para identificación de un IDH, por ejemplo, un mutante neoactivo IDH1 o IDH2. Por ejemplo, el kit puede contener un reactivo que permite preguntar por la identidad, es decir, la secuenciación de, el residuo 132, 71, 100 o 109 de IDH1 para determinar si un mutante neoactivo está presente. El kit puede incluir ácidos nucleicos, por ejemplo, un oligómero, por ejemplo, cebadores, que permiten la secuenciación de los nucleótidos que codifican el residuo 70, 99, 100, 109, 130, 132, 133, 134, o 178, por **ejemplo 132**, 100 o 109 de IDH (por ejemplo, un IDH1). En una realización, el kit puede incluir ácidos nucleicos, por ejemplo, un oligómero, por ejemplo, cebadores, que permiten la secuenciación de nucleótidos que codifican los residuos 140, 172, o 294 de una IDH2. En una realización, el kit incluye un ácido nucleico cuya hibridación, o capacidad de ser amplificado, depende de la identidad del residuo 70, 99, 100, 109, 130, 132, 133, 134, o 178, por **ejemplo 132**, 100 o 109 de IDH (por ejemplo, un IDH1). En una realización, el kit puede incluir un ácido nucleico cuya hibridación, o capacidad de ser amplificado, depende de la identidad de residuo 140, 172, o 294 de una IDH2. En otras realizaciones, el kit incluye un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula de enlazamiento específico, que puede identificar la presencia de un mutante neoactivo, por ejemplo, una proteína codificada por un mutante neoactivo en 70, 99, 100, 109, 130, 132, 133, 134, o 178, por ejemplo, 132, 100 o 109 de IDH (por ejemplo, un IDH1) o 140, 172, o 294 de un IDH2. Como se describe más adelante, un kit también puede incluir reguladores, disolventes, e información relacionada con la evaluación.

En una realización, el material informativo puede incluir información acerca de la producción del compuesto, el peso molecular del compuesto, la concentración, la fecha de expiración, información del lote o sitio de producción, y así sucesivamente. En una realización, el material informativo se refiere a métodos para administrar el compuesto.

En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito en la presente memoria de una manera adecuada para llevar a cabo los métodos descritos aquí, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma de dosificación, o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descrito en la presente memoria). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito en la presente memoria a un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano que tiene o está en riesgo de padecer un trastorno descrito en la presente memoria.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y / o fotografía, por ejemplo, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, tales como Braille, material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustantiva sobre un compuesto descrito en esta memoria y / o su uso en los métodos aquí descritos. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además de un compuesto descrito en la presente memoria, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o regulador, un estabilizador, un conservante, un agente saborizante (por ejemplo, un antagonista del sabor amargo o un edulcorante), una fragancia u otro ingrediente cosmético, y / o un segundo agente para tratar una condición o trastorno descrito en la presente memoria. Alternativamente, los otros ingredientes se pueden incluir en el kit, pero en diferentes composiciones o administrar un compuesto descrito en la presente memoria. En tales realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito aquí y los otros ingredientes, o para usar un compuesto descrito en la presente memoria junto con los otros ingredientes.

Un compuesto descrito en la presente memoria se puede proporcionar en cualquier forma, por ejemplo, forma

líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que un compuesto descrito en la presente memoria sea sustancialmente puro y / o estéril. Cuando un compuesto descrito aquí se proporciona en una solución líquida, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, con una solución acuosa estéril siendo preferida. Cuando se proporciona un compuesto descrito en la presente memoria como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o regulador, puede opcionalmente ser proporcionado en el kit.

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene un compuesto descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados, divisiones o compartimentos para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o empaque plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un solo contenedor, no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que ha unido a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un empaque) de envases individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitaria (por ejemplo, una forma de dosificación descrita aquí) de un compuesto descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, empaques de aluminio, o empaques tipo blíster, conteniendo cada uno una dosis unitaria única de un compuesto descrito aquí. Los contenedores de los kits pueden ser hermético al aire, al agua (por ejemplo, impermeable a los cambios en la humedad o evaporación), y / o hermético a la luz.

El kit opcionalmente incluye, un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringuilla, inhalante, pipeta, fórceps, cuchara dosificadora, gotero (por ejemplo, gotero ocular), hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o hisopo de madera), o cualquiera de tales dispositivos de administración. En una realización, el dispositivo es un dispositivo de implante médico, por ejemplo, empacado para inserción quirúrgica.

#### Terapias de combinación

En algunas realizaciones, un compuesto o composición aquí descrita se administra junto con un tratamiento adicional para el cáncer. Los ejemplos para tratamientos del cáncer incluyen, por ejemplo: cirugía, quimioterapia, terapias dirigidas, tal como terapias de anticuerpos, la inmunoterapia y terapia hormonal. Ejemplos de cada uno de estos tratamientos se proporcionan a continuación.

#### Quimioterapia

En algunas realizaciones, un compuesto o composición aquí descrita es administrado con una quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento para el cáncer con fármacos que pueden destruir células cancerosas. "Quimioterapia" usualmente se refiere a los fármacos citotóxicos que tienen efectos en las células que se dividen rápidamente, en general, en contraste con la terapia dirigida. Los fármacos de quimioterapia interfieren con la división celular en varias formas posibles, por ejemplo, con la duplicación del ADN o la separación de los cromosomas recientemente formados. La mayoría de las formas de quimioterapia se dirigen a células de rápida división y no son específicos para las células cancerosas, aunque algún grado de especificidad puede provenir de la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar el ADN dañado, mientras que las células normales generalmente puede hacerlo.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia del cáncer incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, ácido fólico, derivados de purina, y pirimidina) y agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, platino, alquil sulfonatos, hidrazinas, triazenos, aziridinas, veneno del huso, agentes citotóxicos, inhibidores de topoisomerasa y otros). Los ejemplos de agentes incluyen aclarrubicina, actinomicina, Alitretinona, Altretamina, aminopterina, ácido aminolevulínico, amrubicina, Amsacrina, anagrelida, trióxido de arsénico, asparaginasa, atrasentan, Belotecan, Carboquona, Carmofur, carmustina, celecoxib, clorambucil, Clormetina, camptotecina, capecitabina, carboplatino, Carboquona, Carmofur, carmustina, celecoxib, clorambucil, Clormetina, cisplatino, cladribina, clofarabina, Crisantaspase, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, demecolcina, docetaxel, doxorubicina, Efaproxiral, elesclomol, elsamitrucina, enocitabina, epirubicina, estramustina, etoglúcido, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (5-FU), fotemustina, gemcitabina, implantes de Gliadel, hidroxycarbamida, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecano, irofulven, ixabepilona, larotaxel, leucovorina, doxorubicina liposomal, daunorrubicina liposomal, Ionidamina, lomustina, lucantona, Manosulfano, Masoprocol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metil aminolevulinato, mitobronitol, mitoguazona, mitotano, mitomicina, mitoxantrona, nedaplatino, nimustina, oblimersen, omacetaxina, Ortataxel, oxaliplatino, paclitaxel, pegaspargasa, pemetrexed, pentostatina, pirarubicina, pixantrona, plicamicina, porfímero de sodio, prednimustina, procarbazona, raltitrexed, ranimustina, Rubitecano, sapacitabina, semustina, ceradenovec sitimageno, estrataplata, estreptozocina, Talaporfin, tegafur-uracilo, temoporfin, temozolomida, tenipósido, Tsetaxel, Testolactona, Tetranitrato, tiotepa, Tiazofurina, Tioguanina, tipifarnib, topotecan, trabectedina, triaziquona, trietilenmelamina, Triplatino, tretinoína, treosulfano, trofosfamida, Uramustina, valrubicina, verteporfin, vinblastina, vincristina, vindesina, vinflunina, vinorelbina, vorinostat, zorubicina, y otros agentes citostáticos o citotóxicos descritos en esta memoria.

Debido a que algunos fármacos trabajan mejor juntos que por separado, se proporcionan a menudo dos o más fármacos al mismo tiempo. A menudo, se usan dos o más agentes quimioterapéuticos de quimioterapia como quimioterapia de combinación. En algunas realizaciones, los agentes de quimioterapia (incluyendo la quimioterapia de combinación) se pueden utilizar en combinación con un compuesto descrito aquí, por ejemplo, fenformina.

5

Terapia dirigida

En algunas realizaciones, un compuesto o composición descrito en la presente memoria se administra con una terapia dirigida. La terapia dirigida constituye el uso de agentes específicos para las proteínas desreguladas de células cancerosas. Los fármacos de terapia dirigida de molécula pequeña son generalmente inhibidores de dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas, o bien críticas dentro de la célula cancerosa. Los ejemplos destacados son los inhibidores de tirosina quinasa tales como axitinib, bosutinib, cediranib, desatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, Semaxanib, sorafenib, sunitinib, y vandetanib, y también inhibidores de la quinasa que dependen de ciclina tales como Alvocidib y Seliciclib. La terapia de anticuerpo monoclonal es otra estrategia en la cual el agente terapéutico es un anticuerpo que se enlaza específicamente a una proteína en la superficie de las células cancerosas. Los ejemplos incluyen el anticuerpo anti-HER2/neu trastuzumab (HERCEPTIN®) típicamente utilizado en cáncer de mama, y el anticuerpo anti-CD20 rituximab y tositumomab típicamente usado en una variedad de neoplasias de células B. Otros ejemplos de anticuerpos incluyen Cetuximab, Panitumumab, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, edrecolomab, y gemtuzumab. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen Aflibercept y Denileukin diftotox. En algunas realizaciones, la terapia dirigida se puede utilizar en combinación con un compuesto descrito en la presente memoria, por ejemplo, una biguanida tal como metformina o fenformina, preferiblemente fenformina.

10

15

20

25

La terapia dirigida también puede implicar péptidos pequeños como "dispositivos homing" que pueden enlazarse a los receptores de la superficie de la célula o afectar la matriz extracelular que rodean el tumor. Los radionúclidos que se unen a estos péptidos (por ejemplo, RGD) eventualmente matan a la célula cancerosa si el nucleido se descompone en la vecindad de la célula. Un ejemplo de dicha terapia incluye Bexxar®.

30

Inmunoterapia

En algunas realizaciones, un compuesto o composición descrito en la presente memoria se administra con una inmunoterapia. La inmunoterapia para el cáncer se refiere a un conjunto diverso de estrategias terapéuticas diseñadas para inducir al sistema inmunológico del paciente a combatir el tumor. Los métodos modernos para generar una respuesta inmune contra los tumores incluyen inmunoterapia con BCG intravesicular para cáncer de vejiga superficial, y el uso de interferones y otras citoquinas para inducir una respuesta inmune en pacientes con carcinoma y melanoma de células renales.

35

40

El trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas puede ser considerado una forma de inmunoterapia, ya que las células inmunes del donante a menudo atacarán al tumor en un efecto de tumor versus injerto. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia se pueden utilizar en combinación con un compuesto o composición descrito en la presente memoria.

Terapia hormonal

En algunas realizaciones, un compuesto o composición descrito en la presente memoria se administra con una terapia hormonal. El crecimiento de algunos tipos de cáncer puede ser inhibido por el suministro o el bloqueo de ciertas hormonas. Los ejemplos comunes de tumores sensibles a las hormonas incluyen ciertos tipos de cánceres de mama y de próstata. La remoción o bloqueo de estrógeno o testosterona es a menudo un tratamiento adicional importante. En ciertos cánceres, la administración de agonistas de hormona, tales como progestágenos puede ser terapéuticamente beneficiosa. En algunas realizaciones, los agentes de terapia hormonal se pueden utilizar en combinación con un compuesto o composición descrita en la presente memoria.

50

55

En algunas realizaciones, un compuesto o composición descrito aquí se administra con un tratamiento adicional contra el cáncer (por ejemplo, la remoción quirúrgica), en el tratamiento del cáncer en el sistema nervioso, por ejemplo, cáncer en el sistema nervioso central, por ejemplo, tumor cerebral, por ejemplo, glioma, por ejemplo, el glioblastoma multiforme (GBM).

60

Varios estudios han sugerido que más del 25% de los pacientes con glioblastoma obtienen un beneficio de supervivencia significativo de la quimioterapia adyuvante. Los meta-análisis han sugerido que la quimioterapia adyuvante que resulta en un aumento del 6-10% en la tasa de supervivencia a 1 año.

65

La temozolomida es un agente alquilante realmente activo que se utiliza para personas recientemente diagnosticadas con glioblastoma multiforme. Fue aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en marzo de 2005. Los estudios han demostrado que el fármaco fue bien tolerado y proporcionó un beneficio de supervivencia. La temozolomida adyuvante y concomitante con radiación fue asociada con mejoras significativas en la mediana de la supervivencia promedio libre de avance sobre la radiación sola (6,9

versus 5 meses), la supervivencia total (14,6 vs 12,1 meses), y la probabilidad de estar vivo en 2 años (26% vs 10%).

5 Nitrosoureas: se aprobaron obleas de polímero con BCNU (carmustina) (Gliadel) por la FDA en 2002. Aunque las obleas de Gliadel son utilizadas por algunos para el tratamiento inicial, han mostrado sólo un modesto incremento en la supervivencia media sobre el placebo (13,8 vs. 11,6 meses) en el más largo de los ensayos en fase III, y están asociados con mayores tasas de pérdidas de líquido cefalorraquídeo y mayor presión intracraneal secundaria al edema y efecto de masa.

10 MGMT es una enzima de reparación del ADN que contribuye a la resistencia a la temozolomida. La metilación del promotor de MGMT, que se encuentra en aproximadamente el 45% de glioblastomas multiformes, resulta en un silenciamiento epigenético del gen, disminuyendo la capacidad de la célula tumoral para reparar el ADN y el aumento de la susceptibilidad a la temozolomida.

15 Cuando los pacientes con y sin metilación del promotor de MGMT fueron tratados con temozolomida, los grupos tuvieron una mediana de supervivencia de 21,7 y 12,7 meses, y tasas de supervivencia a 2 años de 46% versus 13,8%, respectivamente.

20 Aunque actualmente la temozolomida es un agente de primera línea en el tratamiento del glioblastoma multiforme, el estatus de metilación desfavorable de MGMT podría ayudar a seleccionar a los pacientes adecuados para futuras investigaciones terapéuticas.

25 O6-bencilguanina y otros inhibidores de MGMT, así como el silenciamiento mediado por ARN de interferencia mediadas de MGMT ofrecen vías prometedoras para aumentar la efectividad de la temozolomida y otros antineoplásicos alquilantes, y tales agentes están bajo estudio activo.

30 Carmustina (BCNU) y cis-platino (cisplatino) han sido los agentes quimioterapéuticos primarios utilizados contra los gliomas malignos. Todos los agentes en uso tienen no más de una tasa de respuesta de 30 - 40%, y a mayoría caen en el rango de 10-20%.

35 Los datos de la Universidad de California en San Francisco indican que, para el tratamiento de glioblastomas, cirugía seguida de terapia de radiación conduce a tasa de supervivencia de 1, 3, y 5 año de 44%, 6% y 0%, respectivamente. En comparación, la cirugía seguida de radiación y quimioterapia usando los regímenes basados en la nitrosourea dieron lugar a tasas de supervivencia de 1, 3, y 5 años del 46%, 18% y 18%, respectivamente.

40 Un obstáculo importante para el uso de agentes quimioterapéuticos para los tumores cerebrales es el hecho de que la barrera hematoencefálica (BBB) excluye efectivamente muchos agentes del SNC. Por esta razón, se están desarrollando nuevos métodos de administración de fármacos intracraneal para suministrar mayores concentraciones de agentes quimioterapéuticos a las células tumorales, evitando los efectos sistémicos adversos de estos medicamentos.

45 La infusión accionada por presión de agentes quimioterapéuticos a través de un catéter intracraneal, también conocida como administración potenciada por convección (CED), tiene la ventaja de la administración de fármacos a lo largo de un gradiente de presión en lugar de una difusión simple. CED ha mostrado resultados prometedores en modelos animales con agentes que incluyen BCNU y topotecan.

Los intentos iniciales investigaron la administración de agentes quimioterapéuticos a través de una ruta intraarterial en lugar de por vía intravenosa. Desafortunadamente, no se observó ninguna ventaja en la supervivencia.

50 La quimioterapia para el glioblastoma multiforme recurrente proporciona un beneficio modesto, si a caso, y se utilizan varias clases de agentes. Obleas de carmustina aumentaron la supervivencia de 6 meses de 36% a 56% sobre el placebo en un estudio aleatorizado de 222 pacientes, aunque no hubo una asociación significativa entre el grupo de tratamiento y las infecciones intracraneales graves.

55 La genotipificación de tumores cerebrales puede tener aplicaciones en pacientes estratificados para ensayos clínicos de diversas terapias novedosas.

60 El agente antiangiogénico bevacizumab, cuando se utiliza con irinotecano mejoro la supervivencia de 6 meses en pacientes con glioma recurrente a un 46% en comparación con el 21% en los pacientes tratados con temozolomida. Esta combinación de bevacizumab e irinotecano para glioblastoma multiforme recurrente se ha demostrado mejorar la supervivencia sobre el bevacizumab solo. Los agentes anti-angiogénicos también disminuyen el edema peritumoral, reduciendo potencialmente la dosis necesaria de corticosteroides.

65 Algunos glioblastomas responden al gefitinib o erlotinib (inhibidores de tirosina quinasa). La presencia simultánea en células de glioblastoma de EGFR mutante (EGFRviii) y PTEN fue asociada con sensibilidad a los inhibidores de tirosina quinasa, mientras que un aumento de P-Akt predice un efecto disminuido. Otros objetivos incluyen PDGFR,

VEGFR, mTOR, farnesiltransferasa, y PI3K.

Otras modalidades de terapia posibles incluyen imatinib, terapia génica, péptidos y las vacunas de células dendríticas, clorotoxinas sintéticas, y fármacos ,arcados en forma radioactiva y anticuerpos.

5

Selección/control de paseos

10

Se describen aquí métodos de tratamiento de un trastorno relacionado con proliferación celular, por ejemplo, cáncer, en un sujeto y métodos de identificación de un sujeto para un tratamiento descrito en la presente memoria. También se describen aquí métodos de predicción de un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, un cáncer asociado con una mutación en una enzima IDH (por ejemplo, IDH1 y/o IDH2)). El cáncer se caracteriza generalmente por la presencia de una neoactividad, tal como una ganancia de función en una o más enzimas mutantes IDH (por ejemplo, IDH1 o IDH2). El sujeto se puede seleccionar con base en el sujeto que tiene un gen mutante que tiene una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en esta memoria. Tal como se usa en esta memoria, "seleccionar" significa la selección en todo o en parte en dicha base.

15

20

En algunas formas de realización, un sujeto se selecciona para el tratamiento con un compuesto descrito en esta memoria basado en una determinación de que el sujeto tiene una enzima IDH mutante descrita en esta memoria. En algunas formas de realización, la enzima mutante tiene una neoactividad y el paciente se selecciona sobre esa base. La neoactividad de la enzima se puede identificar, por ejemplo, mediante la evaluación del sujeto o la muestra (por ejemplo, tejido o fluido corporal) de los mismos, para la presencia o cantidad de un sustrato, cofactor y / o producto de la enzima. La presencia y/o cantidad de sustrato, cofactor y/o el producto pueden corresponder a la actividad de tipo silvestre/no mutante o pueden corresponder a la neoactividad de la enzima. El ejemplo de fluido corporal que puede ser utilizado para identificar (por ejemplo, evaluar) la neoactividad de la enzima incluyen líquido amniótico que rodea un feto, humor acuoso, sangre (por ejemplo, plasma sanguíneo), suero, líquido cefalorraquídeo, cerumen, quimo, líquido de Cowper, eyaculado femenino, líquido intersticial, linfa, leche materna, moco (por ejemplo, flujo nasal o flema), líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, lágrimas, orina, secreciones vaginales, o vómito.

25

30

En algunas formas de realización, un sujeto puede ser evaluado por la neoactividad de una enzima utilizando resonancia magnética. Por ejemplo, cuando la enzima mutante es IDH1 y la neoactividad es la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxioglutarato, el sujeto puede ser evaluado por la presencia de y/o una cantidad elevada de 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato on relación a la cantidad de 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato presente en un sujeto que no tiene una mutación en IDH1 que tiene la neoactividad anterior. En algunas realizaciones, la neoactividad de IDH1 puede ser determinada por la presencia o cantidad elevada de un pico correspondiente a 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato como se determina por resonancia magnética. Por ejemplo, un sujeto se puede evaluar por la presencia y/o la fuerza de una señal en aproximadamente 2,5 ppm para determinar la presencia y/o cantidad de 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato en el sujeto. Esto puede correlacionarse con y/o predecir una neoactividad descrita en esta memoria para la enzima IDH mutante. Del mismo modo, la presencia, la fuerza y/o ausencia de una señal de aproximadamente 2,5 ppm podría ser predictiva de una respuesta al tratamiento y se utiliza de este modo como un biomarcador no invasivo para la respuesta clínica.

35

40

45

Neoactividad de una enzima mutante IDH también puede ser evaluada utilizando otras técnicas conocidas para un experto en la técnica. Por ejemplo, la presencia o cantidad de un sustrato, cofactor y / o producto de reacción etiquetado se puede medir como un sustrato, cofactor y / o producto de reacción marcado con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$ . La neoactividad se puede evaluar mediante la evaluación de la reacción directa de la enzima no mutante / de tipo silvestre enzima (tal como la descarboxilación oxidativa del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato en una enzima IDH1 mutante) y / o la reacción correspondiente a la neoactividad (por ejemplo la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxioglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxioglutarato en una enzima IDH mutante (por ejemplo, una enzima IDH1 o una enzima IDH2).

50

Trastornos

55

Los métodos relacionados con el IDH descritos en esta memoria, por ejemplo, los métodos de evaluación o tratamiento de sujetos, están dirigidos a sujetos que tienen un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por un mutante IDH, por ejemplo, un mutante IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Ejemplos de algunos de los trastornos más abajo han mostrado que se caracterizan por una mutación IDH1 o IDH2. Otros se pueden analizar, por ejemplo, mediante secuenciación de muestras de células para determinar la presencia de una mutación somática en el aminoácido 132 de IDH1 o en el aminoácido 172 de IDH2 u otra mutación descrita en esta memoria. Sin estar ligado por la teoría se espera que una parte de los tumores de un tipo dado de cáncer tendrá un mutante de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad de 2HG.

60

65

Los métodos descritos son útiles en la evaluación o el tratamiento de trastornos proliferativos, por ejemplo, evaluación o tratamiento de tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y la metástasis de los mismos en donde el tumor sólido, tumor de tejido blando o metástasis de los mismos es un cáncer descrito en esta memoria. Los

ejemplos de tumores sólidos incluyen tumores malignos (por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas) de los diversos sistemas de órganos, tales como los de cerebro, pulmón, mama, linfoides, tractos gastrointestinales (por ejemplo, colon), y genitourinario (por ejemplo, renal, urotelial, o tumores testiculares), faringe, próstata y ovario. Los ejemplos de adenocarcinomas incluyen cánceres colorrectales, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, y cáncer del intestino delgado. Los métodos descritos también son útiles en la evaluación o el tratamiento de cánceres no sólidos.

Los métodos aquí descritos se pueden utilizar con cualquier tipo de cáncer, por ejemplo los descritos en la presente memoria, incluyendo glioma, AML, ALL (por ejemplo, B-ALL o T-ALL), cáncer de próstata, o mielodisplasia o el síndrome mielodisplásico, cáncer de tiroides, tal como cáncer de tiroides folicular, fibrosarcoma, paraganglioma, melanoma, neoplasias mieloproliferativas tales como CML, o cáncer colorrectal. Las metástasis de los cánceres antes mencionados también pueden tratarse o prevenirse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

Los métodos aquí descritos son útiles en el tratamiento del cáncer en el sistema nervioso, por ejemplo, tumor cerebral, por ejemplo, glioma, por ejemplo, glioblastoma multiforme (GBM), por ejemplo, mediante la inhibición de una neoactividad de una enzima mutante, por ejemplo, una enzima en una ruta metabólica, por ejemplo, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, glicólisis, glutaminólisis, derivación del fosfato de pentosas, la ruta de biosíntesis de nucleótidos, o la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, por ejemplo, IDH1 o IDH2.

Gliomas, un tipo de tumores cerebrales, puede ser clasificada como de grado I hasta grado IV sobre la base de criterios histopatológicos y clínicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los gliomas grado I de la OMS a menudo se consideran benignos. Los gliomas de grado II o III de la OMS son invasivos, avanzan hasta lesiones de grado mayor. Los tumores grado IV de la OMS (glioblastomas) son la forma más invasiva. Los ejemplos de tumores cerebrales incluyen, por ejemplo, tumor astrocítico (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimales, astrocitoma difuso, xantastrocitoma pleomórfico, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, glioblastoma de células gigantes, glioblastoma, glioblastoma secundario, glioblastoma adulto primario, y glioblastoma pediátrico primario); tumor oligodendroglial (por ejemplo, los oligodendroglioma, y oligodendroglioma anaplásico); tumor oligoastrocítico (por ejemplo, Oligoastrocitoma, y Oligoastrocitoma anaplásico); ependimoma (por ejemplo, ependimoma mixopapilar, y ependimoma anaplásico); meduloblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo, schwannoma, meningioma, meningioma meatípico, meningioma anaplásico; y adenoma hipofisario. Los ejemplos de cánceres se describen en el Acta Neuropathol (2008) 116: 597-602 y N Engl J Med. 2009, 19 de febrero; 360 (8): 765-73.

En ciertas realizaciones el trastorno es glioblastoma

En una realización, el trastorno es cáncer de próstata, por ejemplo, etapa T1 (por ejemplo, T1a, T1b y T1c), T2 (por ejemplo, T2a, T2b y T2c), T3 (por ejemplo, T3a y T3b) y T4, en el sistema de estadificación TNM. En ciertas realizaciones, el cáncer de próstata es de grado G1, G2, G3 o G4 (donde un número más alto indica una mayor diferencia a partir de tejido normal). Tipos de cáncer de próstata incluyen, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de células pequeñas, carcinoma escamoso, sarcomas, y carcinoma de células de transición.

En una realización, el trastorno es un fibrosarcoma o paraganglioma. En una realización, el trastorno es cáncer de tiroides. En una realización, el trastorno es cáncer de colon. En una realización, el trastorno es melanoma. En un ejemplo, el trastorno es el mieloma. En una realización, el trastorno es neoplasias mieloproliferativas (MPN), tales como CML.

Los métodos y composiciones de la invención se pueden combinar con el tratamiento conocido en la técnica. El tratamiento conocido en la técnica para el cáncer de próstata puede incluir, por ejemplo, la vigilancia activa, la cirugía (por ejemplo, la prostatectomía radical, la resección transuretral de la próstata, la orquiectomía, y criocirugía), terapia de radiación incluyendo braquiterapia (braquiterapia de próstata) y la radioterapia de haz externo, ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal (por ejemplo, antiandrógenos (por ejemplo, flutamida, bicalutamida, nilutamida y acetato de ciproterona, ketoconazol, amino glutetimida), antagonistas de la GnRH (por ejemplo, abarelix)), o una combinación de los mismos.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1:** expresión y purificación de mutagénesis de clonación de IDH1

1. La IDH1 de tipo silvestre fue clonada en pET41a, creando una etiqueta His8 en el terminal C.

La región de codificación del gen IDH1 (ADNc) fue adquirida a través de Invitrogen en el vector pENTR221 (www.invitrogen.com, Cat # B-068487\_Ultimate\_ORF). Los oligonucleótidos fueron diseñados para PCR fuera de la región de codificación de IDH1 con NdeI en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3'. (IDH1-f: TAATCATATGTCCAAAAAATCAGT (SEQ ID NO: 1), IDH1-r: TAATCTCGAGTGAAAGTTTGGCCTGAGCTAGTT (SEQ ID NO: 2)). El producto de la PCR se clona en el vector pET41a escindido con NdeI / XhoI. La escisión con

Ndel / XhoI del vector pET41a libera la porción GST del plásmido, y crea una etiqueta His8 en el terminal C (SEQ ID NO: 3) sin la fusión GST en el terminal N. El codón de detención original de IDH1 se cambia a serina, de modo que la secuencia de unión en la proteína IDH1 final es: Ser-Leu-Glu- His-His-His-His-His-His-His-detención (SEQ ID NO: 4).

5 La estrategia de etiqueta His en el terminal C en vez de la estrategia de la etiqueta His en el terminal N fue escogida, porque la etiqueta en el terminal C no impacta negativamente el plegado o la actividad de proteínas IDH1. Véase, por ejemplo, Xu X y colaboradores, J Biol Chem. 2004 Ago 6; 279 (32): 33946-57.

10 La secuencia para el plásmido pET41a-IDH1 se confirma por la secuenciación de ADN. La figura 1 muestra la verificación de la secuencia detallada de pET41a-IDH1 y la alineación contra CDS IDH1 aquí publicadas.

2. Mutagénesis dirigida al sitio de IDH1 para crear los mutantes IDHr132s y IDHr132h.

15 La mutagénesis dirigida al sitio fue realizada para convertir R132 en S o H, la secuenciación de ADN confirmó que G395 está mutada en A (creando la mutación Arg → His en la proteína IDH1), y C394 se mutado en A (creando Arg → Ser en la proteína IDH1). El método detallado para la mutagénesis dirigida al sitio se describe en el manual del usuario para el kit QuikChange® Multisite-Directed Mutagenesis (Stratagene, cat # 200531). La figura 2 muestra la verificación de la secuencia de ADN de tales mutaciones. Los nucleótidos resaltados fueron exitosamente cambiados en la mutagénesis: La mutación G395 → A permite el aminoácido Arg132 → His; la mutación C394 → A permite el ácido amino Arg132 → Ser.

3. Expresión y purificación de la proteína IDH1.

25 Las proteínas IDH de tipo silvestre, IDHR132S, y IDHR132H fueron expresadas en la cepa Rosetta de E. coli y purificadas de acuerdo con el procedimiento detallado a continuación. Las proteínas IDH1 activas están en forma de dímero, y la fracción / pico de la columna SEC que corresponden a la forma dimérica fueron recolectadas para el análisis de enzimología y la comparación cruzada de las actividades catalíticas de estas proteínas.

30 A. Cultivo de células:

Las células se cultivaron en LB (20 µg / ml de kanamicina) a 37°C con agitación hasta que la DO600 alcanza 0,6. La temperatura se cambió a 18°C y la proteína se indujo mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Las células se recolectaron 12-16 horas después de la inducción IPTG.

35 B. Sistema de regulación:

Regulador de lisis: Tris 20 mM, pH 7,4, 0,1% de Triton X-100, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol.

40 Regulador A de la Columna de Ni: Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol.

Regulador B de la Columna de Ni: Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, imidazol 500 mM, 10% de glicerol

45 Regulador C de filtración en gel: NaCl 200 mM, Tris 50 mM 7.5, β-mercaptoetanol 5 mM, MGSO<sub>4</sub> 2 mM, 10% de glicerol.

50 C. procedimiento de purificación de la proteína

1. El precipitado celular se resuspendió en el regulador de lisis (1 g de células / 5-10 ml de regulador).

2. Se rompieron las células pasándolas a través de un microfluidizador con a una presión de 15.000 psi 3 veces.

55 3. Se recolectó la proteína soluble del sobrenadante después de centrifugación a 20.000 g (Beckman Avanti J-26XP) durante 30 min a 4°C.

60 4. Se equilibraron 5-10 ml de la columna de Ni mediante el regulador A hasta que el valor A280 alcanzó la línea base. Se cargó el sobrenadante en una columna de 5 ml de Ni-Sefarosa (2 ml/min). Se lavó la columna ediante 10 a 20 CV de regulador de lavado (90% de regulador A + 10% de regulador B) hasta que A280 alcanzó la línea base (2 ml/min).

65 5. Se diluyó la proteína mediante gradiente lineal de 10-100% de regulador B (20 CV), con una velocidad de flujo de 2 ml/min y se recolectaron las fracciones de la muestra como 2 ml/tubo.

6. Se analizaron las muestras sobre gel SDS-PAGE.

7. Se recolectaron las muestras y se dializaron contra regulador de filtración en gel 200x 2 veces (1 hora y > 4 horas).

5 8. Se concentraron las muestras hasta 10 ml.

9. Se equilibraron 200 ml de la columna de filtración en gel S-200 mediante el regulador C hasta que el valor A280 alcanzó la línea base. Se cargaron las muestras en una columna de filtración en gel (0,5 ml / min).

10 10. Se lavó la columna mediante 10 CV del regulador C, se recolectaron las fracciones como 2-4 ml/tubo.

11. Se analizaron las muestras en un gel SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína.

D. Resultados de la purificación de la proteína

15 Los resultados de la purificación de IDH1 de tipo silvestre se muestran en las Figs. 3, 4, 5A y 5B.

Los resultados para la purificación de IDH1R132S mutante se muestran en las Figs. 6, 7, 8A y 8B.

20 Los resultados para la purificación de IDH1R132H de tipo silvestre se muestran en las Figs. 9, 10, HA y 11B.

**Ejemplo 2** Análisis enzimológico de IDH1 de tipo silvestre y mutantes.

25 1. Análisis de IDH1 de tipo silvestre y de los mutantes R132H y R132S en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG).

A. Métodos

30 Para determinar la eficiencia catalítica de las enzimas en la descarboxilación oxidativa de isocitrato en la dirección de alfa-cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), se llevaron a cabo las reacciones para determinar  $V_{max}$  y  $K_m$  para el isocitrato. En estas reacciones, se varió el sustrato mientras que se mantuvo constante el cofactor en 500  $\mu$ M. Todas las reacciones se realizaron en NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, y BSA al 0.03% (p / v). El progreso de la reacción fue seguido por espectroscopía a 340 nm controlando el cambio en el estado de oxidación del cofactor. Se añadió suficiente enzima para producir un cambio lineal de la absorbancia durante 10 minutos.

35 B. ICDH1 R132H y ICDH1 R132S se desmejoran por la conversión de isocitrato en  $\alpha$ -KG.

40 Las gráficas de Michaelis-Menten para la relación de la concentración de isocitrato con la velocidad de reacción se presentan en las Figs. 12A-12C. Los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla 1. Todos los datos se ajustan a la ecuación de Hill mediante análisis de regresión por mínimos cuadrados.

Tabla 1

Enzima	$V_{max}$ ( $\mu$ mol/min/mg)	$K_m$ ( $\mu$ M)	Constante de Hill	$V_{max}/K_m$	Eficiencia catalítica reactiva
TS	30,5	56,8	1,8	0,537	100%
R132H	0,605	171,7	0,6	0,0035	0,35%
R132S	95	>1e6	0,479	<9,5e7	<0,001%

45 Ambas enzimas mutantes muestran un coeficiente de Hill reducido y un aumento en  $K_m$  para el isocitrato, lo que sugiere una pérdida de cooperatividad en el enlazamiento del sustrato y / o una afinidad reducida por el sustrato. La enzima R132H también muestra una  $V_{max}$  reducida, lo que sugiere una menor  $k_{cat}$ . R132S muestra un aumento en  $V_{max}$ , lo que sugiere un aumento en  $k_{cat}$ , aunque esto se produce a expensas de un incremento en 20.000 veces en  $K_m$  de modo que el efecto total sobre la eficiencia catalítica es una gran disminución en comparación con la enzima de tipo silvestre. La eficiencia catalítica relativa, descrita como  $V_{max} / K_m$ , es dramáticamente menor para los mutantes en comparación con el de tipo silvestre. El efecto in vivo de estas mutaciones sería disminuir la conversión de flujo de isocitrato en  $\alpha$ -KG.

50 C. Los mutantes ICDH1 R132H y R132S muestran una inhibición reducida del producto en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG).

55 Un mecanismo regulador conocido para el control de las enzimas metabólicas es la inhibición de la retroalimentación, en donde el producto de la reacción actúa como un regulador negativo para la enzima de generación. Para examinar si los mutantes R132S o R132H mantienen este mecanismo regulador, se determinó  $K_i$  para  $\alpha$ -KG en la descarboxilación oxidativa de isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato. Los datos se presentan en las Figs. 13A-13C y se resumen en la Tabla 2. En todos los casos,  $\alpha$ -KG actúa como un inhibidor competitivo del sustrato

60

isocitrato. Sin embargo, R132H y R132S muestran un aumento de 20 veces y 13 veces en la sensibilidad a la inhibición de retroalimentación en comparación con la enzima de tipo silvestre.

5

Tabla 2

Enzima	Ki (μM)
TS	612,2
R132H	28,6
R132S	45,3

D. El efecto de MnCl<sub>2</sub> en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α-cetoglutarat (α-KG).

10 MnCl<sub>2</sub> puede ser sustituido con MgCl<sub>2</sub> para examinar si existe cualquier diferencia en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α-cetoglutarato (α-KG).

E. El efecto de las mutaciones de R132 en el efecto inhibitor de oxalomalato sobre IDH1

15 El propósito de este ejemplo es examinar la susceptibilidad de IDH1R132S y IDH1R132H en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α-cetoglutarato (α-KG) con el conocido oxalomalato inhibitor de IDH1. Se realizaron experimentos para examinar si las mutaciones de R132 evitan la inhibición por el oxalomalato.

20 Concentraciones finales: Tris 7,5 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, glicerol al 10%, BSA al 0,03%, NADP 0,5 mM, IDH1 de tipo silvestre 1,5 μg/ml, IDH1R132S 30 μg/ml, IDH1R132H 60 μg/ml, DL-isocitrato (5-650 μM). Los resultados se resumen en la figura 17 y en la Tabla 3. La mutación R132S muestra aproximadamente un aumento de dos veces en la susceptibilidad a la inhibición por el oxalomalato, mientras que la mutación R132H esencialmente no se ve afectada. En todos los tres casos, se observó el mismo modo completamente competitivo de inhibición con respecto al isocitrato.

25

Tabla 3

Enzima	Oxalomalato Ki (μM)
TS	955,4
R132S	510
R132H	950,8

F. Reacciones directas (isocitrato en α-KG) de la enzima mutante no se completan.

30 Las reacciones directa que contienen ICDH1 R132S o ICDH1 R132H se ensamblaron y se controló el progreso de la reacción mediante un aumento en la OD340 del cofactor NADPH reducido. Se observó (Fig. 23), que estas reacciones transcurren en la dirección directa durante un período de tiempo y luego en dirección inversa y oxidan el cofactor reducido en las primeras etapas de la reacción, esencialmente a la concentración de partida presentes en el inicio del experimento. La adición de más isocitrato reinició la reacción directa por un período de tiempo, pero una vez más no indujo a que la reacción procediera hasta completarse. N vez de eso, el sistema volvió a concentraciones iniciales de NADPH. Este experimento sugiere que las enzimas mutantes estaban realizando una reacción inversa diferente de la conversión de α-KG en isocitrato.

35

2. Análisis de IDH1 de tipo silvestre y de los mutantes R132H y R132S en la reducción de α-cetoglutarato (α-KG).

40 A. Métodos

45 Para determinar la eficiencia catalítica de las enzimas en la reducción de la α-cetoglutarato (α-KG), se llevaron a cabo reacciones para determinar V<sub>max</sub> y K<sub>m</sub> para α-KG. En estas reacciones, el sustrato se varió mientras que el cofactor se mantuvo constante a 500 μM. Todas las reacciones se realizaron en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6,5, glicerol al 10%, BSA al 0,03% (p / v), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, e hidrocbonato de sodio 40 mM. El progreso de la reacción se siguió mediante espectroscopía a 340 nm para controlar el cambio en el estado de oxidación del cofactor. Se añadió suficiente enzima para producir un cambio lineal en la absorbancia durante 10 minutos.

50 B. Las enzimas mutantes R132H y R132S, pero no la enzima de tipo silvestre, apoyan la reducción de α-KG.

Para probar la capacidad de las enzimas de tipo silvestre y mutante para llevar a cabo la reducción de α-KG, se incubaron 40 μg / ml de enzima bajo las condiciones para la reducción de α-cetoglutarato (α-KG) como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la figura 14. La enzima de tipo silvestre fueron incapaces de consumir NADPH, mientras que R132S y R132H redujeron α-KG y consumieron NADPH.

55

C. La reducción de α-KG por los mutantes R132H y R132S ocurre in vitro a concentraciones fisiológicamente relevantes de α-KG.

Para determinar los parámetros cinéticos de la reducción de  $\alpha$ -KG realizada por las enzimas mutantes, se realizó un experimento de titulación del sustrato, tal como se presenta en las Figs. 15A-15B. R132H mantiene la interacción sustrato tipo Hill como se observa en la descarboxilación oxidativa del isocitrato, pero mostró un enlazamiento cooperativo positivo del sustrato. R132S mostró una conversión a la cinética de Michaelis-Menten con la adición de inhibición de sustrato no competitivo, comparado con la enzima de tipo silvestre en la descarboxilación oxidativa del isocitrato. Los parámetros enzimáticos de la enzima mutante se presentan en la Tabla 4. Ya que la enzima de tipo silvestre no consumió NADPH medible en el experimento descrito anteriormente, no se realizó un estudio cinético completo.

Tabla 4

Enzima	Vmax ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	(mM) Km	Constante de Hill	Ki (mM)	Vmax/Km
R132H	1.3	0,965	1,8		1,35
R132S	2.7	0,181	0,479	24,6	14,92

La eficiencia catalítica relativa de la reducción de  $\alpha$ -KG es aproximadamente diez veces mayor en el mutante R132S que en el mutante R132H. La consecuencia biológica es que la tasa de flujo metabólico debe ser mayor en las células que expresan R132S comparado con R132H.

D. Análisis de IDH1 de tipo silvestre y de los mutantes R132H y R132S en la reducción de alfa-cetoglutarato con NADH.

Con el fin de evaluar la capacidad de las enzimas mutantes para utilizar NADH en la reducción de alfa-cetoglutarato, se llevó a cabo el siguiente experimento. Concentraciones finales:  $\text{NaHCO}_3$  40 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, glicerol al 10%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM, BSA al 0,03%, NADH 0,5 mM, IDH1 de tipo silvestre 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , R132S 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , R132H 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , alfa-cetoglutarato 5 mM.

Los resultados se muestran en la fig. 16 y en la Tabla 5. El mutante R132S demostró la capacidad para utilizar NADH mientras que la de tipo silvestre y R132H no mostraron un consumo medible de NADH en presencia de alfa-cetoglutarato.

Tabla 5: Consumo de NADH por R132S en presencia de alfa-cetoglutarato

	R132S		Media	DE
Tasa ( $\Delta\text{A}/\text{seg}$ )	0,001117	0,001088	0,001103	2,05E-05
$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0,718328	0,699678	<b>0,709003</b>	0,013187

## Resumen

Para entender cómo las mutaciones de R132 alteran las propiedades enzimáticas de IDH1, se produjeron y purificaron proteínas de tipo silvestre e IDH1 R132H mutantes a partir de *E. coli*. Cuando se midió la descarboxilación oxidativa que depende de  $\text{NADP}^+$  del isocitrato usando proteína de tipo silvestre purificada o IDH1 mutante R132H, se confirmó que la mutación R132H desmejora la capacidad de IDH1 para catalizar esta reacción (Yan, H. y colaboradores *N Engl J. Med* 360, 765-73 (2009); Zhao, S. y colaboradores *Science* 324, 261-5 (2009)), como es evidente por la pérdida de afinidad de enlazamiento tanto para el isocitrato como para  $\text{MgCl}_2$  junto con una disminución de 1000 veces en la renovación catalítica (Figs. 30A y 30C). Por el contrario, cuando se evaluó la reducción que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG utilizando ya sea proteína de tipo silvestre o IDH1 mutante R132H, únicamente R132H podía catalizar esta reacción a una velocidad medible (Figs. 30 y 30C). Parte de este aumento de velocidad de la reducción de  $\alpha$ -KG resulta de un aumento de la afinidad de enlazamiento tanto para el cofactor NADPH como para el sustrato  $\alpha$ -KG en la IDH1 mutante R132H (Fig. 30C). Tomados juntos, estos datos demuestran que mientras la mutación R132H conduce a una pérdida de función enzimática por descarboxilación oxidativa de isocitrato, esta mutación también resulta en una ganancia de la función enzimática para la reducción que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG.

## 2: Análisis de IDH1 mutante

El mutante R132H no resulta en la conversión de  $\alpha$ -KG en isocitrato.

El uso de métodos experimentales estándar, se configuró un espectrómetro de masas API2000 para la detección óptima de  $\alpha$ -KG y del isocitrato (Tabla 6). Se seleccionaron las transiciones de MRM y se coordinaron de tal manera que cada analito se controló por una transición única. A continuación, una reacción enzimática que contiene  $\alpha$ -KG 1 mM, NADPH 1 mM, y ICDH1 R132H se ensambló y se corrió hasta completarse como se juzga por la disminución de la línea base de la absorbancia óptica a 340 nm. Una reacción de control se llevó a cabo en paralelo a partir de la cual se omitió la enzima. Las reacciones se inactivaron 1:1 con metanol, se extrajeron y se sometieron a análisis por LC-MS/MS.

La figura 18A presenta la reacción de control que indica que  $\alpha$ -KG no fue consumida en ausencia de la enzima, y no se presentó isocitrato detectable. La figura 18B presenta la reacción que contiene la enzima R132H, en la cual el  $\alpha$ -KG había sido consumido, pero no se detectó isocitrato. La figura 18C presenta un segundo análisis de la que contiene la enzima en la cual se había introducido isocitrato hasta una concentración final de 1 mM, demostrando que  $\alpha$ -KG había sido convertida en isocitrato a cualquier concentración apreciable mayor que 0,01%, el sistema analítico configurado habría sido capaz de detectar su presencia en la reacción que contenía la enzima. La conclusión de este experimento es que mientras  $\alpha$ -KG que consumida por R132H, no se produjo isocitrato. Este experimento indica que una neoactividad del mutante R132H es la reducción de  $\alpha$ -KG hasta un compuesto diferente de isocitrato.

Tabla 6. Ajustes del instrumento para la detección de MRM de los compuestos

Compuesto	Q1	Q3	DP	FP	EP	CEP	CE	CXP
$\alpha$ -KG	144,975	100,6	-6	-220	-10	-16	-10	-22
Isocitrato	191,235	110,9	-11	-230	-4,5	-14	-16	-24
$\alpha$ -cetoglutarato	147,085	128,7	-11	-280	-10	-22	-12	-24

El mutante R132H reduce  $\alpha$ -KG hasta el ácido 2-hidroxiglutarico.

Usando métodos experimentales estándar, se configuró un espectrómetro de masas API2000 para detección óptima del 2-hidroxiglutarato (Tabla 6 y la Fig. 19). Se investigaron los productos de reacción de las reacciones que contienen enzima y control de más arriba por la presencia de ácido 2-hidroxiglutarico, fig. 20. En la reacción de control, no se detectó ácido 2-hidroxiglutarico, mientras que en la reacción que contiene R132H, se detectó ácido 2-hidroxiglutarico. Estos datos confirman que una neoactividad del mutante R132H es la reducción de  $\alpha$ -KG hasta el ácido 2-hidroxiglutarico.

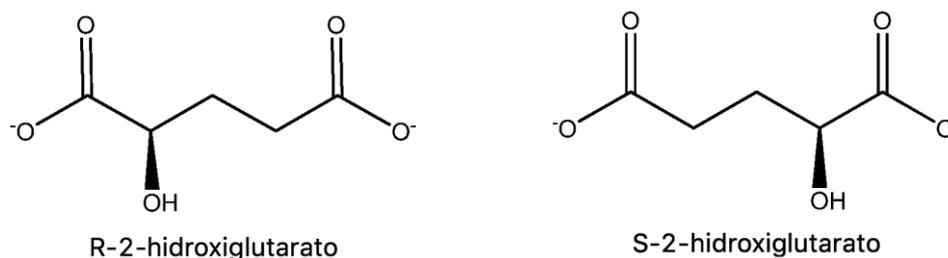
Para determinar si la proteína mutante R132H produce directamente 2HG a partir de  $\alpha$ -KG, se examinó el producto de la reacción de IDH1 mutante utilizando LC-MS con electroaspersión con triple cuadrupolo en modo de ion negativo. Estos experimentos confirmaron que 2HG era el producto directo de la reducción de  $\alpha$ -KG que depende de NADPH por la proteína mutante R132H purificada mediante la comparación con estándares conocidos del metabolito (Fig. 31A). La conversión de  $\alpha$ -KG en isocitrato no fue observada.

Se puede determinar la especificidad enantiomérica del producto de reacción a través de la formación de derivados con DATAN (ácido diacetil-L-tartárico) y la comparación del tiempo de retención con aquella de los estándares conocidos R y S. Este método se describe en Struys y colaboradores, Clin Chem 50: 1391-1395 (2004). La producción estereoespecífica ya sea del enantiómero R o S del ácido alfa-hidroxiglutarico por ICDH1 R132H puede modificar la actividad biológica de otras enzimas presentes en la célula. También puede ocurrir producción racémica.

Por ejemplo, se puede medir el efecto inhibitor del ácido alfa-hidroxiglutarico sobre la actividad enzimática de las enzimas que utilizan  $\alpha$ -KG como sustrato. En una realización, el ácido alfa-hidroxiglutarico puede ser un inhibidor análogo del sustrato o del productos de ICDH1 de tipo silvestre. En otra realización el ácido alfa-hidroxiglutarico puede ser un inhibidor análogo de sustrato o del productos de HIF1 proil hidroxilasa. En el caso anterior, la inhibición de ICDH1 de tipo silvestre por el producto enzimático de R132H reducirá los niveles circulantes de  $\alpha$ -KG en la célula. En este último caso, la inhibición de HIF1 proil hidroxilasa resultará en la estabilización de HIF1 y una inducción de la cohorte de respuesta hipóxica de respuestas celulares.

ICDH R132H reduce  $\alpha$ -KG hasta el enantiómero R de 2-hidroxiglutarato.

Existen dos posibles enantiómeros del producto de la reacción reductora de ICDHR132H, que convierte alfa-cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, estando el centro quiral localizado en la posición del carbono alfa. Los ejemplos de productos se representan a continuación.

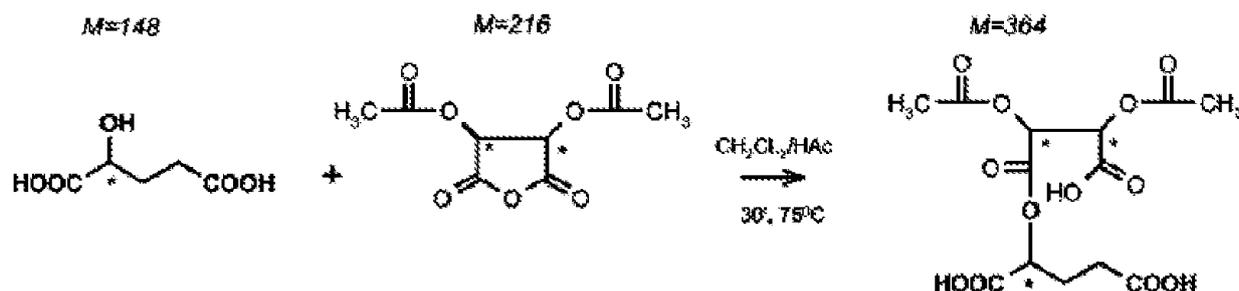


Estos son mencionados por aquellos con conocimiento en la técnica como los enantiómeros R (o pro-R) y S (o pro-S), respectivamente. Con el fin de determinar qué forma o ambas se produce como resultado de la neoactividad de ICDH1 descrita anteriormente, se determinó la cantidad relativa de cada forma quiral en el producto de reacción en

el procedimiento descrito a continuación.

Se llevó a cabo la reducción de  $\alpha$ -KG a 2-HG por ICDHR132H en presencia de NADPH como se describió anteriormente, y se controló el progreso de la reacción mediante un cambio en el coeficiente de extinción del cofactor del nucleótido a 340 nm; una vez se juzgó que la reacción estaba completa, se extrajo la reacción con metanol y se secó completamente en una corriente de gas nitrógeno. En forma paralela, se resuspendieron las muestras de R-2-HG quiralmente pura y una mezcla racémica de R y S-2-HG (producido por una reducción puramente química de un  $\alpha$ -KG en 2-HG) en ddH<sub>2</sub>O, similarmente se extrajo con metanol, y se secó.

Los productos de reacción o los estándares quirales fueron luego resuspendidos en una solución de diclorometano: ácido acético (4:1) que contenía 50 g/L de DATAN y se calentó a 75°C durante 30 minutos para promover la formación de derivados de 2-HG en el esquema descrito a continuación:



Después de enfriar a temperatura ambiente, se secaron las reacciones de la formación de derivados hasta terminación y se resuspendieron en ddH<sub>2</sub>O para el análisis en un sistema de LC-MS / MS. El análisis de los productos de reacción y de los estándares quirales se realizó en un sistema LC-MS/MS API2000 utilizando una columna C18 2 x 150 mm con un flujo isocrático de 200  $\mu$ l/min de 90:10 (formato de amonio, pH 3,6: metanol) y controlando los tiempos de reacción del complejo 2-HG-DATAN usando XIC y la transición MRM de diagnóstico de 363/147 en el modo de ion negativo.

Debe tenerse en cuenta que los tiempos de retención en los experimentos descritos a continuación son aproximados y precisos hasta dentro de +/- 1 minuto; el pico altamente reproducible observado a los 4 minutos es un artefacto de una válvula que conmuta la columnas cuya presencia no tiene ninguna consecuencia sobre las conclusiones extraídas del experimento.

La inyección de la mezcla racémica produjo dos picos de igual área con tiempos de retención de 8 y 10 minutos (Fig. 24A), mientras que la inyección del estándar R-2-HG dio como resultado un pico principal con un área > 95% a los 10 minutos y un pico menor con un área < 5% a los 8 minutos (figura 24B.); indicando que el estándar de R-2-HG es aproximadamente 95% R y 5% S. Por lo tanto, este método permite separar las formas quirales R y S-2-HG y determinar las cantidades relativas de cada uno en una muestra dada. La coinyección de la mezcla racémica y el estándar de R-2-HG dio como resultado dos picos a los 8 y 10 minutos, con un pico mayor a los 10 minutos resultante de la adición de la forma pro-R excedente (el estándar) con una mezcla previamente igual de R y S-2-HG (Fig. 24C). Estos experimentos nos permiten asignar el pico de 8 minutos a la forma S-2-HG y el pico de 10 minutos a la forma R-2-HG.

La inyección del producto de reacción solo de la enzima de neoactividad que forma derivados produce un solo pico a los 10 minutos, lo que sugiere que el producto de reacción es neoactividad es R-2-HG quiralmente puro (Fig. 24D). La coinyección del producto de reacción de neoactividad con el estándar R-2-HG resulta en un pico principal con un área > 95% a los 10 minutos (Fig. 24E) y un pico menor único con un área < 5% a los 8 minutos (previamente observado en la inyección del estándar R-2-HG solo) confirmando la quiralidad del producto de neoactividad como R. La coinyección de una mezcla racémica y el producto de reacción de neoactividad (Fig. 24F) resulta un pico con un área de 60% a los 10 minutos y un pico con un área de 40% a 8 minutos; esta desviación de las áreas de los picos previamente simétricos as en la muestra del racemato es debida a la presencia en exceso de la forma R-2-HG aportado por la adición del producto de reacción de neoactividad. Estos experimentos permiten concluir que la neoactividad de ICDH1 es una reducción quiral altamente específica de  $\alpha$ -KG en R-2-HG.

Propiedades de la enzima de otras mutaciones IDH1

Para determinar si las propiedades de la enzima alteradas que resultan de la mutación R132H fueron compartidas por otras mutaciones de R132 encontradas en gliomas humanos, se generaron proteínas IDH1 mutantes R132C, R132L y R132S y se evaluaron las propiedades enzimáticas. En forma similar a la proteína R132H mutante, R132C, las mutaciones R132L y R132S todas resultaron en una ganancia función para la reducción que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG (datos no mostrados). Por lo tanto, además del desmejoramiento de la descarboxilación oxidativa del isocitrato, una característica común compartida entre las mutaciones IDH1 encontradas en gliomas humanos es la

capacidad de catalizar la reducción directa que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG.

Identificación de la producción de 2-HG en líneas de células de glioblastoma que contienen la proteína mutante IDH-1 R132H.

5 Generación de líneas celulares de glioblastoma modificadas por ingeniería genética que expresan proteína IDH1 de tipo silvestre o mutante. Un clon del marco de lectura abierto (ORF) etiquetado con Myc-DDK en el terminal carboxilo de isocitrato deshidrogenasa 1 humana (IDH1; Ref. ID: NM\_005896) clonado en el vector pCMV6 fue obtenido a través del proveedor comercial Origen Inc. El vector pCMV6 contiene tanto casetes de resistencia a la neomicina como a la canamicina para selección tanto en sistemas bacterianos y como mamíferos. Se utilizaron técnicas estándar de mutagénesis de biología molecular para alterar la secuencia de ADN en el par de bases 364 del ORF para introducir cambios en el par de bases de guanina en adenina lo que resulta en un cambio en el código del aminoácido en la posición 132 de arginina (tipo silvestre) en histidina (mutante; o R132H). La alteración de la secuencia específica de ADN se confirmó mediante métodos estándar por el análisis de la secuencia de ADN. Los vectores parentales pCMV6 (sin inserto), pCMV6-ts IDH1 o pCMV6-R132H fueron transfectados en líneas celulares de glioblastoma humano inmortalizadas ATCC® CRL-2610 (LN-18) o HTB-14 (U-87) en medio de crecimiento estándar (DMEM; Medio de Eagle modificado de Dulbecco que contenía 10% de suero bovino fetal). Aproximadamente 24 horas después de la transfección, los cultivos celulares fueron transferidos a DMEM que contenía sal de sodio G418 en concentraciones ya sea de 750  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (CRL-2610) o 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (HTB-14) para seleccionar aquellas células en el cultivo que expresaron el casete de ADN integrado que expresa tanto el marcador seleccionable de neomicina como el ORF para el tipo silvestre humano o R132H. Se generaron poblaciones combinadas de células resistentes a G418 y se confirmó la expresión tanto de IDH1 de tipo silvestre como IDH1 R132 mediante análisis estándar de transferencias tipo Western de lisados celulares utilizando anticuerpos comerciales que reconocen tanto el antígeno IDH1 humano como la etiqueta de expresión MYC-DDK del terminal carboxilo modificado genéticamente. Estas combinaciones estables clonales fueron luego utilizadas para la preparación y el análisis del metabolito.

30 Procedimiento para la preparación y el análisis de metabolito. Las líneas celulares de glioblastoma (CRL-2610 y HTB-14) que expresan proteína IDH1 mutante o de tipo silvestre fueron cultivadas usando técnicas de cultivo estándar de tejidos de mamífero sobre medio DMEM que contenía 10% de FCS, glucosa 25 mM, glutamina 4 mM, y antibiótico G418 (CRL- 2610 a 750  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ; HTB-14 a 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) para asegurar la selección en curso para preservar las secuencias de expresión mutante transfectadas. En la preparación para los experimentos de extracción del metabolito, se pasaron las células a placas de cultivo redondas de 10 cm con una densidad de  $1 \times 10^6$  células. Aproximadamente 12 horas antes de la extracción del metabolito, se cambió el medio de cultivo (8 ml por placa) a DMEM que contenía 10% de FCS dializado (10000 mwco), glucosa 5 mM, glutamina 4 mM, y antibiótico G418 anteriormente; el FCS dializado remueve múltiples moléculas pequeñas del medio de cultivo celular y permite la evaluación específica del cultivo celular de niveles de metabolito. Se cambió nuevamente el medio 2 horas antes de la extracción del metabolito. La extracción del metabolito se logró mediante aspiración rápida del medio de las placas de cultivo en una campana estéril, colocando inmediatamente los tapas en una bandeja que contenía hielo seco para enfriarlas a  $-80^\circ\text{C}$ , y tan rápido como sea posible, añadir 2,6 ml de 80% de MeOH / 20% de agua, previamente enfriados a  $-80^\circ\text{C}$  en un baño de hielo seco / acetona. Estas células enfriadas extraídas en metanol fueron luego físicamente separadas de las placas de cultivo raspando con un levantador de células de polietileno estéril (Corning # 3008), puesto en suspensión y transferido a un vial cónico de 15 ml, luego enfriado a  $-20^\circ\text{C}$ . Se aplicó 1,0 ml adicional de 80% de MeOH / 20% de agua a la placa de cultivo enfriada, y se repitió el procedimiento de levantamiento de células, para producir un volumen de extracción final de 3,6 ml. Se centrifugaron los extractos a 20.000 x g durante 30 minutos para sedimentar los residuos celulares, y se transfirieron 3,0 ml de los sobrenadantes a un vial de congelador con tapa rosca y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta estar listo para el análisis.

50 En la preparación para el análisis, se removieron los extractos del congelador y se secaron en un soplador de nitrógeno para remover el metanol. Se analizaron las muestras 100% acuosas mediante LCMS de la siguiente forma. Se inyectó el extracto (10  $\mu\text{L}$ ) en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyó utilizando un gradiente lineal de metanol grado LCMS (Regulador B) en tributilamina acuosa 10 mM, ácido acético 15 mM (Regulador A), corriendo desde 3% de regulador B hasta 95% de regulador B durante 45 minutos a 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se detectaron los iones eluidos del metabolito utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición en modo de control de reacción múltiple (MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación para 38 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxioglutarato (los parámetros de GRM se optimizaron para la infusión previa de estándares conocidos del compuesto). Se procesaron los datos utilizando software Analyst (Applied Biosystems, Inc.) y se convirtieron las intensidades de la señal del metabolito en concentraciones absolutas utilizando curvas elaboradas de señal de mezclas inyectadas de estándares de metabolitos a concentraciones conocidas. Las concentraciones finales de metabolito se presentan como media de al menos tres repeticiones, +/- la desviación estándar.

65 Resultados. Los análisis revelaron niveles significativamente altos de 2-HG en células que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H. Como se muestra en la figura 26A, los niveles de 2-HG en líneas celulares CRL-2610 que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H son aproximadamente 28 veces mayores que las líneas idénticas que

expresan la proteína de tipo silvestre. En forma similar, los niveles de 2-HG en líneas celulares HTB-14 que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H son aproximadamente 38 veces mayores que las líneas idénticas que expresan la proteína de tipo silvestre, como se muestra en la figura 26B.

5 Evaluación de la producción de 2-hidroxisuccinato (2-HG) en tumores de glioblastoma humano que contenían mutaciones en isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) en el aminoácido 132.

Las mutaciones somáticas heterocigotas en la posición del nucleótido 395 (codón aminoácido 132) en el transcripto que codifica la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) pueden ocurrir en tumores de cerebro.

10 Fuente de tejido: Los tumores de cerebro humano fueron obtenidos durante resección quirúrgica, congelación instantánea en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. La clasificación clínica del tejido como gliomas se realizó utilizando categorización y clasificación patológica clínica estándar.

15 Análisis de la secuencia genómica para identificar muestras de tumor de cerebro que contienen ya sea isocitrato deshidrogenasa (IDH1) de tipo silvestre o mutaciones que alteran el aminoácido 132. Se aisló ADN genómico de 50-100 mg de tejido tumoral de cerebro utilizando métodos estándar. Se realizó luego un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ADN genómico aislado para amplificar un fragmento 295 de pares de bases del ADN genómico que contiene tanto las secuencias de intrón y como del 2<sup>do</sup> exón de IDH1 humano (Fig. 27). En la figura 27, se muestra la secuencia del intrón en letra minúscula; el 2do exón de la secuencia de ADN de IDH1 se muestra en letra mayúscula; las secuencias del cebador directo (5') e inverso (3') se muestran en caracteres subrayados; el nucleótido guanina mutado en un subgrupo de tumores de glioma humano se muestra en caracteres subrayados y en negrita.

25 El fragmento de ADN amplificado fue luego secuenciado utilizando protocolos estándar y se realizaron las alineaciones de secuencias para clasificar las secuencias, ya sea como de tipo silvestre o mutante en el nucleótido guanina en el par de bases 170 del fragmento PCR amplificado. Se identificaron los tumores que contenían ADN genómico que tenía ya sea dos copias de guanina (tipo silvestre) o una combinación mixta o monoalélica de un alelo IDH1 que contenía guanina y el otro una secuencia de adenina (mutante) en el par de bases 170 del producto amplificado (Tabla 15). El cambio de nucleótido resulta en un cambio en la posición del aminoácido 132 de la proteína IDH1 humana de arginina (tipo silvestre) en histidina (mutante) como se reportó previamente.

Tabla 15. varianza de secuencia en el par de bases 170 del ADN genómico amplificado de muestras de glioma humano.

ID de la muestra	Base 170	IDH1 Amino ácido 132	Genotipo
1102	G	arginina	Tipo silvestre
1822	A	histidina	mutante
496	G	arginina	Tipo silvestre
1874	A	Histidina	mutante
816	A	Histidina	mutante
534	G	Arginina	Tipo silvestre
AP-1	A	Histidina	mutante
AP-2	A	histidina	mutante

35 Procedimiento para preparación y el análisis del metabolito. La extracción del metabolito se logró mediante la adición de un volumen 10 X (relación m/v) de una mezcla de metanol:agua a -80°C (80%:20%) al tejido de cerebro (aproximadamente 100 mg) seguido por 30 segundos de homogeneización a 4°C. Estos tejidos homogenizados enfriados, extraídos en metanol fueron luego centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos para sedimentar los residuos celulares y de tejido y se transfirieron los sobrenadantes de tejido aclarados a un vial de congelador de tapa rosca y se almacenaron a -80°C. Para el análisis, se añadió un volumen 2X de tributilamina (10 mM) ácido acético (10 mM), pH 5,5 a las muestras y se analizaron por LCMS la siguiente forma. Se filtraron los extractos de la muestras usando un disco Millex-FG de 0,20 micras y se inyectaron 10 µL en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyeron utilizando metanol grado LC-MS en gradiente lineal (50%) con tributilamina 10 mM y ácido acético 10 mM) con una rampa de 80% de metanol: tributilamina 10 mM: ácido acético 10 mM durante 6 minutos a 200 µL/min. Se detectaron los iones eluidos del metabolito utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición en modo de control de reacción múltiple (de MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación para 8 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxisuccinato (los parámetros de MRM fueron optimizados por infusión previa de estándares conocidos del compuestos). Se procesaron los datos utilizando software Analyst (Applied Biosystems, Inc.) y se obtuvieron las intensidades de señal del metabolito mediante métodos estándar de integración de pico.

55 Resultados. Los análisis revelaron niveles dramáticamente más altos de 2-HG en muestras de células de tumor que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H. Los datos se resumen en la Tabla 16 y en la fig. 28.

Tabla 16

ID de la muestra	Diagnóstico del espécimen primario	Grado	Células tumorales en los focos tumorales (%)	Genotipo	Cambio de nucleótido	Codón	2HG (μmol/g)	α-KG (μmol/g)	Malato (μmol/g)	Fumarato (μmol/g)	Succinato (μmol/g)	Isocitrato (μmol/g)
1	Glioblastoma, residual/recurrente	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,18	0,161	1,182	0,923	1,075	0,041
2	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,16	0,079	1,708	1,186	3,156	0,100
3	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,13	0,028	0,140	0,170	0,891	0,017
4	Oligoastrocitoma	OMS Grado II	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,21	0,016	0,553	1,061	1,731	0,089
5	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	16,97	0,085	1,091	0,807	1,357	0,058
6	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	19,42	0,023	0,462	0,590	1,966	0,073
7	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	31,56	0,068	0,758	0,503	2,019	0,093
8	Oligodendroglioma, anaplásico	OMS Grado III	75	mutante	G364A	R132H	12,49	0,033	0,556	0,439	0,507	0,091
9	Oligodendroglioma, anaplásico	OMS Grado III	90	mutante	G364A	R132H	4,59	0,029	1,377	1,060	1,077	0,574
10	Oligoastrocitoma	OMS Grado II	n/a	mutante	G364A	R132H	6,80	0,038	0,403	0,503	1,561	0,065
11	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,686	0,686	0,686	0,686	0,686	0,007
12	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	18,791	18,791	18,791	18,791	18,791	0,031

ID de la muestra	Diagnóstico del espécimen primario	Grado	Células tumorales en los focos tumorales (%)	Genotipo	Cambio de nucleótido	Codón	2HG (μmol/g)	α-KG (μmol/g)	Malato (μmol/g)	Fumarato (μmol/g)	Succinato (μmol/g)	Isocitrato (μmol/g)
13	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	4,59	0,029	1,377	1,060	1,077	0,043
14	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,199	0,046	0,180	0,170	0,221	0,014
15	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G363C	R132G	13,827	0,030	0,905	0,599	1,335	0,046
16	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	G364A	R132H	28,364	0,068	0,535	0,488	2,105	0,054
17	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	mutante	C363A	R132S	9,364	0,029	1,038	0,693	2,151	0,121
18	Glioblastoma	OMS Grado IV	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,540	0,031	0,468	0,608	1,490	0,102
19	Glioma, maligno, astrocitoma	OMS Grado IV	80	mutante	G364A	R132H	19,000	0,050	0,654	0,391	2,197	0,171
20	Oligodendroglioma	OMS Grado III	80	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,045	0,037	1,576	0,998	1,420	0,018
21	Glioma, maligno, astrocitoma	OMS Grado IV	95	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,064	0,034	0,711	0,710	2,105	0,165
22	Glioblastoma	OMS Grado IV	70	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,171	0,041	2,066	1,323	0,027	0,072

Para determinar si la producción de 2HG es característico de los tumores que albergan mutaciones en IDH1, se extrajeron metabolitos de gliomas malignos humanos que eran o bien de tipo silvestre o mutantes para IDH1. Se ha sugerido que los niveles de  $\alpha$ -KG disminuyen en las células transfectadas con IDH1 mutante (Zhao, S. y colaboradores. *Science* 324, 261 - 5 (2009)). El nivel promedio de  $\alpha$ -KG de 12 muestras de tumores que albergan diversas mutaciones de R132 fue ligeramente menor que el nivel promedio de  $\alpha$ -KG observado en 10 tumores que son de tipo silvestre para IDH1. Esta diferencia en  $\alpha$ -KG no fue estadísticamente significativa, y se observó un intervalo de niveles de  $\alpha$ -KG tanto en tumores de tipo silvestre como mutantes. Por el contrario, se encontraron niveles mayores de 2HG en todos los tumores que contenían una mutación R132 IDH1. Todos los tumores IDH1 mutantes R132 examinados tenían entre 5 y 35  $\mu$ mol de 2HG por gramo de tumor, mientras que los tumores con IDH1 de tipo silvestre tenían más de 100 veces menos 2HG. Este aumento en 2HG en tumores mutantes de R132 era estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Se confirmó que (R)-2HG era el isómero presente en las muestras de tumor (datos no mostrados). Estos datos en conjunto, establecen que la nueva actividad enzimática asociada con mutaciones R132 en IDH1 traen como resultado la producción de 2HG en tumores de cerebro humano que albergan estas mutaciones.

Se sabe que 2HG se acumulan en el trastorno metabólico heredado aciduria 2-hidroxiglutarica. Esta enfermedad es causada por deficiencia en la enzima 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa, que convierte 2HG en  $\alpha$ -KG (Strays, E. A. y colaboradores. *Am J Hum Genet* 76, 358-60 (2005)). Los pacientes con deficiencias en 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa acumulan 2HG en el cerebro como se evalúa mediante análisis de MRI y CSF, desarrollan leucoencefalopatía, y tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores cerebrales (Aghili, M., Zahedi, F. & Rafiee, J. *Neurooncol* 91, 233 -6 (2009); Kolker, S., Mayatepek, E. & Hoffmann, *Neuropediatría GF* 33, 225-31 (2002); Wajner, M., Latini, A., Wyse, AT & Dutra-Filho, CS *J Inherit Metab Dis* 27, 427-48 (2004)). Además, elevados niveles de 2HG en el cerebro dan como resultado mayores niveles de ROS (Kolker, S. y colaboradores *Eur J Neurosci* 16, 21-8 (2002);.. Latini, A. y colaboradores *Eur J Neurosci* 17, 2017-22 (2003) ), contribuyendo potencialmente a un mayor riesgo de cáncer. La capacidad de 2HG para actuar como un agonista del receptor NMDA puede contribuir a este efecto (Kolker, S. y colaboradores. *Eur J Neurosci* 16, 21-8 (2002)). 2HG también puede ser tóxico para las células inhibiendo competitivamente glutamato y / o  $\alpha$ -KG utilizando enzimas. Estas incluyen transaminasas que permiten la utilización de nitrógeno glutamato para la biosíntesis de aminoácidos y ácido nucleico, y las prolil hidroxilasas que dependen de  $\alpha$ -KG tal como aquellas que regulan los niveles de Hif1 $\alpha$ . Las alteraciones en Hif1 $\alpha$  se ha reportado de resultan de la expresión de proteína IDH1 mutante (Zhao, S. y colaboradores. *Ciencia* 324, 261-5 (2009)). Independientemente del mecanismo, parece probable que la capacidad de ganancia de función de las células para producir 2HG como resultado de las mutaciones de R132 en IDH1 contribuye a la tumorigénesis. Los pacientes con deficiencia de 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa tienen un alto riesgo de neoplasia del SNC (Aghili, M., Zahedi, F. & Rafiee, E. *J Neurooncol* 91, 233-6 (2009)). La capacidad de IDH1 mutante para actuar directamente sobre  $\alpha$ -KG puede explicar la prevalencia de mutaciones IDH1 en tumores de tejido del SNC, que son únicos en su alto nivel de absorción de glutamato y su fácil conversión en  $\alpha$ -KG en el citosol (Tsacopoulos, M. *J Physiol Paris* 96, 283-8 (2002)), proporcionando de esta manera altos niveles de sustrato para la producción de 2HG. La codominancia aparente de la actividad de IDH1 mutante con aquella de la enzima de tipo silvestre es consistente con la genética de la enfermedad, en donde únicamente se muta una sola copia del gen. Como se discutió anteriormente, la IDH1 de tipo silvestre podría proporcionar directamente NADPH y  $\alpha$ -KG a la enzima mutante. Estos datos también demuestran que la mutación de R132 en histidina, serina, cisteína, glicina o leucina comparte una capacidad común para catalizar la conversión que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG en 2HG. Estos hallazgos ayudan a aclarar por qué las mutaciones en otros residuos aminoácidos de IDH1, incluyendo otros residuos esenciales para la actividad catalítica, no se encuentran. Finalmente, estos hallazgos tienen implicaciones clínicas ya que sugieren que la producción de 2HG identificará los pacientes con tumores de cerebro con IDH1 mutante. Esto será importante para pronosticar como los pacientes con mutaciones IDH1 viven más que los pacientes con gliomas caracterizados por otras mutaciones (Parsons, D. W. y col., *Science* 321, 1807-1812 (2008)). Además, los pacientes con gliomas de menor grado pueden beneficiarse por la inhibición terapéutica de la producción de 2HG. La inhibición de la producción de 2HG por IDH1 mutante puede hacer más lenta o detener la conversión de glioma de menor grado en un glioblastoma secundario letal, cambiando el curso de la enfermedad.

El producto de reacción ICDH1 R132H de  $\alpha$ -KG inhibe la descarboxilación oxidativa del isocitrato por ICDH1 de tipo silvestre.

Se ensambló una reacción que contiene ICDH1 de tipo silvestre, NADP, y  $\alpha$ -KG (bajo las condiciones descritas anteriormente) a la que se añadió en una serie de titulación o bien (R)-2-hidroxiglutarato o el producto de reacción de la reducción del mutante ICDH1 R1321H de  $\alpha$ -KG en 2-hidroxiglutarato. El producto de reacción 2-HG ha demostrado inhibir la descarboxilación oxidativa del isocitrato por el ICDH1 de tipo silvestre, mientras que el (R)-2-hidroxiglutarato no mostró ningún efecto sobre la velocidad de la reacción. Puesto que hay sólo dos posibles productos quirales de la reducción de mutante ICDH1 R132H de  $\alpha$ -KG en 2-HG, y la (R)-2-HG no mostró inhibición en este ensayo, se deduce que el producto de la reacción del mutante es la forma (S)-2-HG. Este experimento se presenta en la figura. 25.

Para determinar la quiralidad del 2HG producido, se formaron derivados de los productos de la reacción de R132H con diacetil-L-tartárico anhídrido, lo que permitió la separación de los enantiómeros (S) y (R) de 2HG por simple LC de fase inversa y detectando los productos por espectrometría de masas en tándem (Strays, EA, Jansen, EE,

Verhoeven, NM y Jakobs, C. Clin Chem 50, 1391-5 (2004)) (Fig. 31B). Los picos correspondientes a los isómeros (S) y (R) de 2HG fueron confirmados usando estándares racémico y R(-)-2HG. El producto de reacción de R132H luido conjuntamente con el pico de R(-)-2HG, demostrando que el estereoisómero R(-) es el producto producido a partir de  $\alpha$ -KG por IDH1 mutante R132H.

5 La observación de que el producto de reacción de la enzima mutante es capaz de inhibir una reacción metabólica que se sabe que ocurre en las células sugiere que este producto de reacción puede inhibir también otras reacciones que utilizan  $\alpha$ -KG, isocitrato, o citrato como sustratos o los produce como productos in vivo o in vitro.

### 10 **Ejemplo 3** análisis metabolómicos de IDH1 de tipo silvestre y mutantes

La investigación de metabolómicos puede proporcionar la base mecánica de por qué las mutaciones de R132 confieren una ventaja para la supervivencia de pacientes con GBM que portan dichas mutaciones.

#### 15 1. Metabolómicos de líneas celulares de tumor GBM: tipo silvestre vs mutantes de R132

Las líneas celulares con mutaciones de R132 pueden ser identificadas y perfiladas. Se pueden realizar experimentos en combinaciones de metabolitos proximales con un amplio alcance de metabolitos.

#### 20 2. Tratamiento con Oxalomalato de líneas de células de GBM

El Oxalomalato es un inhibidor competitivo de IDH1. Se puede examinar el cambio de NADPH (Metabolómicos) cuando IDH1 es inhibido por una pequeña molécula.

#### 25 3. Metabolómicos de tumores GBM primarios: de tipo silvestre vs mutaciones de R132

Se pueden identificar los tumores primarios con mutaciones de R132. Se pueden realizar los experimentos en una combinación de metabolitos proximales con un amplio alcance de metabolitos.

#### 30 4. Detección de 2-hidroxiglutarato en células que sobreexpresan mutantes IDH1 132

La sobreexpresión de un mutante IDH1 132 en células puede causar un nivel elevado de 2-hidroxiglutarato y / o un nivel reducido de alfa-cetoglutarato. Se puede realizar un experimento metabolómico para demostrar la consecuencia de esta mutación sobre la combinación de metabolitos celulares.

### 35 **Ejemplo 4** Evaluación de IDH1 como un objetivo del cáncer

La desactivación génica que puede ser inducida con mirARNhc se puede realizar para examinar los perfiles metabolómicos y del fenotipo celular. Las enzimas IDH1 grado HTS están disponibles. Se pueden utilizar las mutaciones de IDH descritos en esta memoria para la selección del paciente.

40

### **Ejemplo 5** ARNci

IDH1

45 Los ejemplos de ARNci se presentan en las siguientes tablas. Se pueden usar métodos conocidos en la técnica para seleccionar otros ARNci. Los ARNci pueden ser evaluadas, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad de un ARNci para silenciar un IDH, por ejemplo, IDH1, por ejemplo, en un sistema in vitro, por ejemplo, en células cultivadas, por ejemplo, células HeLa o células de glioma en cultivadas. Los ARNci conocido en la técnica para silenciar el objetivo también se puede usar, véase, por ejemplo, Silencing of cytosolic NADP+ dependent isocitrate dehydrogehnse by small interfering RNA enhanced the sensitivity of Help cells toward stauropin, Lee y colaboradores., 2009, Free Radical Research, 43: 165-173.

50 Los ARNci en la Tabla 7 (con la excepción de la entrada 1356) fueron generados utilizando la herramienta de selección de ARNci disponible en Internet en [jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/](http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/). (Yuan y colaboradores. Nucl. Acids. Res. 2004 32: W130-W134. ) Se pueden utilizar también otras herramientas de selección. Se adaptó la entrada 1356 de Silencing of cytosolic NADP+ dependent isocitrate dehydrogehnse by small interfering RNA enhanced the sensitivity of Help cells toward stauropin, Lee y colaboradores., 2009, Free Radical Research, 43: 165-173.

55 Los ARNci en las Tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 representan candidatos que abarcan los ARNm de IDH1 en las posiciones de los nucleótidos 628 y 629 de acuerdo con la secuencia en el GenBank con acceso No. NM\_005896.2 (SEQ ID NO: 9, la Fig. 22).

60 Los ARN de las tablas se pueden modificar, por ejemplo, como se describe en esta memoria. Las modificaciones incluyen modificaciones químicas para mejorar las propiedades, por ejemplo, la resistencia a la degradación, o el uso de salientes. Por ejemplo, ya sea una o ambas de las cadenas sentido o antisentido de las tablas, pueden incluir

65

un dinucleótido adicional en el extremo 3', por ejemplo, TT, UU, dTdT.

Tabla 7. Los ARNci que direccionan a IDH1 de tipo silvestre

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
13	GGUUUCUGCAGAGUCUACU	14	AGUAGACUCUGCAGAAACC	15
118	CUCUUCGCCAGCAUAUCAU	16	AUGAU AUGCUGGCGAAGAG	17
140	GGCAGGCGAUAAACUACAU	18	AUGUAGUUUAUCGCCUGCC	19
145	GCGAUAAACUACAUCAGU	20	ACUGAAUGUAGUUUAUCGC	21
199	GAAUUCUAUUCACUGUCA	22	UUGACAGUGAAUAGAUUUC	23
257	GUUCUGUGGUAGAGAUGCA	24	UGCAUCUCUACCACAGAAC	25
272	GCAAGGAGAUGAAAUGACA	26	UGUCAUUUCAUCUCCUUGC	27
277	GGAGAUGAAAUGACACGAA	28	UUCGUGUCAUUUCAUCUCC	29
278	GAGAUGAAAUGACACGAU	30	AUUCGUGUCAUUUCAUCUC	31
280	GAUGAAAUGACACGAUCA	32	UGAUUCGUGUCAUUUCAUC	33
292	CGAUUAUUUGGGAUUUGA	34	UCAAUUCCCAAUUAUUCG	35
302	GGAAUUGAUUAAAGAGAA	36	UUCUCUUUAUUAUUAUCC	37
332	CCUACGUGGAAUUGGAUCU	38	AGAUCCAAUCCACGUAGG	39
333	CUACGUGGAAUUGGAUCUA	40	UAGAUCCAAUCCACGUAG	41
345	GGAUCUACAUAGCUAUGAU	42	AUCAUAGCUAUGUAGAUC	43
356	GCUAUGAUUUAGGCAUAGA	44	UCUAUGCCUAAAUCAUAGC	45
408	GGAUGCUGCAGAAGCUAUA	46	UAUAGCUUCUGCAGCAUCC	47
416	CAGAAGCUAUAAAGAGCA	48	UGCUUCUUUAUAGCUUCUG	49
418	GAAGCUAUAAAGAGCAUA	50	UAUGCUUCUUUAUAGCUUC	51
432	GCAUAAUGUUGGCGUCAAA	52	UUUGACGCCAACAUUAUGC	53
467	CUGAUGAGAAGAGGGUUGA	54	UCAACCCUCUUCUCAUAC	55
481	GUUGAGGAGUUCAGUUGA	56	UCAACUUGAACUCCUCAAC	57
487	GAGUUAAGUUGAAACAAA	58	UUUGUUUCAACUUGAACUC	59
495	GUUGAAACAAAUGUGGAAA	60	UUUCCACAUUUGUUUCAAC	61
502	CAAUUGUGGAAAUCACCAA	62	UUGGUGAUUUCACAUUUG	63
517	CCAAUUGGCACCAUACGAA	64	UUCGUUUGGUGCCAUUUGG	65
528	CAUACGAAAUUUCUGGGU	66	ACCCAGAAUUAUUCGUUUG	67
560	GAGAAGCCAUUAUCUGCAA	68	UUGCAGAUAAUGGCUUCUC	69
614	CUAUCAUCAUAGGUCGUCA	70	UGACGACCUAUGAUGAUAG	71
618	CAUCAUAGGUCGUCAUGCU	72	AGCAUGACGACCUAUGAUG	73
621	CAUAGGUCGUCAUGCUUAU	74	AUAAGCAUGACGACCUAUG	75
691	GAGUAACCUACACACCAA	76	UUGGUGUGUAGGUUAUCUC	77
735	CCUGGUACAUAACUUUGAA	78	UUCAAAGUUAUGUACCAGG	79
747	CUUUGAAGAAGGUGGUGGU	80	ACCACCACCUUCUUCAAAG	81
775	GGGAUGUAUAAUCAAGUA	82	UAUCUUGAUUAUACAUCCC	83
811	GCACACAGUUCUUCCAA	84	UUUGGAAGGAACUGUGUGC	85
818	GUUCCUUCCAAUUGGCUCU	86	AGAGCCAUUUGGAAGGAAC	87
844	GGUUGGCCUUUGUAUCUGA	88	UCAGAUACAAAGGCCAAC	89
851	CUUUGUAUCUGAGCACCAA	90	UUGGUGCUCAGAUACAAAG	91
882	GAAGAAUAUGAUGGGCGU	92	ACGCCCAUCAUUAUUCUUC	93
942	GUCCCAGUUUGAAGCUCAA	94	UUGAGCUUCAACUGGGAC	95
968	GGUAGAGCAUAGGCUCAU	96	AUGAGCCUAGUCUCAUACC	97
998	GGCCCAAGCUAUGAAAUCA	98	UGAUUUCUAGCUUUGGCC	99
1001	CCCAAGCUAUGAAAUCAGA	100	UCUGAUUUCUAGCUUUGG	101
1127	CAGAUGGCAAGACAGUAGA	102	UCUACUGUCUUGCCAUCUG	103
1133	GCAAGACAGUAGAAGCAGA	104	UCUGCUUCUACUGUCUUGC	105
1184	GCAUGUACCAGAAAGGACA	106	UGUCCUUUCUGGUACAUGC	107
1214	CCAUUCCAUUUGCUUCCA	108	AUGGAAGCAAUGGGAUUGG	109
1257	CCACAGAGCAAAGCUUGAU	110	AUCAAGCUUUGCUCUGUG	111
1258	CACAGAGCAAAGCUUGAU	112	UAUCAAGCUUUGCUCUGUG	113
1262	GAGCAAAGCUUGAUAAACA	114	UUGUUAUCAAGCUUUGCUC	115
1285	GAGCUUGCCUUCUUGCAA	116	UUGCAAAGAAGGCAAGCUC	117
1296	CUUUGCAAUUGCUUUGGAA	118	UUCCAAAGCAUUGCAAAG	119
1301	CAAUUGCUUUGGAAGAAGU	120	ACUUCUUCCAAAGCAUUG	121
1307	CUUUGGAAGAAGUCUCUAU	122	AUAGAGACUUCUUCCAAAG	123
1312	GAAGAAGUCUCUAUUGAGA	124	UCUCAUAGAGACUUCUUC	125
1315	GAAGUCUCUAUUGAGACAA	126	UUGUCUCAUAGAGACUUC	127

ES 2 594 402 T3

1356	GGACUUGGCUGCUUGCAUJ	128	AAUGCAAGCAGCCAAGUCC	129
1359	CUUGGCUGCUUGCAUJAAA	130	UUUAAUGCAAGCAGCCAAG	131
1371	CAUJAAAGGUUUACCCAUI	132	AUUGGGUAAACCUUUAAUG	133

(continuación)

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
1385	CCAAUGUGCAACGUUCUGA	134	UCAGAACGUUGCACAUUGG	135
1390	GUGCAACGUUCUGACUACU	136	AGUAGUCAGAACGUUGCAC	137
1396	CGUUCUGACUACUUGAAUA	138	UAUCCAAGUAGUCAGAACG	139
1415	CAUUUGAGUJCAUGGAUAA	140	UUAUCCAUGAACUCAAAUG	141
1422	GUUCAUGGAUAAACUUGGA	142	UCCAAGUUUAUCCAUGAAC	143
1425	CAUGGAUAAACUUGGAGAA	144	UUCUCCAAGUUUAUCCAUG	145
1455	CAAACUAGCUCAGGCCAAA	146	UUUGGCCUGAGCUAGUUUG	147
1487	CCUGAGCUAAGAAGGAUAA	148	UUAUCCUUCUJAGCUCAGG	149
1493	CUAAGAAGGAUAAUUGUCU	150	AGACAAUUUACCUUCUJAG	151
1544	CUGUGUUACACUCAAGGAU	152	AUCCUUGAGUGUAACACAG	153
1546	GUGUUACACUCAAGGAUAA	154	UUAUCCUUGAGUGUAACAC	155
1552	CACUCAAGGAUAAAGGCAA	156	UUGCCUUUAUCCUUGAGUG	157
1581	GUAAUUUGUUUAGAAGCCA	158	UGGCUUCJAAACAAAUUAC	159
1646	GUUAAUUGCCACCUUUGUGA	160	UCACAAAGGUGGCCAAUJAC	161
1711	CAGCCUAGGAAUUCGGUUA	162	UAACCGAAUUCUJAGGCUG	163
1713	GCCUAGGAAUUCGGUJAGU	164	ACUAACCGAAUUCUJAGGC	165
1714	CCUAGGAAUUCGGUJAGUA	166	UACUAACCGAAUUCUJAGG	167
1718	GGAAUUCGGUJAGUACUCA	168	UGAGUACUAACCGAAUUC	169
1719	GAAUUCGGUJAGUACUCAU	170	AUGAGUACUAACCGAAUUC	171
1725	GGUUAGUACUCAUUUGUJAU	172	AUACAAUJAGUACUAAC	173
1730	GUACUCAUUUGUJAUJACU	174	AGUGAAUACAAUJAGUAC	175
1804	GGUAAUJAGUAGCCACAGU	176	ACUGUGGCUAUCAUUUAC	177
1805	GUAAUJAGUAGCCACAGUA	178	UACUGUGGCUAUCAUUUAC	179
1816	CCACAGUJAUUGCUCUCAA	180	UUAGGGACCAUJAGUUGG	181
1892	GGGAAGUUCUGGUGUJAU	182	UAUGACACCAGAACUUC	183
1897	GUUCUGGUGUJAUJAGUJAU	184	AUAUCUAUGACACCAGAAC	185
1934	GCUGUGCAUJAAACUJUGCA	186	UGCAAGUUJAAUJGCACAGC	187
1937	GUGCAUJAAACUJGCACAU	188	AUGUGCAAGUUJAAUJGCAC	189
1939	GCAUJAAACUJGCACAUJGA	190	UCAUGUGCAAGUUJAAUJGC	191
1953	CAUGACUGGAACGAAGUJAU	192	AUACUUCGUUCAGUJAUJAG	193
1960	GGAACGAAGUJAGUJAGUGCA	194	UGCACUJAUACUUCGUUC	195
1961	GAACGAAGUJAGUJAGUGCAA	196	UUGCACUJAUACUUCGUUC	197
1972	GAGUGCAACUCAAAUJUGU	198	ACACAUUJAGUJAGUJGCACU	199
1976	GCAACUCAAAUJUGUJAGAA	200	UUCAACCAUJAGUJAGUJGC	201
1982	CAAUJUGUJAGUJAGUJAGUJACU	202	AGUJAUUCUJAAACAUUUUG	203
1987	GUGUJAGUJAGUJAGUJAGUJAGU	204	ACUGCAGUJAUUCUJAAACAC	205
1989	GUJAGUJAGUJAGUJAGUJAGUJAGU	206	UGACUGCAGUJAUUCUJAAAC	207
2020	CCUJGCUGAAUJGUUJCCAA	208	UUGGAAACAUJAGCAAGG	209
2021	CUJGCUGAAUJGUUJCCAAU	210	AUUGGAAACAUJAGCAAG	211
2024	GCUGAAUJGUUJCCAAUJAGA	212	UCUJAUJGGAAACAUUCAGC	213
2035	CCAUJAGACUJAAUJACUGU	214	ACAGUJAUUJAGUCUJAUUGG	215
2067	GAGUUJGGAAUJCCGGAUUA	216	UAUUCGGAUJCCAAACUC	217
2073	GGAUJCCGGAUJAAUJACU	218	AGUJAUUJAUJCCGGAUUC	219
2074	GAAUJCCGGAUJAAUJACUA	220	UAGUJAUUJAUJCCGGAUUC	221
2080	GGAUJAAUJACUJACCUGGA	222	UCCAGGUJAGUJAUUJAUUC	223
2133	GGCCUGGCCUGAAUJAUUJAU	224	AUAUJAUUJAGGCCAGGCC	225
2134	GCCUGAAUJAUUJACUJACU	226	AGUJAGUJAAUJAUJAGGC	227
2136	CUGGCCUGAAUJAUUJACU	228	AGUJAUUJAUUJAGGCCAG	229
2166	CAUJAUUJCAUJCAAGUGCA	230	UGCACUJGGAUJAAUJAUJAG	231
2180	GUGCAUJAAUJGUJAGCUGA	232	UCAGCUJACAUUJAUJGCAC	233
2182	GCAUJAAUJGUJAGCUGAAU	234	AUUCAGCUJACAUUJAUJGC	235
2272	CACUJAUUCUJAUUCUUCU	236	AGGAGAAUJAGUJAGUJAGUG	237
2283	CUUCUCCUGAACUGUJAGU	238	AUCAACAGUJAGGAGAAAG	239

Tabla 8. Los ARNci que direccionan IDH1 de tipo silvestre

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID
--------------------------------	-------------------	------------	-----------------------	--------

				NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUCCG	240	CGACCUAUGAUGAUAGGUU	241
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCCGU	242	ACGACCUAUGAUGAUAGGU	243
613	CCUAUCAUCAUAGGUCCGUC	244	GACGACCUAUGAUGAUAGG	245

(continuación)

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
614	CUAUCAUCAUAGGUCCGUCA	246	UGACGACCUAUGAUGAUAG	247
615	UAUCAUCAUAGGUCCGUCAU	248	AUGACGACCUAUGAUGAUA	249
616	AUCAUCAUAGGUCCGUCAUG	250	CAUGACGACCUAUGAUGAU	251
617	UCAUCAUAGGUCCGUCAUGC	252	GCAUGACGACCUAUGAUGA	253
618	CAUCAUAGGUCCGUCAUGCU	254	AGCAUGACGACCUAUGAUG	255
619	AUCAUAGGUCCGUCAUGCUU	256	AAGCAUGACGACCUAUGAU	257
620	UCAUAGGUCCGUCAUGCUUA	258	UAAGCAUGACGACCUAUGA	259
621	CAUAGGUCCGUCAUGCUUAU	260	AUAAGCAUGACGACCUAUG	261
622	AUAGGUCCGUCAUGCUUAUG	262	CAUAAGCAUGACGACCUAU	263
623	UAGGUCCGUCAUGCUUAUGG	264	CCAUAAAGCAUGACGACCUA	265
624	AGGUCCGUCAUGCUUAUGGG	266	CCCAUAAGCAUGACGACCU	267
625	GGUCCGUCAUGCUUAUGGGG	268	CCCAUAAGCAUGACGACCU	269
626	GUCGUCAUGCUUAUGGGGA	270	UCCCAUAAGCAUGACGACCU	271
627	UCGUCAUGCUUAUGGGGAU	272	AUCCCAUAAGCAUGACGACCU	273

Tabla 9. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante G395A (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629A de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUCA	274	UGACCUAUGAUGAUAGGUU	275
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCAU	276	AUGACCUAUGAUGAUAGGU	277
613	CCUAUCAUCAUAGGUCAUC	278	GAUGACCUAUGAUGAUAGG	279
614	CUAUCAUCAUAGGUCAUCA	280	UGAUGACCUAUGAUGAUAG	281
615	UAUCAUCAUAGGUCAUCAU	282	AUGAUGACCUAUGAUGAUA	283
616	AUCAUCAUAGGUCAUCAUG	284	CAUGAUGACCUAUGAUGAU	285
617	UCAUCAUAGGUCAUCAUGC	286	GCAUGAUGACCUAUGAUGA	287
618	CAUCAUAGGUCAUCAUGCU	288	AGCAUGAUGACCUAUGAUG	289
619	AUCAUAGGUCAUCAUGCUU	290	AAGCAUGAUGACCUAUGAU	291
620	UCAUAGGUCAUCAUGCUUA	292	UAAGCAUGAUGACCUAUGA	293
621	CAUAGGUCAUCAUGCUUAU	294	AUAAGCAUGAUGACCUAUG	295
622	AUAGGUCAUCAUGCUUAUG	296	CAUAAGCAUGAUGACCUAU	297
623	UAGGUCAUCAUGCUUAUGG	298	CCAUAAAGCAUGAUGACCUA	299
624	AGGUCAUCAUGCUUAUGGG	300	CCCAUAAGCAUGAUGACCU	301
625	GGUCAUCAUGCUUAUGGGG	302	CCCAUAAGCAUGAUGACCU	303
626	GUCAUCAUGCUUAUGGGGA	304	UCCCAUAAGCAUGAUGACCU	305
627	UCAUCAUGCUUAUGGGGAU	306	AUCCCAUAAGCAUGAUGA	307

Tabla 10. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante C394A (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628A de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B)) (Arg132Ser (SEQ ID NO: 8))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUAG	308	CUACCUAUGAUGAUAGGUU	309
612	ACCUAUCAUCAUAGGUAGU	310	ACUACCUAUGAUGAUAGGU	311
613	CCUAUCAUCAUAGGUAGUC	312	GACUACCUAUGAUGAUAGG	313
614	CUAUCAUCAUAGGUAGUCA	314	UGACUACCUAUGAUGAUAG	315
615	UAUCAUCAUAGGUAGUCAU	316	AUGACUACCUAUGAUGAUA	317
616	AUCAUCAUAGGUAGUCAUG	318	CAUGACUACCUAUGAUGAU	319
617	UCAUCAUAGGUAGUCAUGC	320	GCAUGACUACCUAUGAUGA	321
618	CAUCAUAGGUAGUCAUGCU	322	AGCAUGACUACCUAUGAUG	323
619	AUCAUAGGUAGUCAUGCUU	324	AAGCAUGACUACCUAUGAU	325
620	UCAUAGGUAGUCAUGCUUA	326	UAAGCAUGACUACCUAUGA	327
621	CAUAGGUAGUCAUGCUUAU	328	AUAAGCAUGACUACCUAUG	329
622	AUAGGUAGUCAUGCUUAUG	330	CAUAAGCAUGACUACCUAU	331
623	UAGGUAGUCAUGCUUAUGG	332	CCAUAAAGCAUGACUACCUA	333
624	AGGUAGUCAUGCUUAUGGG	334	CCCAUAAGCAUGACUACCU	335
625	GGUAGUCAUGCUUAUGGGG	336	CCCAUAAGCAUGACUACCU	337

ES 2 594 402 T3

626	GUAGUCAUGC UUAUGGGGA	338	UCCCCAU AAGCAUGACUAC	339
627	UAGUCAUGC UUAUGGGGAU	340	AUCCCCAU AAGCAUGACUA	341

Tabla 11. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante C394U (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628U de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B)) (Arg132Cvs (SEQ ID NO: 8))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUUG	342	CAACCUAUGAUGAUAGGUU	343
612	ACCUAUCAUCAUAGGUUGU	244	ACAACCUAUGAUGAUAGGU	345
613	CCUAUCAUCAUAGGUUGUC	246	GACAACCUAUGAUGAUAGG	347
614	CUAUCAUCAUAGGUUGUCA	248	UGACAACCUAUGAUGAUAG	349
615	UAUCAUCAUAGGUUGUCAU	350	AUGACAACCUAUGAUGAUA	351
616	AUCAUCAUAGGUUGUCAUG	352	CAUGACAACCUAUGAUGAU	353
617	UCAUCAUAGGUUGUCAUGC	354	GCAUGACAACCUAUGAUGA	355
618	CAUCAUAGGUUGUCAUGCU	256	AGCAUGACAACCUAUGAUG	357
619	AUCAUAGGUUGUCAUGCUU	358	AAGCAUGACAACCUAUGAU	359
620	UCAUAGGUUGUCAUGCUUA	360	UAAGCAUGACAACCUAUGA	361
621	CAUAGGUUGUCAUGCUUAU	362	AUAAGCAUGACAACCUAUG	363
622	AUAGGUUGUCAUGCUUAUG	364	CAUAAGCAUGACAACCUAU	365
623	UAGGUUGUCAUGCUUAUGG	366	CCAUAAGCAUGACAACCUA	367
624	AGGUUGUCAUGCUUAUGGG	368	CCCAUAAGCAUGACAACCU	369
625	GGUUGUCAUGCUUAUGGGG	370	CCCCAU AAGCAUGACAACC	371
626	GUUGUCAUGCUUAUGGGGA	372	UCCCCAU AAGCAUGACAAC	373
627	UUGUCAUGCUUAUGGGGAU	374	AUCCCCAU AAGCAUGACAA	375

Tabla 12. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante C394G (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628G de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B)) (Arg132Gly (SEQ ID NO: 8))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUGG	376	CCACCUAUGAUGAUAGGUU	377
612	ACCUAUCAUCAUAGGUGGU	378	ACCACCUAUGAUGAUAGGU	379
613	CCUAUCAUCAUAGGUGGUC	380	GACCACCUAUGAUGAUAGG	381
614	CUAUCAUCAUAGGUGGUCA	382	UGACCACCUAUGAUGAUAG	383
615	UAUCAUCAUAGGUGGUCAU	384	AUGACCACCUAUGAUGAUA	385
616	AUCAUCAUAGGUGGUCAUG	386	CAUGACCACCUAUGAUGAU	387
617	UCAUCAUAGGUGGUCAUGC	388	GCAUGACCACCUAUGAUGA	389
618	CAUCAUAGGUGGUCAUGCU	390	AGCAUGACCACCUAUGAUG	391
619	AUCAUAGGUGGUCAUGCUU	392	AAGCAUGACCACCUAUGAU	393
620	UCAUAGGUGGUCAUGCUUA	394	UAAGCAUGACCACCUAUGA	395
621	CAUAGGUGGUCAUGCUUAU	396	AUAAGCAUGACCACCUAUG	397
622	AUAGGUGGUCAUGCUUAUG	398	CAUAAGCAUGACCACCUAU	399
623	UAGGUGGUCAUGCUUAUGG	400	CCAUAAGCAUGACCACCUA	401
624	AGGUUGUCAUGCUUAUGGG	402	CCCAUAAGCAUGACCACCU	403
625	GGUUGUCAUGCUUAUGGGG	404	CCCCAU AAGCAUGACCACC	405
626	GUUGUCAUGCUUAUGGGGA	406	UCCCCAU AAGCAUGACCAC	407
627	UUGUCAUGCUUAUGGGGAU	408	AUCCCCAU AAGCAUGACCA	409

Tabla 13. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante G395C (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629C de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B)) (Arg132Pro (SEQ ID NO: 8))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUCG	410	CGACCUAUGAUGAUAGGUU	411
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCGU	412	ACGACCUAUGAUGAUAGGU	413
613	CCUAUCAUCAUAGGUCGUC	414	GACGACCUAUGAUGAUAGG	415
614	CUAUCAUCAUAGGUCGUCA	416	UGACGACCUAUGAUGAUAG	417
615	UAUCAUCAUAGGUCGUCAU	418	AUGACGACCUAUGAUGAUA	419
616	AUCAUCAUAGGUCGUC AUG	420	CAUGACGACCUAUGAUGAU	421
617	UCAUCAUAGGUCGUC AUGC	422	GCAUGACGACCUAUGAUGA	423
618	CAUCAUAGGUCGUC AUGCU	424	AGCAUGACGACCUAUGAUG	425
619	AUCAUAGGUCGUC AUGCUU	426	AAGCAUGACGACCUAUGAU	427
620	UCAUAGGUCGUC AUGCUUA	428	UAAGCAUGACGACCUAUGA	429

621	CAUAGGUCGUCAUGCUIAU	430	AUAAGCAUGACGACCUAUG	431
622	AUAGGUCGUCAUGCUIAU	432	CAUAAGCAUGACGACCUAU	433
623	UAGGUCGUCAUGCUIAUGG	434	CCAUAAGCAUGACGACCUA	435
624	AGGUCGUCAUGCUIAUGGG	436	CCCAUAAGCAUGACGACCU	437

(continuación)

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
625	GGUCGUCAUGCUIAUGGGG	438	CCCCAUAAGCAUGACGACC	439
626	GUCGUCAUGCUIAUGGGGA	440	UCCCCAUAAGCAUGACGAC	441
627	UCGUCAUGCUIAUGGGGAU	442	AUCCCCAUAAGCAUGACGA	443

Tabla 14. Los ARNci que direccionan el IDH1 mutante G395U (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629U de la SEQ ID NO: 9 (Fig. 21B)) (Arg132Leu (SEQ ID NO: 8))

Posición sobre ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUCU	444	AGACCUAUGAUGAUAGGUU	445
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCUU	446	AAGACCUAUGAUGAUAGGU	447
613	CCUAUCAUCAUAGGUCUUC	448	GAAGACCUAUGAUGAUAGG	449
614	CUAUCAUCAUAGGUCUUCA	450	UGAAGACCUAUGAUGAUAG	451
615	UAUCAUCAUAGGUCUUCAU	452	AUGAAGACCUAUGAUGAUA	453
616	AUCAUCAUAGGUCUUCAUG	454	CAUGAAGACCUAUGAUGAU	455
617	UCAUCAUAGGUCUUCAUGC	456	GCAUGAAGACCUAUGAUGA	457
618	CAUCAUAGGUCUUCAUGCU	458	AGCAUGAAGACCUAUGAUG	459
619	AUCAUAGGUCUUCAUGCUU	460	AAGCAUGAAGACCUAUGAU	461
620	UCAUAGGUCUUCAUGCUUA	462	UAAGCAUGAAGACCUAUGA	463
621	CAUAGGUCUUCAUGCUIAU	464	AUAAGCAUGAAGACCUAUG	465
622	AUAGGUCUUCAUGCUIAUG	466	CAUAAGCAUGAAGACCUAU	467
623	UAGGUCUUCAUGCUIAUGG	468	CCAUAAGCAUGAAGACCUA	469
624	AGGUCUUCAUGCUIAUGGG	470	CCCAUAAGCAUGAAGACCU	471
625	GGUCUUCAUGCUIAUGGGG	472	CCCCAUAAGCAUGAAGACC	473
626	GUCUUCAUGCUIAUGGGGA	474	UCCCCAUAAGCAUGAAGAC	475
627	UCUUCAUGCUIAUGGGGAU	476	AUCCCCAUAAGCAUGAAGA	477

5

IDH2

Los ejemplos de ARNci se presentan en las siguientes tablas. Se pueden usar métodos conocidos en la técnica para seleccionar otros. Los ARNci pueden ser evaluados, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad de un ARNci para silenciar un, por ejemplo, IDH2, por ejemplo, en un sistema in vitro, por ejemplo, en células cultivadas, por ejemplo, células HeLa o células de glioma cultivadas, por ejemplo,

10

Los ARNci en la Tabla 15 fueron generados utilizando la herramienta de selección de ARNci disponible en Internet en [jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/](http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/). (Yuan y colaboradores. Nucl. Acids. Res. 2004 32: W130-W134). Se pueden utilizar también otras herramientas de selección. Se adaptó la entrada 1356 de Silencing of cytosolic NADP+ dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhanced the sensitivity of HeLa cells toward staurosporin, Lee y colaboradores., 2009, Free Radical Research, 43: 165-173.

15

Los ARNci en las Tablas 16-23 representan candidatos que abarcan los ARNm de IDH2 en las posiciones de los nucleótidos 600, 601 y 602 de acuerdo con la secuencia de ARNm presentada en el GenBank con acceso No. NM\_002168.2 datos registrados el 16 de agosto de 2009; GI28178831) (SEQ ID NO: 12 Figura 22B; equivalente a las posiciones de los nucleótidos 514, 515, y 516 de la secuencia de ADNc representada por la SEQ ID NO: 11, Figura 22A).

20

Los ARN de las tablas se pueden modificar, por ejemplo, como se describe en esta memoria. Las modificaciones incluyen modificaciones químicas para mejorar las propiedades, por ejemplo, la resistencia a la degradación, o el uso de salientes. Por ejemplo, ya sea una o ambas de las cadenas sentido o antisentido de las tablas, pueden incluir un dinucleótido adicional en el extremo 3', por ejemplo, TT, UU, dTdT.

25

30

Tabla 15. Los ARNci que direccionan IDH2 de tipo silvestre

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
250	GUGAUGAGAUGACCCGUU	478	AUACGGGUCAUCUCAUCAC	479
252	GAUGAGAUGACCCGUUUA	480	UAAUACGGGUCAUCUCAUC	481
264	CGUAUUUAUCUGGCAGUUC	482	UGAACUGCCAGAUAAUACG	483
274	GGCAGUUCAUCAAGGAGAA	484	UUCUCCUUGAUGAACUGCC	485

ES 2 594 402 T3

451	GUGUGGAAGAGUUCAAGCU	486	AGCUUGAACUCUCCACAC	487
453	GUGGAAGAGUUCAAGCUGA	488	UCAGCUUGAACUCUCCAC	489
456	GAAGAGUUCAAGCUGAAGA	490	UCUUCAGCUUGAACUCUUC	491
795	CAGUAUGCCAUCCAGAAGA	492	UCUUCUGGAUGGCAUACUG	493

(continuación)

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
822	CUGUACAUGAGCACCAAGA	494	UCUUGGUGCUCUAGUACAG	495
832	GCACCAAGAACACCAUACU	496	AGUAUGGUGUUCUUGGUGC	497
844	CCAUACUGAAAGCCUACGA	498	UCGUAGGCUUUCAGUAUGG	499
845	CAUACUGAAAGCCUACGAU	500	AUCGUAGGCUUUCAGUAUG	501
868	GUUUCAAGGACAUCUCCA	502	UGGAAGAUGUCCUUGAAAC	503
913	CCGACUUCGACAAGAAUAA	504	UUUUUCUUGUCGAAGUCGG	505
915	GACUUCGACAAGAAUAGA	506	UCUUUUUCUUGUCGAAGUC	507
921	GACAAGAAUAGAUCUGGU	508	ACCAGAUCUUUUUCUUGUC	509
949	GGCUCAUUGAUGACAUGGU	510	ACCAUGUCAUCAUAGAGCC	511
1009	GCAAGAACUAUGACGGAGA	512	UCUCCGUCAUAGUUCUUGC	513
1010	CAAGAACUAUGACGGAGAU	514	AUCUCCGUCAUAGUUCUUG	515
1024	GAGAUGUCAGUCAGACAU	516	AUGUCGACUCGACAUUCUC	517
1096	CUGAUGGGAAGACGAUUGA	518	UCAAUUCGUUUCUCCACAG	519
1354	GCAAUGUGAAGCUGAACGA	520	UCGUUCAGCUUCACAUUGC	521
1668	CUGUAAUUUAUUUGCCCU	522	AGGGCAAUAUAAUUUACAG	523
1694	CAUGGUGCCAUAUUUAGCU	524	AGCUAAAUAUGGCACCAUG	525
1697	GGUGCCAUAUUUAGCUACU	526	AGUAGCUAAAUAUGGCACC	527
1698	GUGCCAUAUUUAGCUACUA	528	UAGUAGCUAAAUAUGGCAC	529
1700	GCCAUUUUAGCUACUAAA	530	UUUAGUAGCUAAAUAUGGC	531

Tabla 16. Los ARNci que direccionan IDH2 de tipo silvestre

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAGG	532	CCUGCCAAUGGUGAUGGGC	533
585	CCCAUCACCAUUGGCAGGC	534	GCCUGCCAAUGGUGAUGGG	535
586	CCAUCACCAUUGGCAGGCA	536	UGCCUGCCAAUGGUGAUGG	537
587	CAUCACCAUUGGCAGGCAC	538	GUGCCUGCCAAUGGUGAUG	539
588	AUCACCAUUGGCAGGCACG	540	CGUGCCUGCCAAUGGUGAU	541
589	UCACCAUUGGCAGGCACGC	542	GCGUGCCUGCCAAUGGUGA	543
590	CACCAUUGGCAGGCACGCC	544	GGCGUGCCUGCCAAUGGUG	545
591	ACCAUUGGCAGGCACGCC	546	GGGCGUGCCUGCCAAUGGU	547
592	CCAUUGGCAGGCACGCCA	548	UGGGCGUGCCUGCCAAUGG	549
593	CAUUGGCAGGCACGCCAU	550	AUGGGCGUGCCUGCCAAUG	551
594	AUUGGCAGGCACGCCAUG	552	CAUGGGCGUGCCUGCCAAU	553
595	UUGGCAGGCACGCCAUGG	554	CCAUGGGCGUGCCUGCCAA	555
596	UGGCAGGCACGCCAUGGC	556	GCCAUGGGCGUGCCUGCCA	557
597	GGCAGGCACGCCAUGGCG	558	CGCCAUGGGCGUGCCUGCC	559
598	GCAGGCACGCCAUGGCGA	560	UCGCCAUGGGCGUGCCUGC	561
599	CAGGCACGCCAUGGCGAC	562	GUCGCCAUGGGCGUGCCUG	563
600	AGGCACGCCAUGGCGACC	564	GGUCGCCAUGGGCGUGCCU	565

Tabla 17. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante A514G (equivalente a A600G de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAGG	566	CCCGCCAAUGGUGAUGGGC	567
585	CCCAUCACCAUUGGCAGGC	568	GCCCGCCAAUGGUGAUGGG	569
586	CCAUCACCAUUGGCAGGCA	570	UGCCCGCCAAUGGUGAUGG	571
587	CAUCACCAUUGGCAGGCAC	572	GUGCCCGCCAAUGGUGAUG	573
588	AUCACCAUUGGCAGGCACG	574	CGUGCCCGCCAAUGGUGAU	575
589	UCACCAUUGGCAGGCACGC	576	GCGUGCCCGCCAAUGGUGA	577
590	CACCAUUGGCAGGCACGCC	578	GGCGUGCCCGCCAAUGGUG	579
591	ACCAUUGGCAGGCACGCC	580	GGGCGUGCCCGCCAAUGGU	581
592	CCAUUGGCAGGCACGCCA	582	UGGGCGUGCCCGCCAAUGG	583
593	CAUUGGCAGGCACGCCAU	584	AUGGGCGUGCCCGCCAAUG	585
594	AUUGGCAGGCACGCCAUG	586	CAUGGGCGUGCCCGCCAAU	587

ES 2 594 402 T3

595	UUGGCGGGCAGCCCAUGG	588	CCAUGGGCGUGCCCGCAA	589
596	UGGCGGGCAGCCCAUGGC	590	GCCAUGGGCGUGCCCGCCA	591
597	GGCGGGCAGCCCAUGGCG	592	CGCCAUGGGCGUGCCCGCC	593
598	GCGGGCAGCCCAUGGCGA	594	UCGCCAUGGGCGUGCCCGC	595
599	CGGGCAGCCCAUGGCGAC	596	GUCGCCAUGGGCGUGCCCG	597
600	GGGCAGCCCAUGGCGACC	598	GGUCGCCAUGGGCGUGCCC	599

Tabla 18. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante A514U (equivalente a A600U de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCUUG	600	CCAGCCAAUGGUGAUGGGC	601
585	CCCAUCACCAUUGGCUUG	602	GCCAGCCAAUGGUGAUGGG	603
586	CCAUCACCAUUGGCUUGCA	604	UGCCAGCCAAUGGUGAUGG	605
587	CAUCACCAUUGGCUUGCAC	606	GUGCCAGCCAAUGGUGAUG	607
588	AUCACCAUUGGCUUGCACG	608	CGUGCCAGCCAAUGGUGAU	609
589	UCACCAUUGGCUUGCACGC	610	GCGUGCCAGCCAAUGGUGA	611
590	CACCAUUGGCUUGCACGCC	612	GGCGUGCCAGCCAAUGGUG	613
591	ACCAUUGGCUUGCACGCC	614	GGGCGUGCCAGCCAAUGGU	6125
592	CCAUUGGCUUGCACGCCA	616	UGGGCGUGCCAGCCAAUGG	617
593	CAUUGGCUUGCACGCCAU	618	AUGGGCGUGCCAGCCAAUG	619
594	AUUGGCUUGCACGCCAUG	620	CAUGGGCGUGCCAGCCAAU	621
595	UUGGCUUGCACGCCAUGG	622	CCAUGGGCGUGCCAGCCAA	623
596	UGGCUUGCACGCCAUGGC	624	GCCAUGGGCGUGCCAGCCA	625
597	GGCUUGCACGCCAUGGCG	626	CGCCAUGGGCGUGCCAGCC	627
598	GCUGGACGCCCAUGGCGA	628	UCGCCAUGGGCGUGCCAGC	629
599	CUGGACGCCCAUGGCGAC	630	GUCGCCAUGGGCGUGCCAG	631
600	UGGACGCCCAUGGCGACC	632	GGUCGCCAUGGGCGUGCCA	633

Tabla 19. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante G515A (equivalente a G601A de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAAG	634	CUUGCCAAUGGUGAUGGGC	635
585	CCCAUCACCAUUGGCAAGC	636	GCUUGCCAAUGGUGAUGGG	637
586	CCAUCACCAUUGGCAAGCA	638	UGCUUGCCAAUGGUGAUGG	639
587	CAUCACCAUUGGCAAGCAC	640	GUGCUUGCCAAUGGUGAUG	641
588	AUCACCAUUGGCAAGCACG	642	CGUGCUUGCCAAUGGUGAU	643
589	UCACCAUUGGCAAGCACGC	644	GCGUGCUUGCCAAUGGUGA	645
590	CACCAUUGGCAAGCACGCC	646	GGCGUGCUUGCCAAUGGUG	647
591	ACCAUUGGCAAGCACGCC	648	GGGCGUGCUUGCCAAUGGU	649
592	CCAUUGGCAAGCACGCCA	650	UGGGCGUGCUUGCCAAUGG	651
593	CAUUGGCAAGCACGCCAU	652	AUGGGCGUGCUUGCCAAUG	653
594	AUUGGCAAGCACGCCAUG	654	CAUGGGCGUGCUUGCCAAU	655
595	UUGGCAAGCACGCCAUGG	656	CCAUGGGCGUGCUUGCCAA	657
596	UGGCAAGCACGCCAUGGC	658	GCCAUGGGCGUGCUUGCCA	659
597	GGCAAGCACGCCAUGGCG	660	CGCCAUGGGCGUGCUUGCC	661
598	GCAAGCACGCCAUGGCGA	662	UCGCCAUGGGCGUGCUUGC	663
599	CAAGCACGCCAUGGCGAC	664	GUCGCCAUGGGCGUGCUUG	665
600	AAGCACGCCAUGGCGACC	666	GGUCGCCAUGGGCGUGCUU	667

Tabla 20. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante G515C (equivalente a G601C de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCACG	668	CGUGCCAAUGGUGAUGGGC	669
585	CCCAUCACCAUUGGCACGC	670	GCGUGCCAAUGGUGAUGGG	671
586	CCAUCACCAUUGGCACGCA	672	UGCGUGCCAAUGGUGAUGG	673
587	CAUCACCAUUGGCACGCAC	674	GUGCGUGCCAAUGGUGAUG	675
588	AUCACCAUUGGCACGCACG	676	CGUGCGUGCCAAUGGUGAU	677
589	UCACCAUUGGCACGCACGC	678	GCGUGCGUGCCAAUGGUGA	679
590	CACCAUUGGCACGCACGCC	680	GGCGUGCGUGCCAAUGGUG	681
591	ACCAUUGGCACGCACGCC	682	GGGCGUGCGUGCCAAUGGU	683

ES 2 594 402 T3

592	CCAUUGGCACGCACGCCCA	684	UGGGCGUGCGUGCCAAUGG	685
593	CAUUGGCACGCACGCCCAU	686	AUGGGCGUGCGUGCCAAUG	687
594	AUUGGCACGCACGCCCAUG	688	CAUGGGCGUGCGUGCCAAU	689
595	UUGGCACGCACGCCCAUGG	690	CCAUGGGCGUGCGUGCCAA	691
596	UGGCACGCACGCCCAUGGC	692	GCCAUGGGCGUGCGUGCCA	693
597	GGCACGCACGCCCAUGGCG	694	CGCCAUGGGCGUGCGUGCC	695
598	GCACGCACGCCCAUGGCGA	696	UCGCAUGGGCGUGCGUGC	697
599	CACGCACGCCCAUGGCGAC	698	GUCGCAUGGGCGUGCGUG	699
600	ACGCACGCCCAUGGCGACC	700	GGUCGCAUGGGCGUGCGU	701

Tabla 21. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante G515U (equivalente a G601U de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAUG	702	CAUGCCAAUGGUGAUGGGC	703
585	CCCAUCACCAUUGGCAUGC	704	GCAUGCCAAUGGUGAUGGG	705
586	CCAUCACCAUUGGCAUGCA	706	UGCAUGCCAAUGGUGAUGG	707
587	CAUCACCAUUGGCAUGCAC	708	GUGCAUGCCAAUGGUGAUG	709
588	AUCACCAUUGGCAUGCACG	710	CGUGCAUGCCAAUGGUGAU	711
589	UCACCAUUGGCAUGCACGC	712	GCGUGCAUGCCAAUGGUGA	713
590	CACCAUUGGCAUGCACGCC	714	GGCGUGCAUGCCAAUGGUG	715
591	ACCAUUGGCAUGCACGCC	716	GGGCGUGCAUGCCAAUGGU	717
592	CCAUUGGCAUGCACGCCCA	718	UGGGCGUGCAUGCCAAUGG	719
593	CAUUGGCAUGCACGCCCAU	720	AUGGGCGUGCAUGCCAAUG	721
594	AUUGGCAUGCACGCCCAUG	722	CAUGGGCGUGCAUGCCAAU	723
595	UUGGCAUGCACGCCCAUGG	724	CCAUGGGCGUGCAUGCCAA	725
596	UGGCAUGCACGCCCAUGGC	726	GCCAUGGGCGUGCAUGCCA	727
597	GGCAUGCACGCCCAUGGCG	728	CGCCAUGGGCGUGCAUGCC	729
598	GCAUGCACGCCCAUGGCGA	730	UCGCAUGGGCGUGCAUGC	731
599	CAUGCACGCCCAUGGCGAC	732	GUCGCAUGGGCGUGCAUG	733
600	AUGCACGCCCAUGGCGACC	734	GGUCGCAUGGGCGUGCAU	735

Tabla 22. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante G516C (equivalente a G602C de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAGC	736	GCUGCCAAUGGUGAUGGGC	737
585	CCCAUCACCAUUGGCAGCC	738	GGCUGCCAAUGGUGAUGGG	739
586	CCAUCACCAUUGGCAGCCA	740	UGGCUGCCAAUGGUGAUGG	741
587	CAUCACCAUUGGCAGCCAC	742	GUGGCUGCCAAUGGUGAUG	743
588	AUCACCAUUGGCAGCCACG	744	CGUGGCUGCCAAUGGUGAU	745
589	UCACCAUUGGCAGCCACGC	746	GCGUGGCUGCCAAUGGUGA	747
590	CACCAUUGGCAGCCACGCC	748	GGCGUGGCUGCCAAUGGUG	749
591	ACCAUUGGCAGCCACGCC	750	GGGCGUGGCUGCCAAUGGU	751
592	CCAUUGGCAGCCACGCCCA	752	UGGGCGUGGCUGCCAAUGG	753
593	CAUUGGCAGCCACGCCCAU	754	AUGGGCGUGGCUGCCAAUG	755
594	AUUGGCAGCCACGCCCAUG	756	CAUGGGCGUGGCUGCCAAU	757
595	UUGGCAGCCACGCCCAUGG	758	CCAUGGGCGUGGCUGCCAA	759
596	UGGCAGCCACGCCCAUGGC	760	GCCAUGGGCGUGGCUGCCA	761
597	GGCAGCCACGCCCAUGGCG	762	CGCCAUGGGCGUGGCUGCC	763
598	GCAGCCACGCCCAUGGCGA	764	UCGCCAUGGGCGUGGCUGC	765
599	CAGCCACGCCCAUGGCGAC	766	GUCGCAUGGGCGUGGCUG	767
600	AGCCACGCCCAUGGCGACC	768	GGUCGCAUGGGCGUGGCU	769

Tabla 23. Los ARNci que direccionan IDH2 mutante G516U (equivalente a G602U de la SEQ ID NO: 12 (Figura 22B))

Posición en ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAGU	770	ACUGCCAAUGGUGAUGGGC	771
585	CCCAUCACCAUUGGCAGUC	772	GACUGCCAAUGGUGAUGGG	773
586	CCAUCACCAUUGGCAGUCA	774	UGACUGCCAAUGGUGAUGG	775
587	CAUCACCAUUGGCAGUCAC	776	GUGACUGCCAAUGGUGAUG	777
588	AUCACCAUUGGCAGUCACG	778	CGUGACUGCCAAUGGUGAU	779

589	UCACCAUUGGCAGUCACGC	780	GCGUGACUGCCAAUGGUGA	781
590	CACCAUUGGCAGUCACGCC	782	GGCGUGACUGCCAAUGGUG	783
591	ACCAUUGGCAGUCACGCC	784	GGGCGUGACUGCCAAUGGU	785
592	CCAUUGGCAGUCACGCCCA	786	UGGGCGUGACUGCCAAUGG	787
593	CAUUGGCAGUCACGCCCAU	788	AUGGGCGUGACUGCCAAUG	789
594	AUUGGCAGUCACGCCCAUG	790	CAUGGGCGUGACUGCCAAU	791
595	UUGGCAGUCACGCCCAUGG	792	CCAUGGGCGUGACUGCCAA	793
596	UGGCAGUCACGCCCAUGGC	794	GCCAUGGGCGUGACUGCCA	795
597	GGCAGUCACGCCCAUGGCG	796	CGCCAUGGGCGUGACUGCC	797
598	GACAGUCACGCCCAUGGCGA	798	UCGCCAUGGGCGUGACUGC	799
599	CAGUCACGCCCAUGGCGAC	800	GUCGCCAUGGGCGUGACUG	801
600	AGUCACGCCCAUGGCGACC	802	GGUCGCCAUGGGCGUGACU	803

### Ejemplo 6 análisis estructural de IDH1 mutante R132H

5 Para definir cómo las mutaciones de R132 alteran las propiedades enzimáticas de IDH1, la estructura cristalina de IDH1 mutante R132H enlazada a  $\alpha$ -KG, NADPH y  $\text{Ca}^{2+}$  se resolvió con una resolución de 2,1 Å.

10 La estructura cuaternaria total de la enzima mutante R132H homodimérica adopta la misma conformación competente catalíticamente cerrada (mostrada como un monómero en la Fig. 29A) que ha sido previamente descrita para la enzima de tipo silvestre (Xu, X. y colaboradores. J Biol Chem 279, 33946-57 (2004)). NADPH se posiciona como se esperaba para la transferencia de hidruro a  $\alpha$ -KG en una orientación que produciría R(-)-2HG, consistente con la determinación quiral del producto 2HG.

15 Se observan dos características importantes por el cambio de R132 a histidina: el efecto sobre el equilibrio de la conformación catalítica y la reorganización del sitio activo. Localización en cima de una lámina  $\beta$  en el dominio pequeño relativamente rígido, R132 actúa como un residuo portero y parece orquestar el movimiento de bisagra entre las conformaciones abierta y cerrada. La fracción de guanidinio de R132 oscila desde la conformación abierta hasta la cerrada con una distancia de casi 8 Å. La sustitución de la histidina por arginina es probable que cambie el equilibrio a favor de la conformación cerrada que forma la hendidura catalítica para que el cofactor y el sustrato se enlacen eficientemente, lo que explica parcialmente la alta afinidad por NADPH exhibida por la enzima mutante R132H. Esta característica puede ser ventajosa para la reducción que depende de NADPH de  $\alpha$ -KG hasta R(-)-2HG en un ambiente donde las concentraciones de NADPH son bajas. En segundo lugar, un examen más detallado del bolsillo catalítico de la estructura IDH1 mutante en comparación con la enzima de tipo silvestre mostró no solamente la pérdida esperada de las interacciones puente clave de sal entre el guanidinio de R132 y los carboxilatos  $\alpha$  /  $\beta$  del isocitrato, así como los cambios en la red que coordina al ión metálico, pero también una reorganización inesperada del sitio activo. La mutación por histidina resultó en un cambio significativo en la posición de los residuos altamente conservados Y139 de la subunidad A y K212' de la subunidad B (Fig. 29B), ambos de los cuales se cree que son críticos para la catálisis de esta familia de enzimas (Aktas, DF & Cook, Bioquímica PF 48, 3565-77 (2009)). En particular, la fracción hidroxilo de Y139 ahora ocupa el espacio de la  $\beta$ -carboxilato del isocitrato. Además, un importante reposicionamiento de  $\alpha$ -KG comparado con isocitrato donde el carboxilato distal de  $\alpha$ -KG ahora apunta hacia arriba para hacer nuevos contactos con N96 y se observó S94. En general, esta mutación R132 individual resulta en la formación de un sitio activo distinto en comparación con IDH1 de tipo silvestre IDH1.

### Ejemplo 7 Materiales y métodos

35 Resumen

40 Las mutaciones R132H, R132C, R132L y R132S fueron intriducidas en IDH1 humano mediante técnicas estándar de biología molecular. Líneas de células 293T y de glioblastoma humano U87MG y LN-18 fueron cultivadas en DMEM, 10% de suero bovino fetal. Las células se transfectaron y se seleccionaron utilizando técnicas estándar. Los niveles de expresión de proteína se determinaron mediante análisis de transferencia tipo Western usando un anticuerpo IDHc (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo IDH1 (Proteintech), anticuerpo con etiqueta MYC (Cell Signaling Technology), y anticuerpo IDH2 (Abcam). Los metabolitos se extrajeron a partir de células cultivadas y de muestras de tejidos de acuerdo con ligeras variaciones de un método previamente reportado (Lu, W., Kimball, E. y Rabinowitz, JD J Am Soc Misa Spectrom 17, 37-50 (2006)), utilizando metanol acuoso al 80% (-80°C) y, o bien raspando tejido u homogeneización para romper las células. La actividad enzimática en los lisados celulares se evaluó siguiendo un cambio en la fluorescencia de NADPH con el tiempo en presencia de isocitrato y NADP, o  $\alpha$ -KG y NADPH. Para los ensayos enzimáticos utilizando enzima recombinante IDH1, se produjeron las proteínas en E. coli y se purificaron usando cromatografía de afinidad Ni seguida de cromatografía de exclusión por tamaño Sephacryl S-200. La actividad enzimática de la proteína recombinante IDH1 se evaluó siguiendo un cambio en NADPH absorbancia UV con 340 nm usando un espectrofotómetro de flujo de parada en presencia de isocitrato y NADP o  $\alpha$ -KG y NADPH. Se determinó la quiralidad del 2HG como se describió previamente (Strays, E. A., Jansen, E. E., Verhoeven, N. M. & Jakobs, C. Clin Chem 50, 1391-5 (2004)). Para los estudios de cristalografía, se incubó previamente IDH1 recombinante purificada (R132H) a razón de 10 mg / ml en Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM

durante 60 min con NADPH 10 mM, cloruro de calcio 10 mM, y  $\alpha$ -KG 75 mM. Los cristales se obtuvieron a 20°C por equilibrio de difusión en vapor usando gotas de 3  $\mu$ L 2:1 (proteína:precipitante) contra una solución verdadera de MES 100 mM pH 6,5, 20% de PEG 6000. Se obtuvieron muestras del tumor del paciente después del consentimiento informado como parte de un protocolo de investigación aprobado por el IRB de UCLA. Se obtuvieron muestras de tumor de cerebro después de resección quirúrgica, congelación instantánea en isopentano enfriado por medio de nitrógeno líquido y enfriadas a -80°C. El estado de la mutación IDH1 de cada muestra se determinó usando técnicas estándar de biología molecular como se describió previamente (Yan, H. y colaboradores. *N Engl J Med* 360, 765-73 (2009)). Se extrajeron los metabolitos y se analizaron por LC-MS / MS como se describió anteriormente. Métodos completos se encuentran disponibles en el material complementario.

#### Métodos complementarios

Clonación, expresión y purificación de IDH1 e tipo silvestre y mutantes en *E. coli*. Se adquirió el clon del marco de lectura abierto (ORF) de isocitrato deshidrogenasa 1 humana (ADNc) (IDH1; ref. ID NM\_005896) a través de Invitrogen en pENTR221 (Carlsbad, CA) y Origene Inc. en pCMV6 (Rockville, MD). Para transfectar las células con IDH1 mutante o de tipo silvestre, se utilizaron técnicas de mutagénesis estándar de biología molecular para alterar la secuencia de ADN en el par de bases 395 del ORF en pCMV6 para introducir el cambio en el par de bases de guanina a adenina, lo que resulta en un cambio en el código del amino ácido en la posición 132 de arginina (tipo silvestre) en histidina (mutante; o R132H), y se confirmó por métodos estándar de secuenciación de DNA. Para la transfección de células 293T, se subclonaron IDH1 mutante R132H y de tipo silvestre en pCMV-Sport6 con o sin una etiqueta de Myc-DDK en el terminal carboxilo. Para la generación estable de la línea celular, se utilizaron constructos en pCMV6. Para la expresión en *E. coli*, se amplificó la región de codificación de pENTR221 por PCR usando cebadores diseñados para añadir sitios de restricción en NdeI y XhoI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Se clonó el fragmento resultante en el vector pET41a (EMD Biosciences, Madison, WI) para permitir la expresión en *E. coli* de la proteína etiquetada con His8 en el terminal C. La mutagénesis dirigida al sitio fue realizada en el plásmido pET41a-ICH1 usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange® MultiSite (Stratagene, La Jolla, CA) para cambiar G395 por A, resultando en la mutación de Arg por His. Se introdujeron los mutantes R132C, R132L y R132S en pET41a-ICH1 de una forma análoga.

Se expresaron proteínas mutantes y de tipo silvestre y se purificaron a partir de la cepa Rosetta<sup>MR</sup> de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de la siguiente forma. Se cultivaron las células en LB (20 g / ml de kanamicina) a 37°C con agitación hasta que DO600 alcanzó 0,6. Se cambió la temperatura 18°C y se indujo la expresión de proteína mediante la adición de IPTG hasta una concentración final concentración de 1 mM. Después de 12-16 horas de inducción con IPTG, se resuspendieron las células en regulador de lisis (Tris 20 mM, pH 7,4, 0,1% de Triton X-100, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol) y se rompieron por microfluidización. Se cargó el sobrenadante a 20.000 g en una resina de afinidad de quelato metálico (MCAC) equilibrada con regulador A de la columna de níquel (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, 10% de glicerol) y se lavó a través de 20 volúmenes de columna. La elución de la columna se efectuó mediante un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de 10% hasta 100% de regulador B de columna de níquel (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, imidazol 500 mM, 10% de glicerol) en regulador A de columna de níquel. Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron identificadas por SDS-PAGE, reunidas, y dializadas dos veces contra un exceso de 200 volumen de regulador de filtración en gel (NaCl 200 mM, Tris 50 mM 7,5,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, MnSO<sub>4</sub> 2 mM, 10% de glicerol), luego se concentró hasta 10 ml usando concentradores centrífugos Centricon (Millipore, Billerica, MA). La purificación de los dímeros activos se logró aplicando el eluyente concentrado de la columna MCAC a una columna de Sephacryl S-200 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) equilibrada con regulador de filtración en gel y eluyendo la columna con 20 volúmenes de columna del mismo regulador. Las fracciones correspondientes al tiempo de retención de la proteína dimérica se identificaron mediante SDS-PAGE y se reunieron para almacenamiento a -80°C.

Líneas celulares y cultivo celular. Se cultivaron células 293T en DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) con 10% de suero bovino fetal y se transfectaron usando constructos IDH1 con base en pCMV-6 en placas de 6 pozos con Eugene 6 (Roche) o Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El vector parental pCMV6 (no insertado), IDH1 o pCMV6-ts o pCMV6-R132H fueron transfectados en líneas celulares de glioblastoma humano (U87MG; LN-18 (ATCC, HTB-14 y CRL-2610; respectivamente) cultivadas en DMEM con 10% de suero bovino fetal. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, se trasladaron los cultivos celulares a un medio que contenía sal de sodio G418 en concentraciones ya sea de 500  $\mu$ g / ml (U87MG) o 750  $\mu$ g / ml (LN-18) para seleccionar los transfectantes estables. Se generaron poblaciones combinadas de células resistentes a G418 y se confirmó la expresión ya sea de IDH1 de tipo silvestre o de IDH1 R132 mediante análisis estándar de transferencia tipo Western.

Transferencia tipo Western. Para experimentos de transfección transitoria en células 293, se lisaron células 72 horas después de la transfección con regulador RIPA estándar. Se separaron los lisados mediante SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo de anti-IDHc de cabra (Santa Cruz Biotechnology sc49996) o anticuerpo antietiqueta MYC de conejo- (Cell Signaling Technology # 2278) y luego se detectaron con anticuerpo anticabra de asno conjugado con HRP o anticonejo de cabra conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology SC2004). El anticuerpo IDH1 para confirmar la expresión tanto de IDH1 de tipo silvestre y como

R132H se obtuvo de Proteintech. El anticuerpo monoclonal de ratón IDH2 utilizado fue obtenido de Abcam.

5 Detección de isocitrato,  $\alpha$ -KG, y 2HG en reacciones con enzima purificada por LC-MS/MS. Las reacciones de la enzima realizadas como se describe en el texto se llevaron a cabo hasta su finalización como se juzga por la medición del estado de oxidación de NADPH a 340 nm. Las reacciones se extrajeron con ocho volúmenes de metanol, y se centrifugaron para eliminar la proteína precipitada. El sobrenadante se secó bajo una corriente de nitrógeno y se resuspendió en H<sub>2</sub>O. El análisis se llevó a cabo en un LC-MS/MS API2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La separación y el análisis de las muestras se realizó en una columna de 150 x 2 mm, 4  $\mu$ M Synergi Hydro-RP 80 Å, utilizando un gradiente de regulador A (tributilamina 10 mM, ácido acético 15 mM, metanol al 3% (v/v), en agua) y regulador B (metanol) usando transiciones de MRM.

10 Ensayos enzimáticos con base en lisados celulares. Los lisados de células 293T para medir la actividad enzimática se obtuvieron 48 horas después de la transfección con regulador de lisis M-PER complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después, los lisados fueron sonicados y centrifugados a 12.000 g, se recolectaron los sobrenadantes y se normalizaron para la concentración total de proteína. Para medir la actividad oxidativa IDH, se añadieron 3  $\mu$ g de lisado de proteína a 200  $\mu$ L de una solución de ensayo que contenía regulador Tris-acetato 33 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM, EDTA 0,33 mM,  $\beta$ -NADP 100  $\mu$ M, y diferentes concentraciones de D-(+)-treo-isocitrato. La absorbancia a 340 nm, que refleja la producción de NADPH, fue medida cada 20 segundos durante 30 minutos en un espectrofotómetro SpectraMax 190 (Molecular Devices). Los puntos de datos representan la actividad media de 3 replicas por lisado, promediadas entre 5 puntos de tiempo centrados en cada 5 min. Para medir la actividad reductora de IDH, se añadieron 3  $\mu$ g de lisado de proteína a 200  $\mu$ L de una solución de ensayo que contenía Tris-acetato 33 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 1,3 mM;  $\beta$ -NADPH 25  $\mu$ M, NaHCO<sub>3</sub> 40 mM y  $\alpha$ -KG 0,6 mM. La disminución en la absorbancia a 340 nm con el tiempo fue medida para evaluar el consumo de NADPH, con 3 réplicas por lisado.

25 Ensayos de enzima IDH1 recombinantes. Todas las reacciones fueron realizadas en regulador estándar de reacción de la enzima (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, 10% de glicerol, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y albumina de suero bovino al 0,03% (p/v)). Para determinación de los parámetros cinéticos, se añadió suficiente enzima para producir una reacción lineal durante 1 a 5 segundos. Se controló el progreso de la reacción mediante la observación del estado de reducción del cofactor a 340 nm en un espectrómetro de flujo detenido SFM-400 (BioLogic, Knoxville, TN). Las constantes enzimáticas fueron determinadas utilizando algoritmos de ajustes de la curva para modelos cinéticos estándar con el paquete de software Sigmaplot (Systat Software, San Jose, CA).

35 Determinación de la quiralidad de los productos de reacción de las reacciones enzimáticas y de los tumores. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo hasta la terminación y se extrajeron con metanol como se ha descrito anteriormente, a continuación, se formaron derivados con ácido tartárico enantioméricamente puro antes de la resolución y el análisis por LC-MS/MS. Después de ser secadas completamente, las muestras se resuspendieron en 50 mg/ml de ácido (2R, 3R)-(+)-tartárico en diclorometano:ácido acético (4:1) recientemente preparado y se incubó durante 30 minutos a 75°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se centrifugaron brevemente las muestras a 14.000 g, se secaron bajo una corriente de nitrógeno, y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O. El análisis se llevó a cabo en un LC-MS/MS API200 (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando un flujo isocrático de 90:10 (formiato de amonio 2 mM, pH 3,6; MeOH) en una columna Luna C18 (2) 150 x 2 mm, 5  $\mu$ M. Se detectó 2HG que forma derivados con ácido tartárico utilizando la transición MRM 362,9/146,6 y los siguientes ajustes del instrumento: DP-1, FP-310, EP-4, CE-12, CXP-26. Se realizó de manera similar el análisis del estándar (R)-2HG, mezcla racémica de 2HG, y la biomasa del tumor extraído con metanol (véase también).

45 Condiciones de cristalografía. Los cristales se obtuvieron a 20°C por equilibrado de difusión de vapor usando gotas de 3  $\mu$ L mezcladas 2:1 (proteína: precipitante) en contra una solución verdadera de MES 100 mM pH 6,5, 20% de PEG 6000.

50 Caracterización de la proteína. Se suministraron aproximadamente 90 mg de isocitrato deshidrogenasa citosólica humana (HcIDH) al Xtal Biostructures por Agios. Esta proteína era una forma mutante modificada por ingeniería genética, R132S, con una etiqueta de purificación por afinidad en el terminal C residuo 11 (secuencia SLEHHHHHHHH). El peso molecular monomérico calculado fue de 48,0 kDa y el pI teórico fue 6,50. La proteína, con una concentración aproximadamente de 6 mg / mL, fue almacenada en alícuotas de 1 mL en Tris-Hcl 50 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y 10% de glicerol a -80°C. Como se muestra en la figura 32A, se realizó una SDS-PAGE para probar la pureza de las proteínas y se hizo una transferencia tipo Western anti-histidina para demostrar que la proteína estaba realmente etiquetada con His. Se inyectó una muestra de la proteína en una columna de exclusión por tamaño FPLC para evaluar la pureza de la muestra y para determinar el estado polimérico en solución. La figura 32B es un cromatograma de este corrimiento que muestra un solo pico corriendo con un estimado de 87,6 kDa, lo que sugiere que IDH existe como un dímero a pH 7,4. Antes de la cristalización, se intercambió la proteína Tris-Hcl 20 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM usando concentradores de centrifugación Amicon. En este punto, se concentró también la proteína también hasta aproximadamente 15 mg/mL. A esta concentración de proteína y fuerza iónica, la proteína tendió a formar un nivel detectable de precipitado. Después de centrifugar el precipitado, la solución era estable con ~10 mg/ml a 4°C.

65 Los primeros intentos de cristalización. La estrategia para la obtención de cristales de calidad de difracción se deriva

de las condiciones de la literatura, específicamente "Structures of Human Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-regulatory Mechanism of Activity," Xu, et al. (2005) J.Biol.Chem. 279: 33946-56. En este estudio, se produjeron dos formas cristalinas de la proteína de tipo silvestre HcIDH. Una contenía su "complejo binario", IDH-NADP, que cristalizó a partir de las gotas suspendidas en el grupo de espacio tetragonal  $P4_32_12$ . Las gotas se forman a partir de partes iguales de solución de proteína (15 mg / mL de IDH, NADP 10 mM) y el precipitante consistía de MES 100 mM (pH 6,5) y 12% de PEG 20000. La otra forma cristalina contenía su "complejo cuaternario", IDH-NADP / isocitrato /  $Ca^{2+}$ , que cristalizó en el grupo del espacial monoclinico  $P2_1$  usando MES 100 mM (pH 5,9) y 20% de PEG 6000 como el precipitante. Aquí habían añadido DL-isocitrato 10 mM y cloruro de calcio 10 mM a la solución de la proteína. Los primeros intentos de cristalización del mutante R132S en este estudio se centraron alrededor de estas dos condiciones reportadas, con poca variación. Se enumeran los componentes de la cristalización que podrían ser variadas; se probaron varias combinaciones diferentes de estos componentes en el proceso de selección.

En la solución de proteína:

HcIDH (R132S)	siempre ~10 mg / ml o ~0,2 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	Siempre 20 mM
NaCl	Siempre 100 mM
NADP <sup>+</sup> / NADPH	ausente o NADP <sup>+</sup> 5 mM (no se intentó NADPH)
Ácido DL-isocítico, sal trisódica	ausente o 5 mM
Cloruro de calcio	ausente o 10 mM
En el precipitante:	MES 100 mM (pH 6,5) y 12% de PEG 20000 o MES 100 mM (pH 6,0) y 20% de PEG 6000
Tamaño de gota:	siempre 3 $\mu$ L
Relación de gotas:	2:1, 1:1 o 1:2 (proteína: precipitante)

Después de la formación de las gotas suspendidas, se observó siempre un precipitado lechoso. En la inspección después de 2-4 días a 20°C, la mayoría de las gotas mostró una precipitación densa o una separación de fases. En algunos casos, el precipitado se hundió y fue a partir de este tipo de gotas que crecieron pequeños cristales, por ejemplo, como se muestra en la figura 33.

Optimización de cristal. Una vez que se lograron cristales auténticos, la siguiente etapa fue optimizar las condiciones para obtener cristales más grandes y de forma más regular de IDH- NADP / isocitrato /  $Ca^{2+}$  de una manera oportuna y consistente. La selección óptima se enfocó en variar el pH de 5,7 a 6,2, la concentración de MES de 50 a 200 mM y la concentración de PEG 6000 del 20 a 25%. También, se prepararon gotas más grandes (5-6  $\mu$ L) y se variaron nuevamente las relaciones de gota. Estos intentos fallaron en producir cristales mayores en calidad de difracción, pero reprodujeron los resultados reportados anteriormente. Se observaron o bien un precipitado más denso, una separación de fases oleosa o cristales pequeños.

El uso de  $\alpha$ -cetoglutarato. Concurrente a la optimización de los cristales de isocitrato, se realizaron otras selecciones para obtener cristales de IDH (R132S) complejados con  $\alpha$ -cetoglutarato en su lugar. La solución de proteína fue consistentemente 10 mg / mL de IDH en Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM. Se añadieron a continuación en este orden: NADP 5 mM, ácido  $\alpha$ -cetoglutarico 5 mM (ácido libre, pH equilibrado con NaOH) y cloruro de calcio 10 mM. Se incubó la proteína con estos compuestos durante al menos una hora antes de preparar las gotas. El precipitante fue o bien MES 100 mM (pH 6,5) y 12% de PEG 20.000 o MES 100 mM (pH 6,5) y 20% de PEG 6000. Nuevamente, se observó principalmente precipitación o separación de fase, pero en algunas gotas se formaron cristales pequeños. En el borde de una de las gotas, se formó un solo cristal grande, mostrado más adelante. Este fue el cristal único utilizado en la siguiente determinación de la estructura. La figura 34 muestra el cristal obtenido a partir de una solución de proteína que contenía NADP 5 mM,  $\alpha$ -cetoglutarato 5 mM,  $Ca^{2+}$  10 mM. Precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,5) y 12% de PEG 20.000.

Crio condiciones. Con el fin de enviar el cristal a la fuente de rayos X y protegerlo durante la crio-cristalografía, se requirió de un crio-protector adecuado. El glicerol es ampliamente utilizado y fue la primera escogencia. Se elaboró una crio solución, básicamente como una mezcla del regulador de proteína y solución precipitante más glicerol: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, NADP 5 mM, ácido  $\alpha$ -cetoglutarico 5 mM, cloruro de calcio 10 mM, MES 100 mM (pH 6,5), 12% de PEG 20000 y, o bien 12,5% de glicerol o 25% de glicerol. El cristal se transfirió a la crio solución en dos etapas. Primero, se añadieron 5  $\mu$ L de la solución de glicerol al 12,5% a la gota y se incubó durante 10 minutos, observando el posible rompimiento del cristal. Se removió el líquido de la gota y se añadieron 10  $\mu$ L de la solución de glicerol al 25% en la parte superior del cristal. Nuevamente, se incubó durante 10 minutos, se recolectó en un bucle de nylon y se sumergió en nitrógeno líquido. Se almacenó el cristal sumergido en un vaso dewar de nitrógeno líquido para el transporte.

Recolección y procesamiento de datos. Se montó el cristal congelado en un instrumento de rayos X Rigaku RAXIS IV bajo una corriente de gas nitrógeno a temperaturas cercanas a -170°C. Se recolectó un conjunto de datos a

200°C con el detector de placa de imagen utilizando radiación de longitud de onda de 1,54 Å de una fuente casera anódica de cobre en rotación, oscilaciones 1° y exposiciones durante 10 minutos. La presencia de 25% de glicerol como crioprotector fue suficiente para una congelación adecuada, ya que no se observaron signos de rompimiento del cristal (manchas de división o retículos superpuestos). Se observó un anillo difuso con una resolución de 3,6 Å, muy probablemente causada por la formación de hielo. El patrón de difracción de rayos X mostró planos reticulares claros y separación puntual razonable, aunque el espaciamiento a lo largo de un eje recíproco era bastante pequeño (b = 275,3). Los datos se indexan para una resolución de 2,7 Å en el grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 con HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Se conocen tres estructuras para HclDH, que designan la forma cerrada (1T0L), la forma abierta (1T09 subunidad A) y forma la semiabierta (1T09 subunidad B). Se realizó el reemplazo molecular con el programa CCP4 PHASER (Bailey, 1994) usando únicamente los átomos de proteína de estas tres formas. Únicamente la forma cerrada produjo un resultado de reemplazo molecular éxito con 6 subunidades de proteína en la unidad asimétrica. La celda unitaria contiene aproximadamente 53,8% de disolvente.

Refinación del modelo. Usando el programa CCP4 REFMAC5, se realizó un refinamiento de cuerpo rígido para ajustar cada una de las 6 subunidades IDH en la unidad asimétrica. Esto fue seguido por el refinamiento del cuerpo rígido de los tres dominios en cada subunidad de proteína. El refinamiento restringió utilizando simetría no cristalográfica promediando los pares relacionados de subunidades produjo una estructura inicial con R<sub>crist</sub> de 33% y R<sub>libre</sub> de 42%. El modelo de construcción y el refinamiento del espacio real fueron realizados con el programa de gráficos COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Se calculó un mapa de diferencias y este mostró una fuerte densidad de electrones dentro de la cual se acomodaron manualmente seis copias individuales del ligando NADP y ion calcio con COOT. La densidad para la estructura de α-cetoglutarato fue menos definida y fue ajustada después de que los residuos de proteína del sitio de enlazamiento fueran ajustados usando un mapa que omitir el compuesto 2F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>. Se aplicó una optimización automatizada del gráfico de Ramachandran acoplado con el ajuste manual de la densidad del espacio real para mejorar la geometría total y el ajuste. Una ronda final de refinamiento restringido, con NCS produjo un R<sub>cristal</sub> del 30,1% y R<sub>libre</sub> de 35,2%

a, Å	b, Å	c, Å	α	β	γ	Volumen unitario de celda, Å <sup>3</sup>	Z
116,14	275,30	96,28	90°	90°	90°	3,08 x 10 <sup>6</sup>	24

Grupo de trabajo/grupo de prueba	68.755 / 3,608 (5,0%)
R <sub>cristal</sub>	30,1%
R <sub>libre</sub>	35,2%

Datos de los rayos X y estadísticas de refinamiento para IDH(R132S)-NADP / α-cetoglurato / Ca<sup>2+</sup>

Parámetros del cristal	
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Dimensiones unitarias de la celda	
a, b, c, Å	116.139, 275.297, 96.283
α, β, γ, °	90.0, 90.0, 90.0
Volumen, Å <sup>3</sup>	3,078,440
No. de moléculas de proteína en la unidad asimétrica	6
No. de moléculas de proteína en la celda unitaria, Z	24
Recolección de datos	
Línea del haz	
Fecha de la recolección	25 de abril de 2009
λ, Å	1.5418
Detector	Rigaku Raxis IV
Conjunto de datos (phi), °	200
Resolución, Å	25-2.7 (2.8-2.7)
Reflexiones únicas (N, F > 0)	73,587
Lo completado, %	85.4 (48.4)
</> / σ <sub>i</sub>	9.88 (1.83)
R-fundido	0.109 (0.33)
Redundancia	4.3 (1.8)
Mosaicidad	0.666
Factor B de Wilson	57.9
Factor B de Anisotropía, Å <sup>2</sup>	-1.96
Refinamiento estadístico	
Límite de resolución, Å	20.02-2.70
No. de reflexiones utilizadas para R-trabajo <sup>a</sup> /	68,755 / 3608
Átomos de proteína	19788
Átomos del ligando	348

No. de aguas	357
iones etc.	6
Coefficiente de Matthews. Å <sup>3</sup> / Dalton	2.68
Disolvente, %	53.8
R-trabajo <sup>a</sup> / R-libre <sup>b</sup> , (%)	30.1 / 35.2
Figura de mérito <sup>c</sup>	0.8 (0.74)
Factores B promedio	31.0
Error de coordenadas (gráfica de Luzzati), Å	0.484
Desviaciones R.M.S.	
Longitudes de enlace, Å	0.026
Ángulos de enlace, °	2.86

Ese dan para todos los datos y para los datos en la capa de resolución más alta. Los valores de la capa más alta están entre paréntesis.

- 5 Factor <sup>a</sup>R =  $\sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} F_o$ , donde F<sub>o</sub> y F<sub>c</sub> son las amplitudes observada y calculada del factor de estructura, respectivamente para todas las reflexiones hkl usadas en el refinamiento.

<sup>b</sup>R-libre se calcula para el 5% de los datos que no fueron usados en el refinamiento. <sup>c</sup>Figura de mérito =  $\sqrt{x^2 + y^2}$

- 10  $x = (\sum_{\alpha}^{360} P(\alpha)\cos \alpha) / (\sum_{\alpha}^{360} P(\alpha))$ ,  $y = (\sum_{\alpha}^{360} P(\alpha)\sin \alpha) / (\sum_{\alpha}^{360} P(\alpha))$ , y la probabilidad de fase P(α) = exp(A cos α + B sin α + C cos(2α) + D sin(2α)), donde A, B, C, y D son los coeficientes de Hendrickson-Lattman y α s la fase.

Estereoquímica de IDH α-cetoglutarato/Ca<sup>2+</sup>

Estadísticas de la gráfica de Ramachandran	Número de aminoácidos	% de residuos
Residuos en la mayoría de las regiones favorecidas [A, B, L]	1824	82.2
Residuos en las regiones adicionales permitidas [a, b, l, p]	341	15.4
Residuos en las regiones generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]	38	1.7
Residuos en las regiones no permitidas	17	0.8
Número de residuos que no son de glicina ni de prolina	2220	100
Número de residuos terminales (excluyendo Gly y Pro)	387	
Número de residuos de glicina	198	
Número de residuos de prolina	72	
Número total de residuos	2877	
<G> total - puntuación del factor <sup>d</sup> (> -1.0)	-0.65	

- 15 Generado por PROCHECK (Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) J Appl Crystallogr 26:283-291.)

<sup>d</sup>G-factores para los ángulos dihédricos de la cadena principal y de la cadena secundaria y fuerzas covalentes de la cadena principal (longitudes de enlace y ángulos de enlace). Los valores deben ser idealmente -0,5 o por encima de -1.0.

20

Longitud de onda de radiación, Å	1.54
Resolución, Å (capa exterior)	20-2.70 (2.80-2.70)
Reflexiones únicas	73,587
Lo completado (capa externa)	85.4% (48.4%)
Redundancia (capa externa)	4.3 (1.8)
R-fusión (capa externa)	10.9% (33%)
<I> / < <sub>o</sub> (I)> (capa externa)	9.88 (1.83)

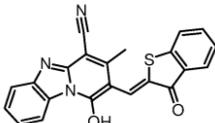
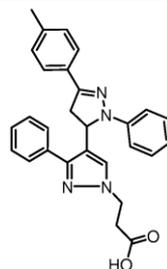
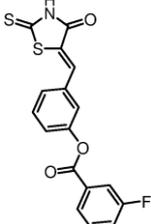
- 25 Especímenes clínicos, extracción y análisis de metabolitos. Los tumores cerebrales humanos fueron obtenidos durante resección quirúrgica, congelación instantánea en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. La clasificación clínica del tejido se realizó mediante la categorización y gradación de la patología clínica estándar como lo estableció la OMS. Se desplegó el análisis de la secuencia genómica para identificar muestras de tumor cerebral que contenían ya sea isocitrato deshidrogenasa de tipo silvestre (IDH1) o mutaciones que alteran al aminoácido 132. Se aisló el ADN genómico a partir de 50-100 mg de tejido de tumor cerebral utilizando métodos estándar. Una reacción en cadena de la polimerasa en el ADN genómico aislado se utilizó para amplificar un fragmento del par de bases 295 del ADN genómico que contiene tanto las secuencias del intrón como del segundo exón de IDH1 humano y se evaluó es estado de la mutación mediante técnicas estándar de biología molecular.
- 30 Se logró la extracción de metabolitos mediante la adición de un volumen 10x (relación m/v) de una mezcla metanol: agua a -80°C (80%:20%) al tejido cerebral (aproximadamente 100 mg) seguido por homogeneización durante 30 s a 4°C. Estos tejidos homogenizados enfriados, extraídos en metanol fueron luego centrifugaron a 14.000 rpm durante

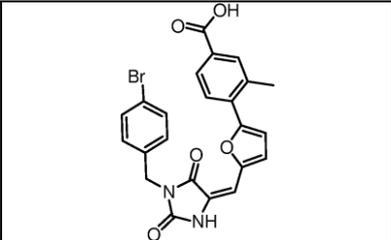
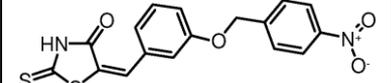
30 minutos para sedimentar los residuos celulares y de tejido y se transfirieron los sobrenadantes de tejido aclarados a un vial de congelador de tapa rosca y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el análisis, se añadió un volumen 2X de tributilamina (10 mM) ácido acético (10 mM), pH 5,5 a las muestras y se analizaron por LCMS la siguiente forma. Se filtraron los extractos de la muestras usando un disco Millex-FG de 0,20 micras y se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyeron utilizando metanol grado LC-MS en gradiente lineal (50%) con tributilamina 10 mM y ácido acético 10 mM) con una rampa de 80% de metanol: tributilamina 10 mM: ácido acético 10 mM durante 6 minutos a 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se detectaron los iones eluidos del metabolito utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición en modo de control de reacción múltiple (de MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación para 8 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxiglutarato (los parámetros de MRM fueron optimizados por infusión previa de estándares conocidos del compuestos). Se procesaron los datos utilizando software Analyst (Applied Biosystems, Inc.) y se obtuvieron las intensidades de señal del metabolito mediante métodos estándar de integración de pico.

### 15 **Ejemplo 9** selección de alto rendimiento (HTS) para inhibidores de IDH1 R132H

Los ensayos se realizaron en un volumen de 76  $\mu\text{L}$  del regulador del ensayo (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM pH 7,5, albúmina de suero bovino al 0,03%) como sigue en una placa estándar de 384 pozos: Para 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de sustrato (NADPH 8  $\mu\text{M}$ ,  $\alpha$ -KG 2 mM), se le añadió 1  $\mu\text{L}$  del compuesto de prueba en DMSO. Se centrifugó brevemente la placa y luego se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de mezcla de la enzima (0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ICDH1 de R132H) seguido por una breve centrifugación y agitación a 100 rpm. Se incubó la reacción durante 50 minutos a temperatura ambiente, luego se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de detección (resazurina 30  $\mu\text{M}$ , 36  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incubó adicionalmente la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. La conversión de resazurina en resorufina se detectó mediante espectroscopia de fluorescencia a Ex544 Em590 c/o 590.

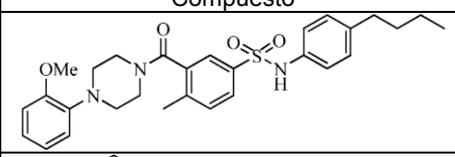
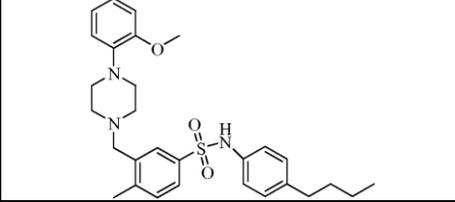
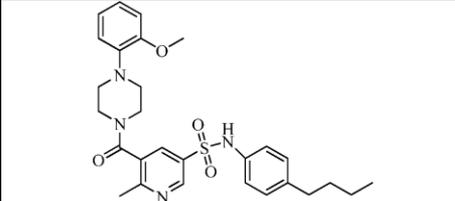
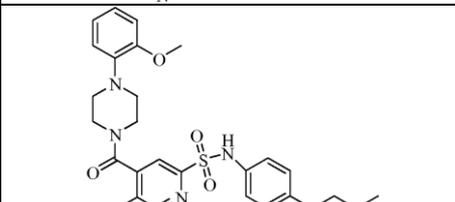
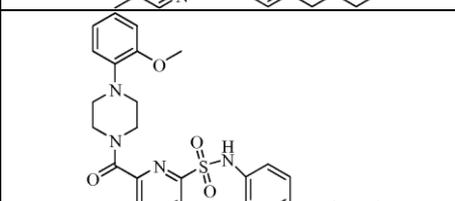
La Tabla 24a muestra el perfil de selectividad de tipo silvestre del mutante de los 5 ejemplos principales de inhibidores IDH1R132H. El ensayo con IDH1 de tipo silvestre se realizó a 1x Km de NADPH por oposición a IDHR132H a 10x o 100x Km de NADPH. El segundo ejemplo no mostró inhibición, incluso con 100  $\mu\text{M}$ . También, el primer ejemplo tiene un  $\text{IC}_{50} = 5,74$   $\mu\text{M}$  pero es desplazado significativamente cuando se ensaya con 100x Km, lo que indica un inhibidor competitivo directo de NADPH. La selectividad entre el tipo silvestre contra el mutante puede ser > 20 veces.

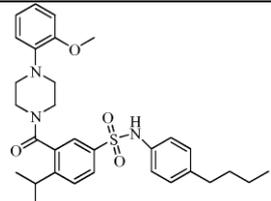
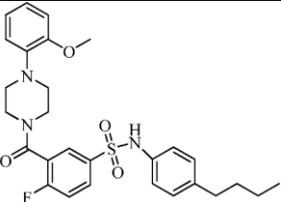
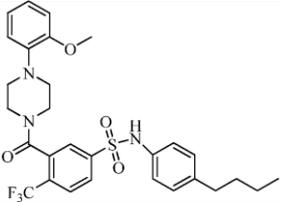
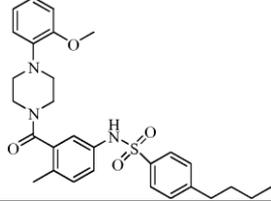
ESTRUCTURA	LDHa $\text{IC}_{50}$	LDHb $\text{IC}_{50}$	ICDH $\text{IC}_{50}$ (uM) @ 4 $\mu\text{M}$ (10x Km) NADPH	ICDH $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) @ 40 $\mu\text{M}$ NADPH	Relación de $\text{IC}_{50}$ (40/4)	IDH1ts $\text{IC}_{50}$ @ 1x Km ( $\mu\text{M}$ )
	25,43	64,07	5,74	>100	17,42	16,22
	5,92	17,40	12,26	41,40	3,38	Sin inhibición
	8,61	>100	12,79	14,70	1,15	19,23

	33,75	>100	14,98	19,17	1,28	46,83
	12,76	>100	23,80	33,16	1,39	69,33

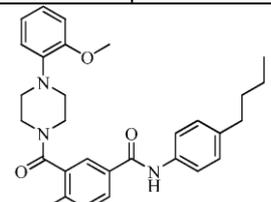
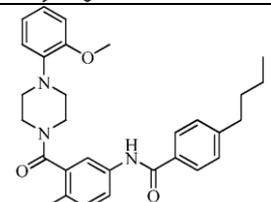
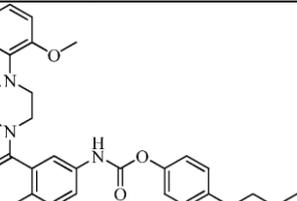
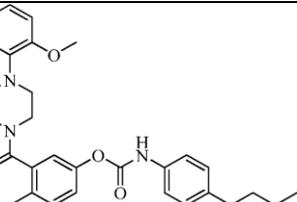
Ejemplos de compuestos adicionales que inhiben a IDH1R132H e proporcionan a continuación en la Tabla 24b.

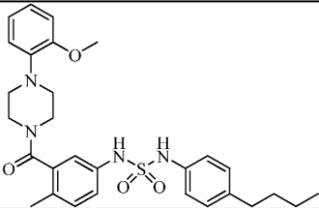
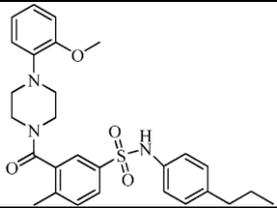
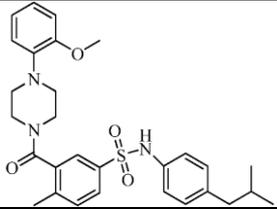
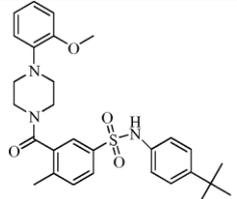
5

Compuesto	No.
	1
	2
	3
	4
	5

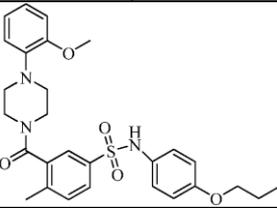
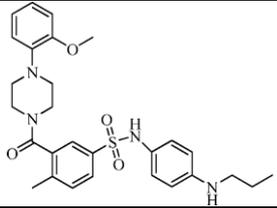
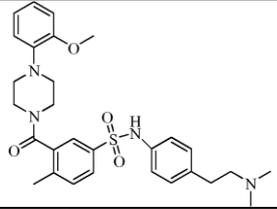
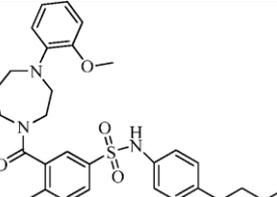
	6
	7
	8
	9

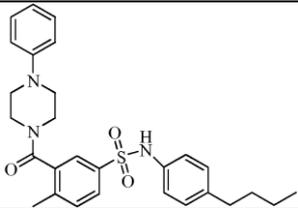
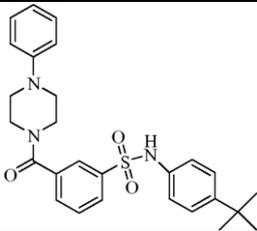
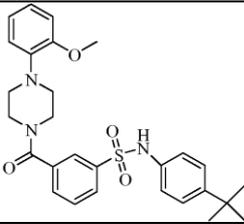
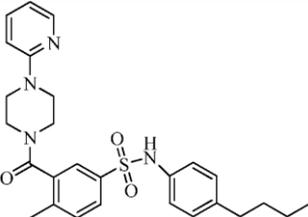
(continuación)

Compuesto	No.
	10
	11
	12
	13

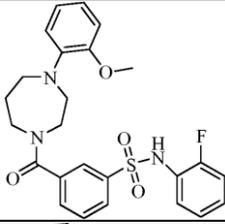
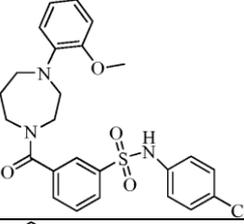
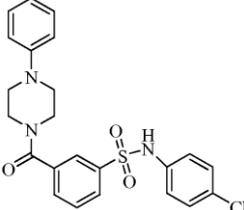
	<p>14</p>
	<p>15</p>
	<p>16</p>
	<p>17</p>

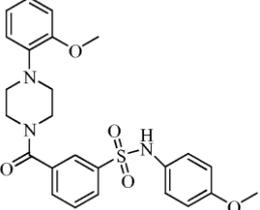
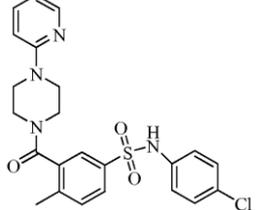
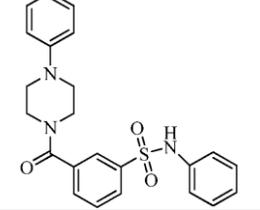
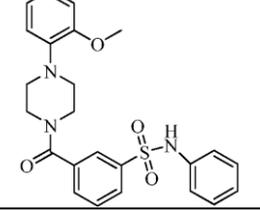
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>18</p>
	<p>19</p>
	<p>20</p>
	<p>21</p>

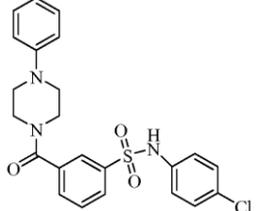
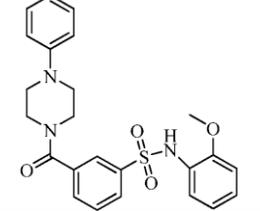
	<p>22</p>
	<p>23</p>
	<p>24</p>
	<p>25</p>

(continuación)

Compuesto	No.
	<p>26</p>
	<p>27</p>
	<p>28</p>

	<p>29</p>
	<p>30</p>
	<p>31</p>
	<p>32</p>

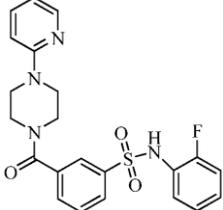
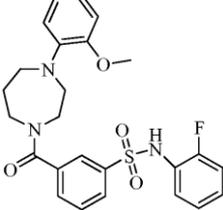
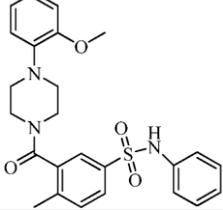
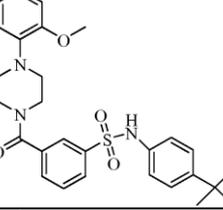
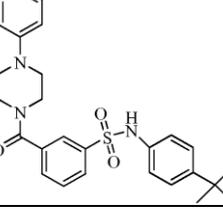
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>33</p>
	<p>34</p>

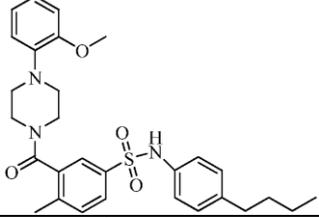
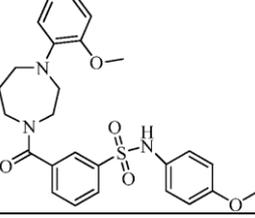
	<p>35</p>
	<p>36</p>
	<p>37</p>
	<p>38</p>
	<p>39</p>

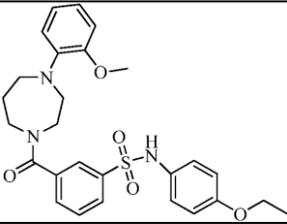
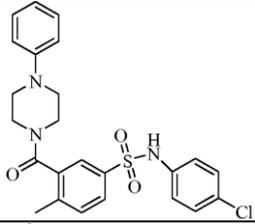
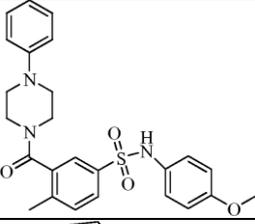
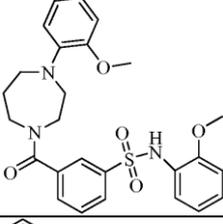
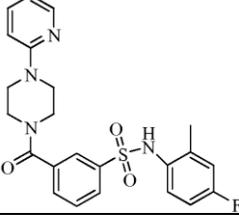
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>40</p>
	<p>41</p>

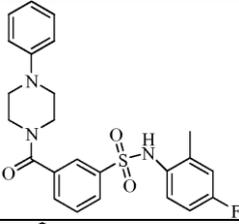
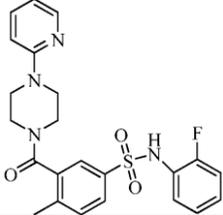
	<p>42</p>
	<p>43</p>
	<p>44</p>
	<p>45</p>
	<p>46</p>

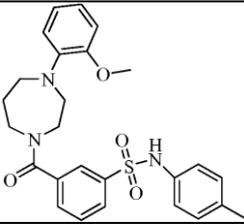
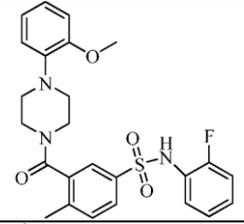
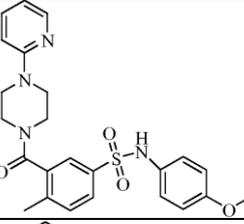
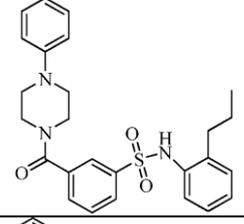
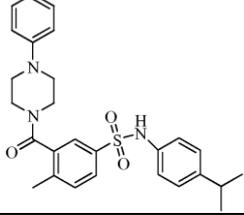
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>47</p>
	<p>48</p>

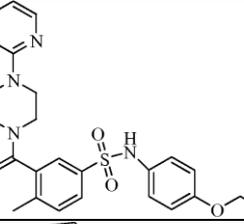
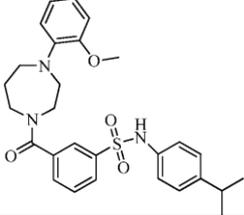
	<p>49</p>
	<p>50</p>
	<p>51</p>
	<p>52</p>
	<p>53</p>

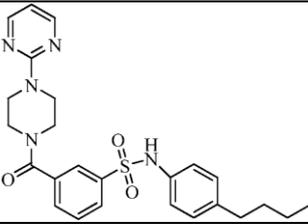
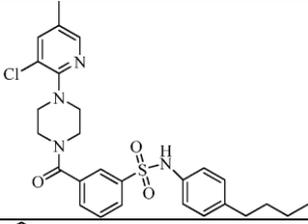
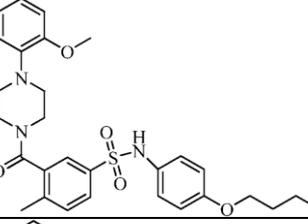
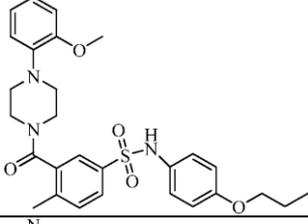
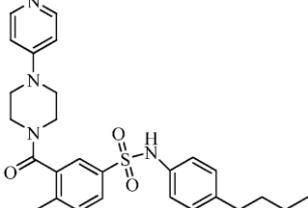
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>54</p>
	<p>55</p>

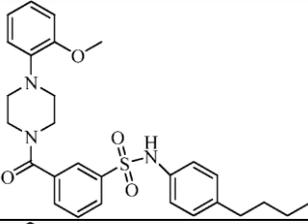
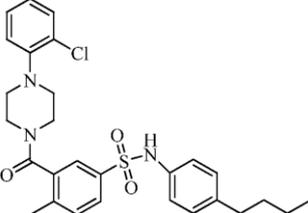
	<p>56</p>
	<p>57</p>
	<p>58</p>
	<p>59</p>
	<p>60</p>

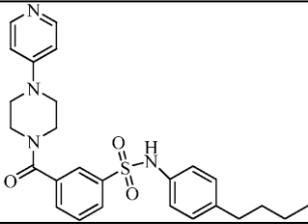
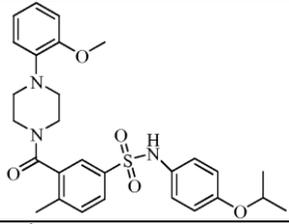
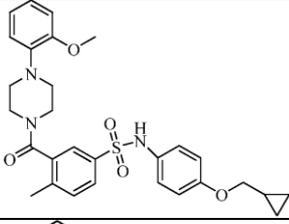
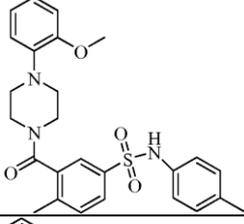
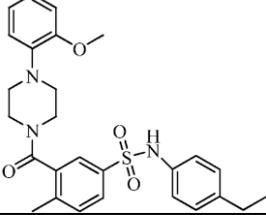
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>61</p>
	<p>62</p>

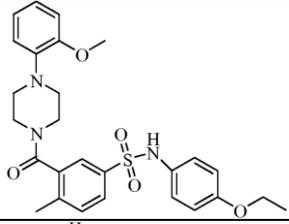
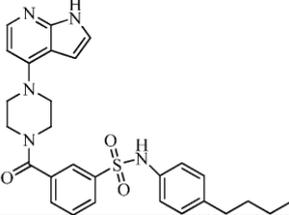
	<p>63</p>
	<p>64</p>
	<p>65</p>
	<p>66</p>
	<p>67</p>

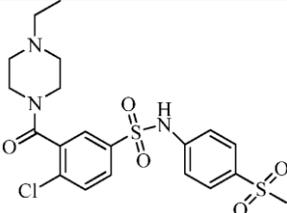
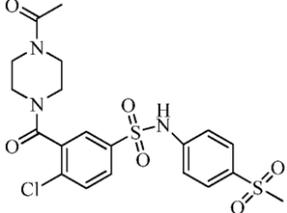
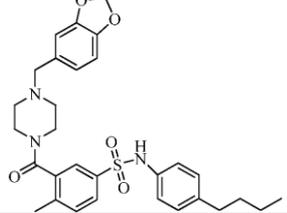
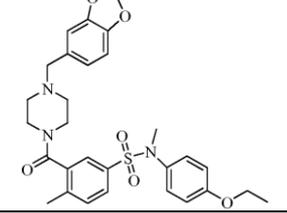
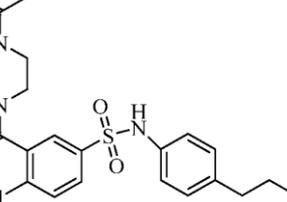
(continuación)

Compuesto	No.
	<p>68</p>
	<p>69</p>

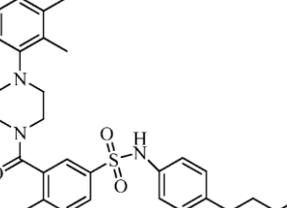
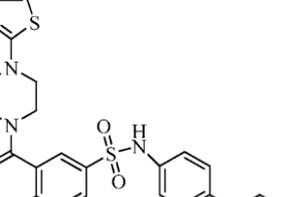
	70
	71
	72
	73
	74

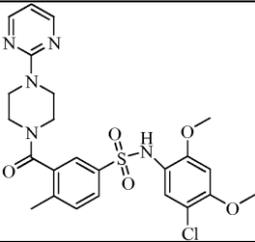
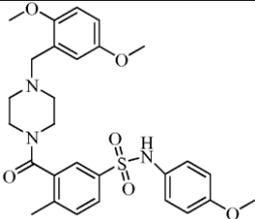
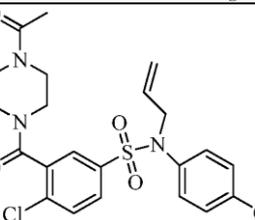
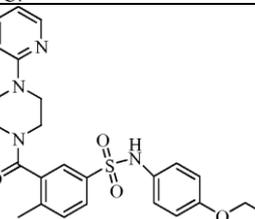
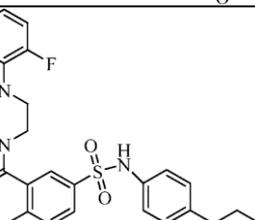
(continuación)

Compuesto	No.
	75
	76

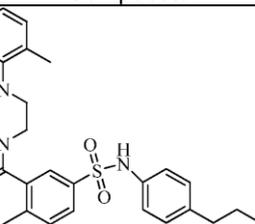
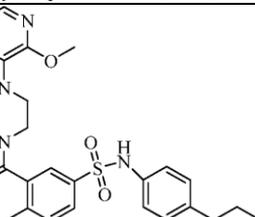
	77
	78
	79
	80
	81

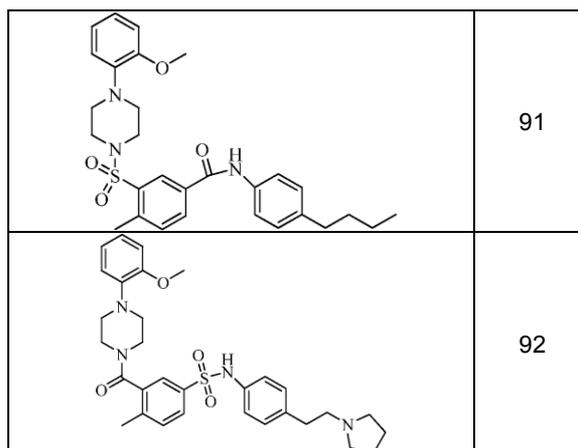
(continuación)

Compuesto	No.
	82
	83

	<p>84</p>
	<p>85</p>
	<p>86</p>
	<p>87</p>
	<p>88</p>

(continuación)

Compuesto	No.
	<p>89</p>
	<p>90</p>



**Ejemplo 10.** La enzima mutante IDH2-R172K tiene una actividad de catálisis reductiva de NADPH levada compara con la enzima de IDH2 de tipo silvestre.

- 5 Se midió la actividad de reducción para las enzimas IDH2-R172K, IDH2 de tipo silvestre, IDH1-R132H y IDH1 de tipo silvestre. Las concentraciones finales de reactivo para cada reacción fueron las siguientes: Tris 20 mM 7,5, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, glicerol al 10%, BSA al 0,03%, enzima (1 a 120 µg / ml), NADPH 1 mM, y α-KG 5 mM (alfa-cetoglutarato). Las actividades específica resultantes (µmol / min / mg) se presentan en la gráfica en la figura 35. Los resultados indican que la IDH2 mutante tienen actividad reductora elevada comparada con la IDH2 de tipo silvestre, aunque tanto las enzimas IDH2 mutantes y de tipo silvestre fueron capaces de elaborar 2HG (2-hidroxiglutarato) con niveles de saturación de los reactantes α-KG y NADPH.

**Ejemplo 11:** 2-HG se acumula en AML con los pacientes y los datos clínicos de las mutaciones IDH1/2

- 15 Se recolectaron sangre periférica y médula ósea de pacientes con AML al momento del diagnóstico y en la recaída, siguiendo el consentimiento informado aprobado REB. Se separaron las células mediante centrifugación Ficol Hypaque, y se almacenó a -150°C en 10% de DMSO, 40% de FCS y 50% de medio alfa-MEM. Se almacenaron los sueros de los pacientes a -80°C. Se realizaron los análisis citogenéticos y molecular en el laboratorio de diagnóstico de la University Health Network (Toronto, Canadá). Un subgrupo de pacientes (n = 132) recibió el tratamiento inicial consistente utilizando una inducción estándar y un régimen de quimioterapia de consolidación que consiste en daunorubicina y citarabina.

Genotipificación de IDH1 e IDH2

- 25 Se extrajo el ADN de células leucémicas y líneas celulares utilizando el kit Puregene de Qiagen (Valencia CA). Para un subconjunto de muestras (n = 96), se extrajo el ARN de células leucémicas usando un kit RNeasy de Qiagen, y se transcribió en forma inversa en ADNc para la genotipificación de IDH1 e IDH2. El genotipo de IDH1 e IDH2 se determinó en el Analitical Genetics Technology Centre in the University Health Network (Toronto, Canadá), utilizando una plataforma Sequenom MassARRAY<sup>MR</sup> (Sequenom, San Diego, CA). Se confirmaron los resultados positivos por secuenciación directa en un analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Líneas celulares

- 35 Se obtuvieron las líneas celulares de AML (OCI / AML-1, la OCI / AML-2, la OCI / AML-3, la OCI / AML-4, la OCI / AML-5, HL-60, MT-4-11, THP-1, K562, y KG1a) y las células 5637 a través del laboratorio de Mark Minden (Ontario Cancer Institute Ontario, Toronto, Canadá). Se cultivaron células primarias de AML en medio alfa-MEM complementado con 20% de suero bovino fetal, y 10% de medio acondicionado con células 5637 como se describió previamente<sup>13</sup>. Se generaron curvas de crecimiento mediante el recuento de células viables como se evaluó por exclusión con azul de tripano en un contador de células automatizado Vi-CELL (Beckman Coulter, Fullarton, CA).

Expresión / purificación de proteínas IDH1 e IDH2

- 45 El ADNc de IDH1 humano (ref. ID NM\_005896) y el ADNc de IDH2 (ref. ID NM\_002168) fueron adquiridos a través de OriGene Technologies (Rockville, MD). Para la expresión en E. coli, se amplificó la región de codificación por PCR usando cebadores diseñados para añadir sitios de restricción NdeI y XhoI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los fragmentos resultantes para IDH1 (longitud completa) e IDH2 (residuos 40-452) fueron clonados en el vector pET41a vector (EMD Biosciences, Madison, WI) para permitir la expresión en E. coli de la proteína etiquetada con His '8 en el terminal C. Se realizó una mutagénesis dirigida al sitio en el plásmido pET41a-

IDH1 y pET41a-IDH2 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® Lightning (Stratagene, La Jolla, CA) para cambiar C394 a T en el ADNc de IDH1, resultado en la mutación R132C, y para cambiar G515 en A en el ADNc de IDH2, resultando en la mutación R172K. Las proteínas IDH1 mutante y de tipo silvestre fueron expresadas en y purificadas a partir de la cepa Rosetta<sup>MR</sup> de E. coli (DE3) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La sobreexpresión de la proteína IDH2 se logró por cotransfección de los plásmidos de expresión que codifican los clones IDH2 respectivos y pG-KJE8 que expresan proteínas chaperonas.

#### Ensayos de actividad de IDH1/2

Se evaluó la actividad enzimática siguiendo el cambio en la absorbancia de NADPH a 340 nm con el tiempo en un espectrofotómetro de flujo detenido SFM-400 (BioLogic, Knoxville, TN) en presencia de isocitrato y NADP<sup>+</sup> (reacción directa), o α-KG y NADPH (reacción inversa). Todas las reacciones se realizaron en regulador estándar de reacción enzimática (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y albumina de suero bovino al 0,03% (p / v)). Para la determinación de los parámetros cinéticos, se añadió suficiente enzima para producir una reacción lineal durante 1 a 5 segundos. Se determinaron las constantes de enlazamiento enzimático utilizando algoritmos de ajuste de la curva para modelos cinéticos estándar con el paquete de software Sigmaplot (Systat Software, San Jose, CA). Para la determinación de kcat, se incubó la enzima con 5X Km de sustrato y cofactor; se determinó el consumo de NADPH o NADP mediante un cambio en la OD<sub>340</sub> en el tiempo. En ambos casos, se usó un coeficiente de extinción de 6200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para NADPH.

#### Análisis de 2-HG y de los metabolitos

Se extrajeron los metabolitos de las células cultivadas, de células leucémicas primarias, y de sueros utilizando metanol acuoso al 80% (-80°C) como se describió previamente. Para la extracción de células, se descongelaron rápidamente biopsias congeladas a 37°C, y se centrifugó una alícuota de 2 millones de células a 4°C. Se resuspendió el precipitado en metanol al 80% a -80°C. Para la extracción del suero, se descongeló rápidamente 1 ml de suero y se mezcló con 4 ml de metanol a -80°C. Se centrifugaron todos los extractos a 13.000 rpm a 4°C para remover el precipitado, se secó a temperatura ambiente, y se almacenó a -80°C hasta el análisis por LC-MS. Se determinaron los niveles de metabolitos (2-HG, α-KG, succinato, fumarato, y malato) mediante LC de fase inversa de iones apareados acoplada a un MS de triple cuadrupolo de electroaspersión en modo negativo usando control de la reacción múltiple, y se compararon los picos de elución integrados con curvas estándar de metabolitos para cuantificación absoluta como se describió.

#### Análisis estadístico

Se utilizó una prueba exacta de Fisher para evaluar las diferencias en las variables categóricas entre IDH1 / 2 de tipo silvestre e IDH1 / 2 mutante de los pacientes. Se usó un ANOVA de una sola vía seguido por la prueba t de Student con corrección para comparaciones múltiples para analizar las diferencias en la actividad de IDH1 y las concentraciones de metabolitos. Las diferencias con p <0,05 se fueron consideradas significativas.

#### Resultados

Con el fin de investigar el papel de las mutaciones IDH1 R132 en AML, se realizaron genotipificaciones de las células leucémicas obtenidas en la presentación inicial, de una serie de 145 pacientes con AML tratados en el Princess Margaret Hospital, con el animo de identificar las muestras mutantes en nuestro banco de tejidos de células viables. Se encontraron mutaciones heterocigotas IDH1 R132 en 11 (8%) de estos pacientes (Tabla 25). El espectro de mutaciones IDH1 observado en AML parece diferir el aquel observado en tumores del SNC. En el SNC, la mayoría de las mutaciones (80-90%) son sustituciones de IDH1 R132H, mientras que se observaron 5, 4, y 2 pacientes con mutaciones IDH1 R132H, R132C, y R132G, respectivamente (Tabla 25). En cuatro casos, las células leucémicas también estaban disponibles a partir de muestras tomadas al momento de recaída. Se retuvo la mutación IDH1 en 4/4 de estas muestras (Tabla 25). Uno de los pacientes portadores de una mutación IDH1 habían progresado hasta AML a partir de un síndrome mielodisplásico temprano (MDS). Cuando las células del MDS previo en este paciente fueron analizadas se encontró que IDH1 era de tipo silvestre. Se realizó la genotipificación de 14 pacientes adicionales con MDS, y se encontró que todos los pacientes eran de tipo silvestre para IDH1, lo que sugiere que las mutaciones IDH1 no son una característica común de esta enfermedad. En muestras de un subconjunto de pacientes con IDH1 mutante (n = 8), se utilizó ARN transcrito en forma inversa para la genotipificación con el fin de evaluar la expresión relativa de los alelos mutantes y de tipo silvestre. La genotipificación con Sequenom mostró picos de alelos equilibrados para estas muestras, indicando que tanto los genes de tipo silvestre como los mutantes se expresaron. Se genotipificaron también diez líneas celulares establecidas de AML (OCI / AML-1, la OCI / AML-2, la OCI / AML-3, la OCI / AML-4, la OCI / 5 de AML, HL-60, MT-4-11, THP -1, K562, y KG1A) y ninguna portaba a una mutación IDH1 R132.

Tabla 25: Identificación de 13 pacientes con AML que portan una mutación IDH1 R132 o IDH2 R172 \*

Tabla 25							
ID del	Mutación	Cambio de	Subtipo	Estado de	Perfil citogenético	Genotipo	Nivel de 2-HG

paciente	aminoácido	de FAB	NPM1 y FLT3	con recaída	(ng/2x10 <sup>6</sup> células)		
<b>Mutaciones IDH1</b>							
Ser90108	G/A	R132H	M4	n/a	Normal	n/a	2090
Ser90356	G/A	R132H	n/a	n/a	n/a	n/a	1529
0034	C/T	R132C	M5a	Normal	Normal	n/a	10285
0086	C/G	R132G	M2	Normal	Normal	n/a	10470
0488	C/T	R132C	M0	Normal	Normal	R132E	13822
8587	G/A	R132H	n/a	Normal	Normal	n/a	5742
8765	C/T	R132C	M1	n/a	Normal	n/a	7217
8741	G/A	R132H	M4	NPM1	Normal	R132H	6419
9544	C/G	R132G	n/a	n/a	Normal	R132G	4962
0174268	G/A	R132H	M1	NPM1	Normal	5132H	8464
090148	C/T	R132C	M1	n/a	46, xx, l(7)(p10)[20]	n/a	n/a
<b>Mutaciones IDH2</b>							
9382	G/A	R172K	M0	Normal	Normal	n/a	19247
0831	G/A	R172K	M1	Normal	Normal	n/a	15877

\*NPM1 denota nucleofosmina 1 y tirosina quinasa 3 relacionada con FLT FMS. n/a indica que algunos datos no están disponibles para algunos pacientes

5 Se preparó un ensayo de cribado para medir metabolito 2-HG en este conjunto de muestras de AML. Los niveles de 2-HG fueron aproximadamente 50 veces mayores en las muestras que albergan una mutación IDH1 R132 (Tabla 25, Figura 36A, Tabla 26). 2-HG también fue elevado en los sueros de pacientes de AML con IDH1 R132 mutante (Figura 36B). No hubo relación entre la sustitución de aminoácidos específica en el residuo 132 de IDH1 y el nivel de 2-HG en este grupo de pacientes.

10 Tabla 26. Concentraciones de metabolito en células de AML de tipo silvestre y mutante IDH1/2 individuales\*

Muestra	Genotipo de IDH1/2	2-HG (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	α-KG (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Malato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Fumarato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Succinato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)
0034	R132C	10285	125	192	239	2651
0086	R132G	10470	124	258	229	3043
0488	R132C	13822	95	184	193	2671
8587	R132H	5742	108	97	95	1409
8665	R132C	7217	137	118	120	1648
8741	R132H	6419	87	66	61	938
9544	R132G	4962	95	76	72	1199
0174268	R132H	8464	213	323	318	2287
090356	R132H	1529	138	657	366	1462
090108	R132H	2090	n/a	246	941	3560
090148†‡	R132C	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
8741‡	R132H	2890	131	113	106	1509
9554‡	R132G	7448	115	208	227	2658
0174268‡	R132H	964	72	134	138	2242
0488‡	R132C	7511	85	289	310	3448
9382	R172K	19247	790	821	766	5481
0831	R172K	15877	350	721	708	5144

(continuación)

Muestra	Genotipo de IDH1/2	2-HG (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	α-KG (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Malato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Fumarato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)	Succinato (ng/2x10 <sup>6</sup> células)
157	Tipo silvestre	212	121	484	437	3057
202	Tipo silvestre	121	57	161	136	1443
205	Tipo silvestre	147	39	162	153	1011
209	Tipo silvestre	124	111	167	168	1610
239	Tipo silvestre	112	106	305	361	1436
277	Tipo silvestre	157	61	257	257	2029
291	Tipo silvestre	113	118	124	128	1240
313	Tipo silvestre	116	75	151	181	1541
090158	Tipo silvestre	411	217	658	647	3202
090156	Tipo silvestre	407	500	1276	1275	6091

\* IDH1/2 denota isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, 2-HG, 2-hidroxiglutarato, y  $\alpha$ -KG (alfa-cetoglutarato). Las mediciones de metabolitos no estaban disponibles para todos los pacientes.

5 † las mediciones metabólicas no se hicieron debido a la muestra limitada del paciente.

‡ indica muestras obtenidas en la recaída.

10 Dos muestras que albergan IDH1 de tipo silvestre también mostraron altos niveles de 2-HG (Tabla 25). La alta concentración de 2-HG impulsó la secuenciación del gen IDH2 en estas dos muestras de AML, que estableció la presencia de mutaciones IDH2 R172K en ambas muestras (Tabla 25).

15 Evaluación de las características clínicas de los pacientes con o sin mutaciones IDH1/2 reveló una correlación significativa entre mutaciones IDH1/2 y el cariotipo normal ( $p = 0,05$ ), pero no otras diferencias entre estos dos grupos (Tabla 27). En particular, no hubo diferencia en la respuesta al tratamiento para un subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento consistente ( $n = 136$ ). Estos resultados son consistentes con el informe inicial de la identificación de mutaciones IDH1 en AML.

Tabla 27: Características de pacientes con IDH1/2 mutante y de tipo silvestre\*

Variable	IDH1/2 de tipo silvestre (N = 132)	IDH1/2 mutante (N = 13)	Valor P
Edad (años)	58,8 $\pm$ 16,2	52,6 $\pm$ 7,0	0,17†
Sexo (% de machos)	53 (70/132)	62 (8/13)	0,77‡
WVC con diagnóstico ( $10^9$ células/L)	40,7 $\pm$ 50,6	28,7 $\pm$ 34,1	0,38†
Respuesta al tratamiento inicial	70 (85/122)	62 (8/13)	0,54‡
(% de remisión completa)			
Perfil citogenético (%normal)	62 (72/117)	92 (11/12)	0,05‡
Mutaciones adicionales			
FLT3 (%)	17 (8/47)	0 (0/8)	0,58‡
NPM1 (%)	30 (14/47)	25 (2/8)	1,0‡

20 \*Para valores más-menos, el valor indica la media, y  $\pm$  indica la desviación estándar. IDH1/2 denota isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, WBC recuento de glóbulos blancos, FLT3 tirosina quinasa 3 relacionada con FMS, y NPM1 nucleofosmina 1.

25 † El valor P se calculó utilizando la prueba t de Student.

‡ El valor P se calculó utilizando la prueba exacta de Fisher.

30 Los paneles de células de AML de pacientes con IDH1 de tipo silvestre y mutante se cultivaron in vitro. No hubo diferencia en las tasas de crecimiento o viabilidad de las células mutantes y de tipo silvestre IDH1 R132, con ambos grupos que muestran una alta variabilidad en su capacidad para proliferar en cultivo, como es característico de las células de AML primarias (Figura 36C). No hubo relación entre los niveles de 2-HG en las células mutantes IDH1 R132 y su tasa de crecimiento o la viabilidad en cultivo. Después de 14 días en cultivo, las células de AML mutantes retuvieron sus mutaciones IDH1 R132 (11/11), y continuaron acumulando altos niveles de 2-HG (Figura 36A), lo que confirma, además, que las mutaciones IDH1 R132 conducen a la producción y acumulación de 2 -HG en las células de AML.

35 Para investigar el efecto de las mutaciones IDH1/2 sobre la concentración de metabolitos celulares proximales para la reacción IDH, se midieron los niveles de  $\alpha$ -KG, succinato, malato, y fumarato en células de AML con mutaciones IDH1/2 y en un conjunto de células de AML de tipo silvestre emparejados para el subtipo de AML y el perfil citogenético. No se encontró ninguno de los metabolitos fuera alterado en gran medida en los mutantes IDH1 en comparación con las células de tipo silvestre IDH1 (Figura 27, que complementa la Tabla 26). El nivel medio de  $\alpha$ -KG no fue alterado en las células de AML mutantes IDH1/2, lo que sugiere que la mutación no disminuye la concentración de este metabolito como se había planteado la hipótesis anteriormente.

40 Para confirmar que la mutación R132C de IDH1, y la mutación R172K de IDH2 confieren una actividad enzimática novedosa que produce 2-HG, se ensayaron enzimas mutantes recombinantes con respecto a la reducción dependiente de NADPH de  $\alpha$ -KG. Cuando se analizaron las muestras por LC-MS tras la terminación del ensayo de la enzima, se identificó a 2-HG como el producto final, tanto para las enzimas mutantes IDH1 R132C como IDH2 R172K (Figura 38). No se pudo detectar isocitrato por LC-MS, lo que indica que 2-HG es el único producto de esta reacción (Figura 38). Esta observación se mantuvo como verdadera incluso cuando la reacción de reducción se

llevó a cabo en un regulador que contenía  $\text{NaHCO}_3$  saturado de  $\text{CO}_2$ .

5 Una gran proporción de pacientes IDH1 mutantes en la AML tiene una mutación IDH1 R132C (Tabla 25). Con el fin de caracterizar bioquímicamente a IDH1 R132C mutante, se evaluaron las propiedades enzimáticas de la proteína recombinante R132C in vitro. El análisis cinético mostró que la sustitución de R132C perjudica gravemente la descarboxilación oxidativa del isocitrato en  $\alpha$ -KG, con una disminución significativa en  $k_{\text{cat}}$ , a pesar de que la afinidad por el cofactor NADP+ permanece esencialmente sin cambios (Tabla 28). Sin embargo, a diferencia de la enzima mutante R132H descrita previamente, la mutación R132C conduce a una dramática pérdida de afinidad por el isocitrato ( $K_M$ ), y una caída en la eficiencia neta del metabolismo de isocitrato ( $k_{\text{cat}} / K_M$ ) de más de seis órdenes de magnitud (Tabla 28). Esto sugiere una diferencia de potencial en la regulación del nivel de sustrato de la actividad enzimática en el contexto de AML. Aunque la sustitución de cisteína en R132 inactiva la conversión canónica de isocitrato en  $\alpha$ -KG, la enzima mutante IDH1 R132C adquiere la capacidad de catalizar la reducción de  $\alpha$ -KG en 2-HG en una forma dependiente de NADPH (Figura 39). Esta reacción reductora del mutante IDH1 R132C es altamente eficiente ( $k_{\text{cat}} / K_M$ ) en comparación con la enzima de tipo silvestre, debido al considerable aumento de la afinidad de enlazamiento tanto de los sustratos NADPH como  $\alpha$ -KG ( $K_M$ ) (Tabla 28).

Tabla 28: Parámetros cinéticos de la enzima mutante IDH1 R132C

Oxidativo (-> NADPH)	TS	R132C
$K_M, \text{NADP}^+ (\mu\text{M})$	49	21
$K_M, \text{isocitrato} (\mu\text{M})$	57	$8,7 \times 10^4$
$K_M, \text{MgCl}_2 (\mu\text{M})$	29	$4,5 \times 10^2$
$K_i, \alpha\text{-KG} (\mu\text{M})$	$6,1 \times 10^2$	61
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$1,3 \times 10^5$	$7,1 \times 10^2$
$k_{\text{cat}} / K_M, \text{isocitrato} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$2,3 \times 10^9$	$8,2 \times 10^3$
Reductiva (-> NADPH)	TS	R132C
$K_M, \text{NADPH} (\mu\text{M})$	n/a*	0,3
$K_i, \alpha\text{-KG} (\mu\text{M})$	n/a	295
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	~7 (est.)	$5,5 \times 10^2$

\*n/a indica que no hay actividad medible

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método in vitro de evaluación de un sujeto con aciduria 2-hidroxi-glutárica, comprendiendo el método determinar si el sujeto tiene una mutación de isocitrato deshidrogenasa (IDH) que tiene la capacidad de convertir  $\alpha$ -cetoglutarato en 2-hidroxi-glutarato (2HG).
2. El método in vitro de la reivindicación 1, en donde la mutación es una mutación IDH2.
- 10 3. El método in vitro de la reivindicación 1 o 2, en donde la mutación IDH2 es IDH2R172K, IDH2R172M, IDH2R172S, IDH2R172G, o IDH2R172W.





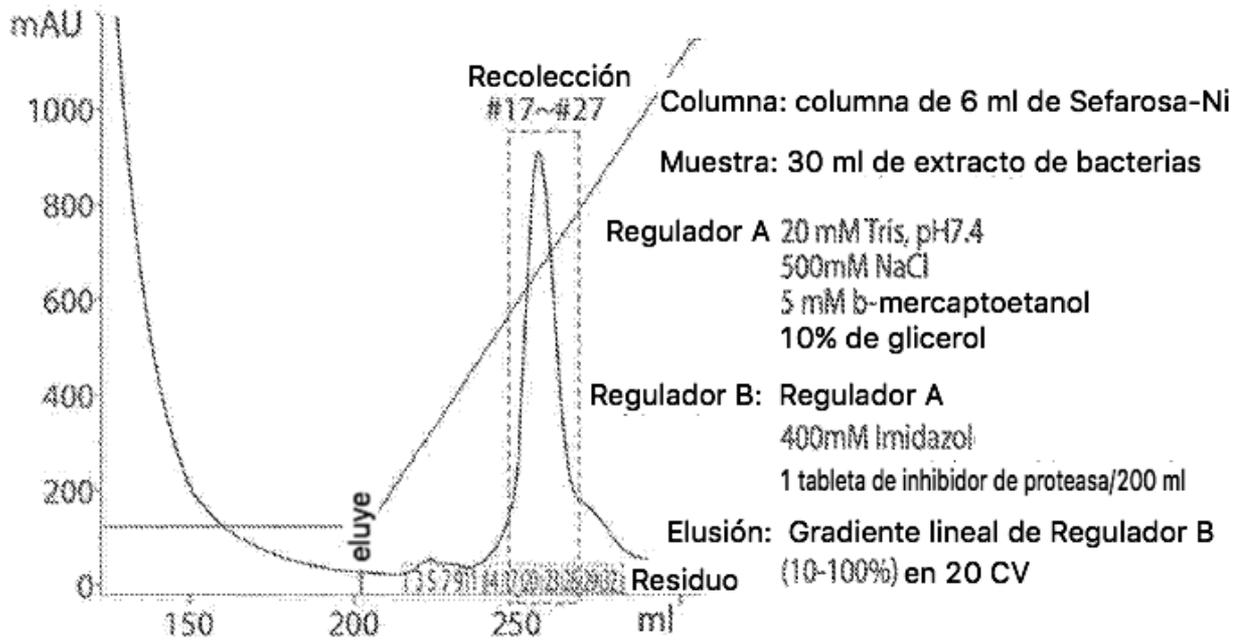


Fig. 3

M T I S L 17 18 19 20 21 M 22 23 24 25 26 27



Fig. 4

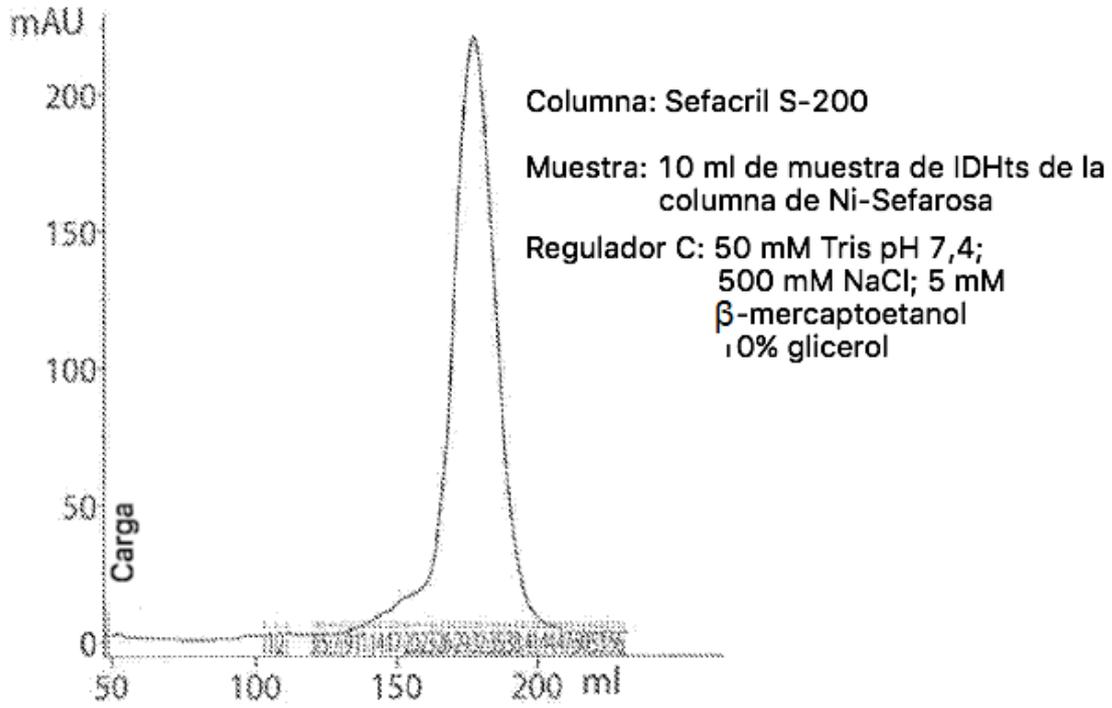


Fig. 5A



Fig. 5B

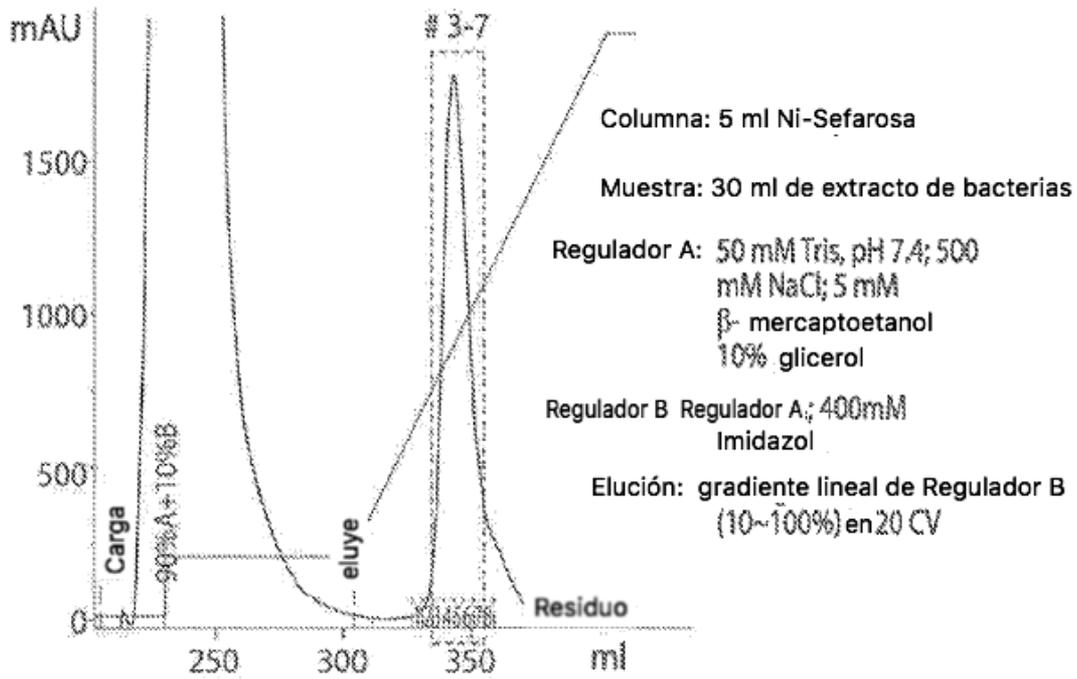


Fig. 6

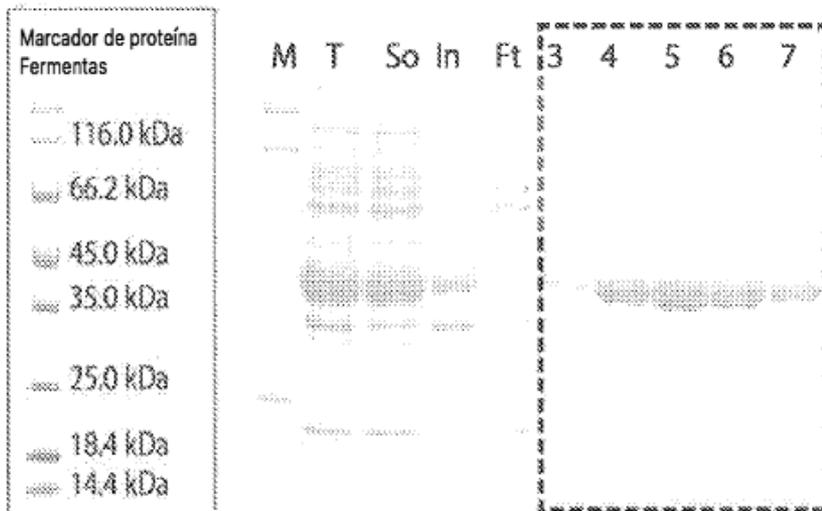


Fig. 7

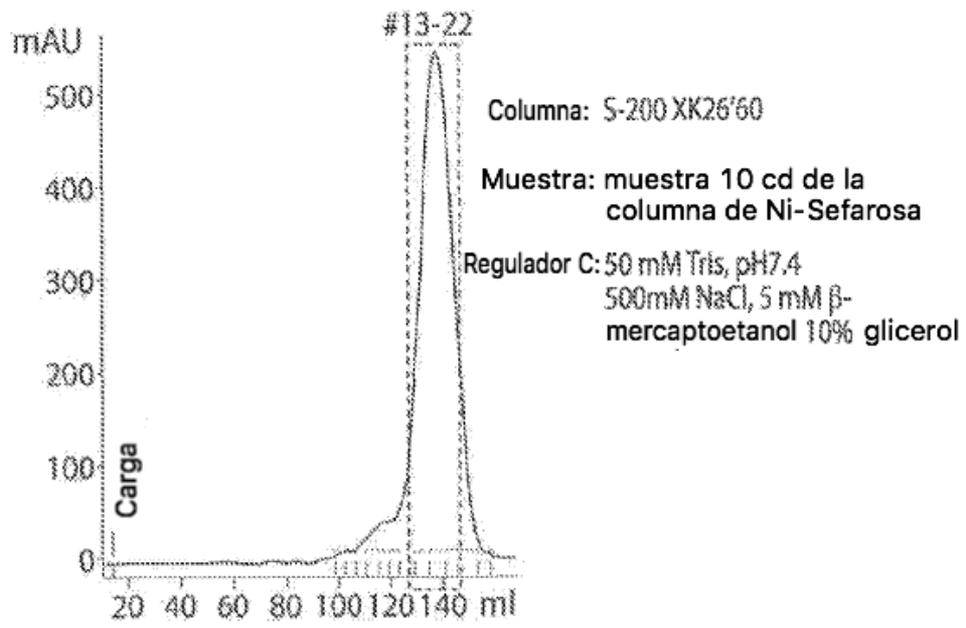


Fig. 8A



Fig. 8B

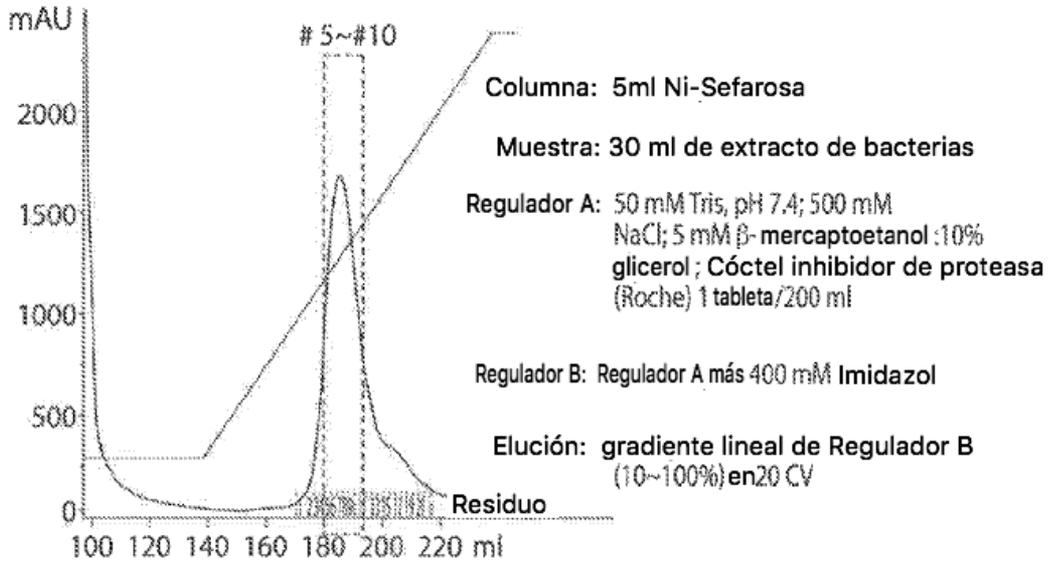


Fig. 9

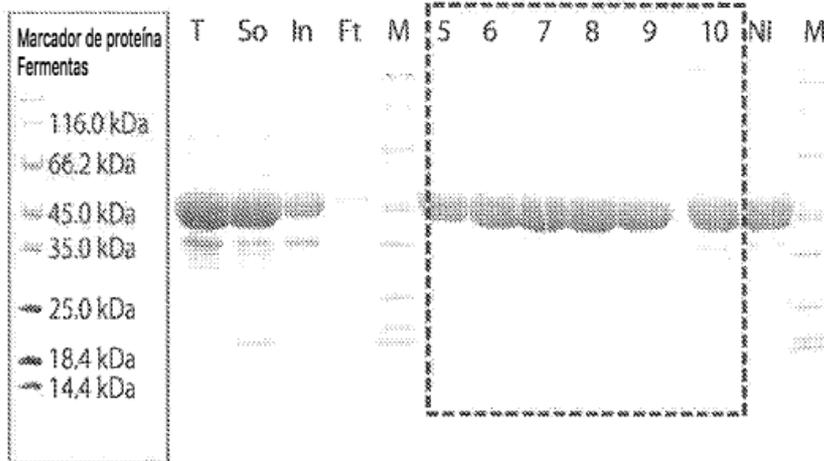


Fig. 10

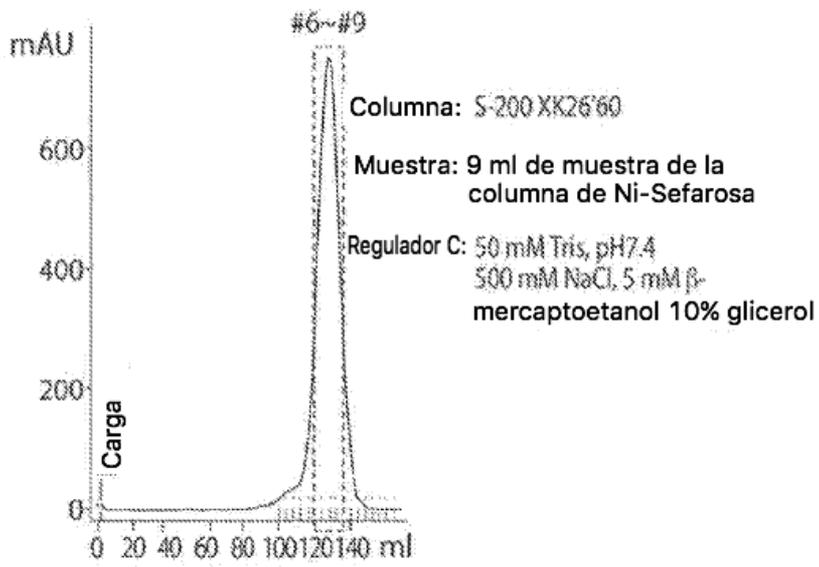


Fig. 11A



Fig. 11B

ICDH1 de tipo silvestre  
reacción directa

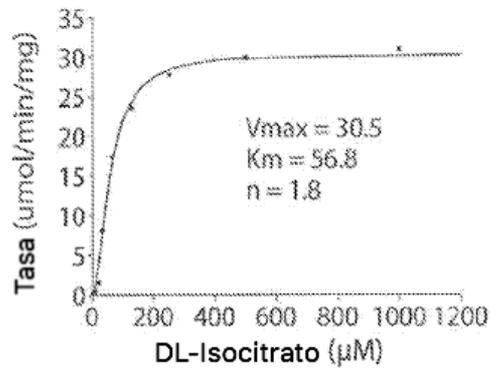


Fig. 12A

IDH1 R132H

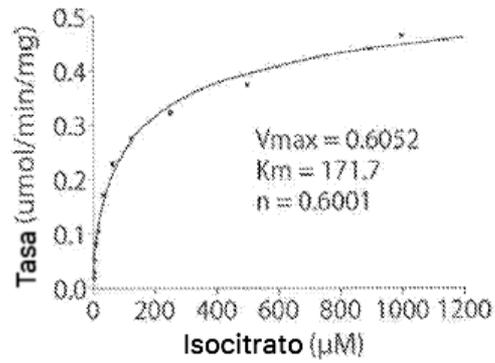


Fig. 12B

ICDH1 R132S

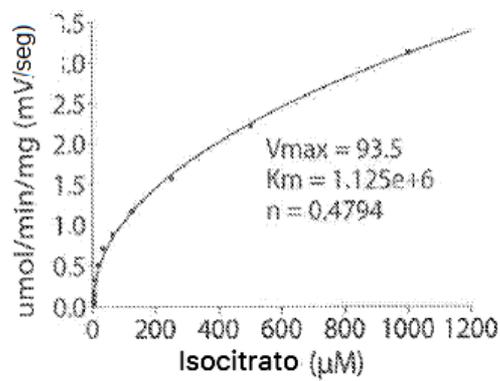


Fig. 12C

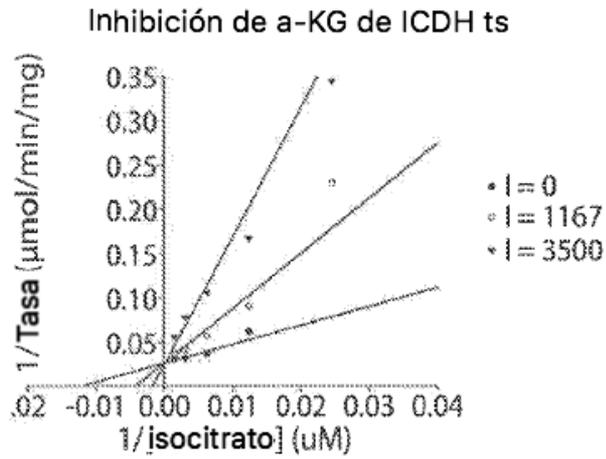


Fig. 13A

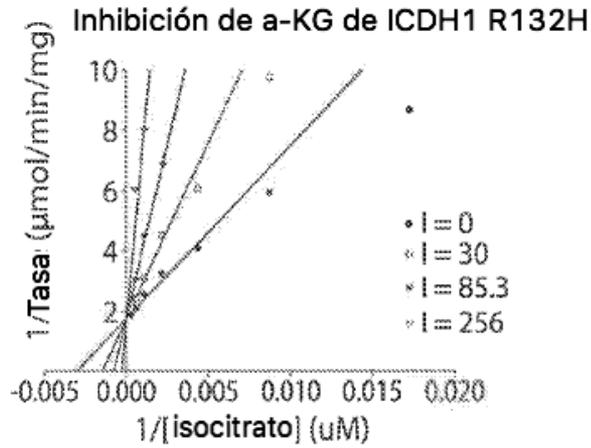


Fig. 13B

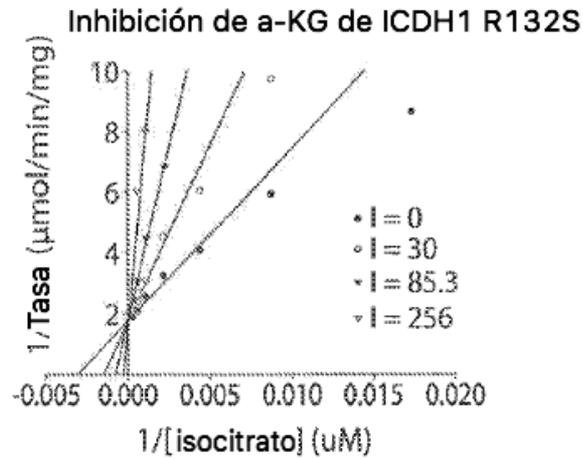
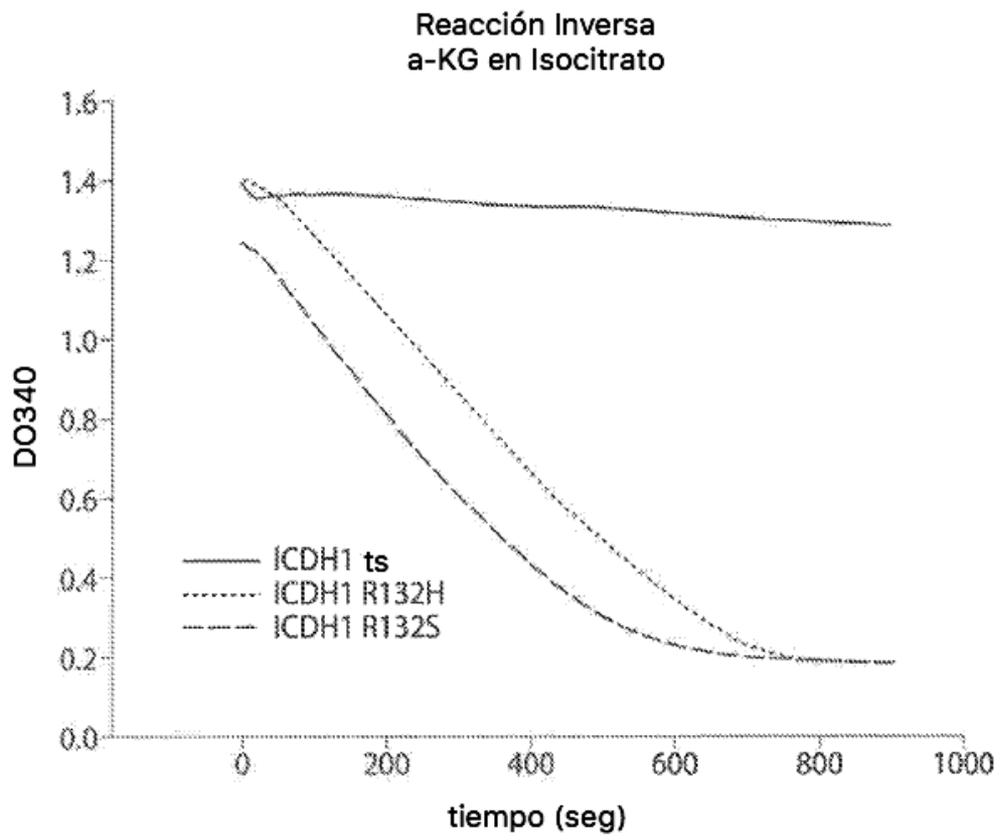


Fig. 13C



**Fig. 14**

ICDH R132H  
Reacción Inversa

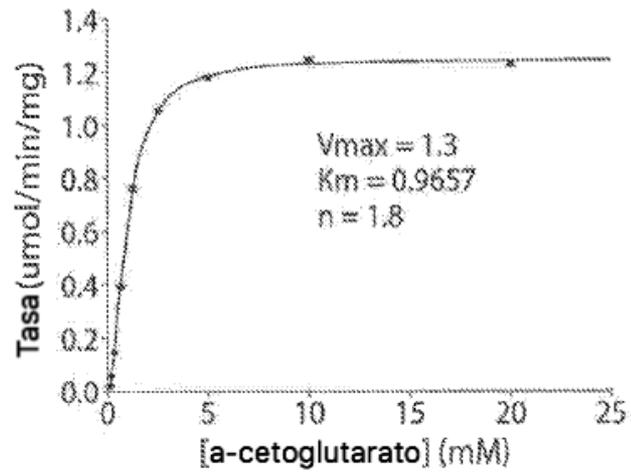


Fig. 15A

ICDH R132S

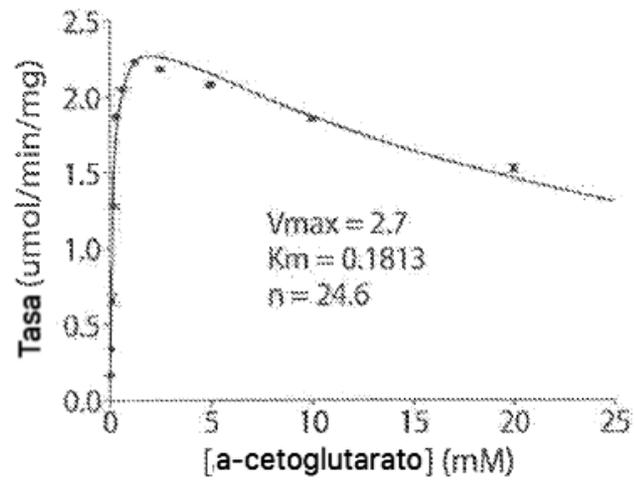


Fig. 15B

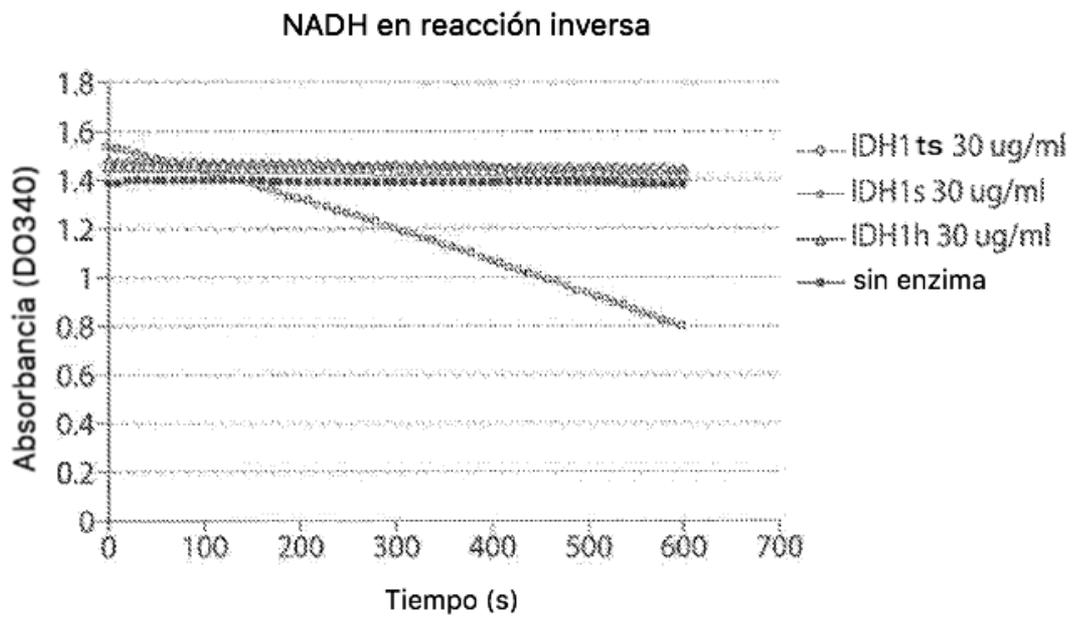


Fig. 16

Inhibición de oxalomalato de IDH1 ts

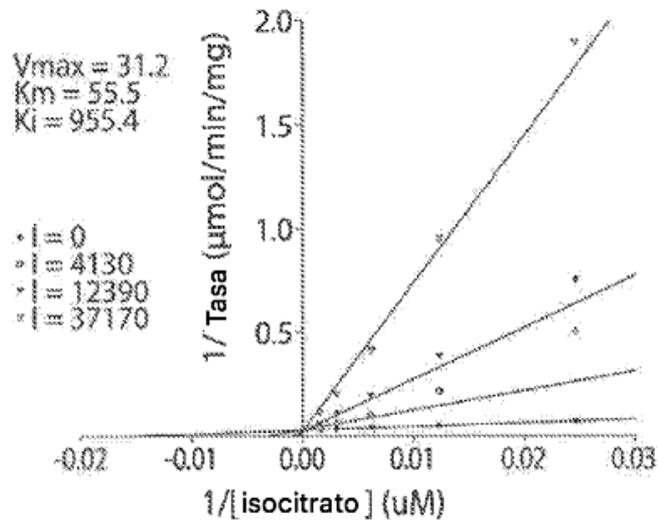


Fig. 17A

Inhibición de oxalomalato de IDH R132H

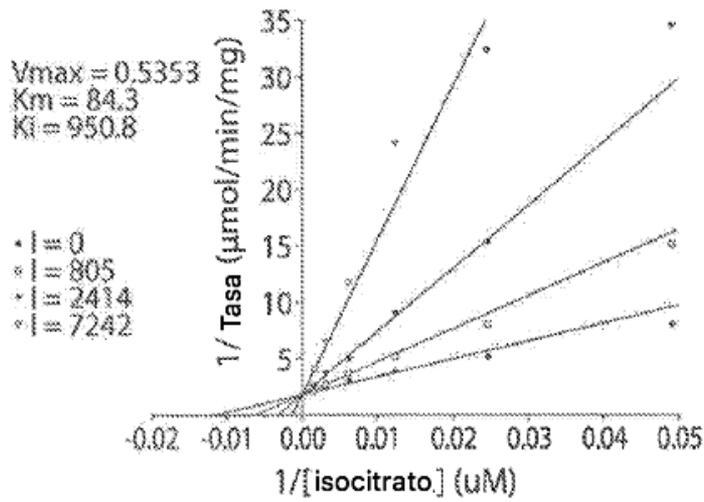


Fig. 17B

Inhibición de oxalomalato de IDH R132S

$V_{max} = 3.2$   
 $K_m = 211.3$   
 $K_i = 510.$

- $I = 0$
- $I = 246$
- $I = 737$
- $I = 2211$

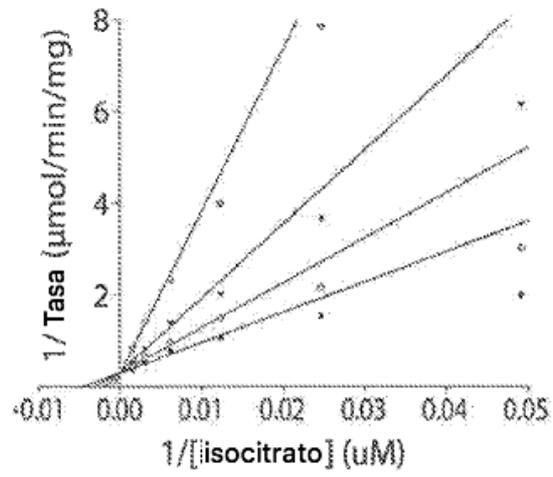
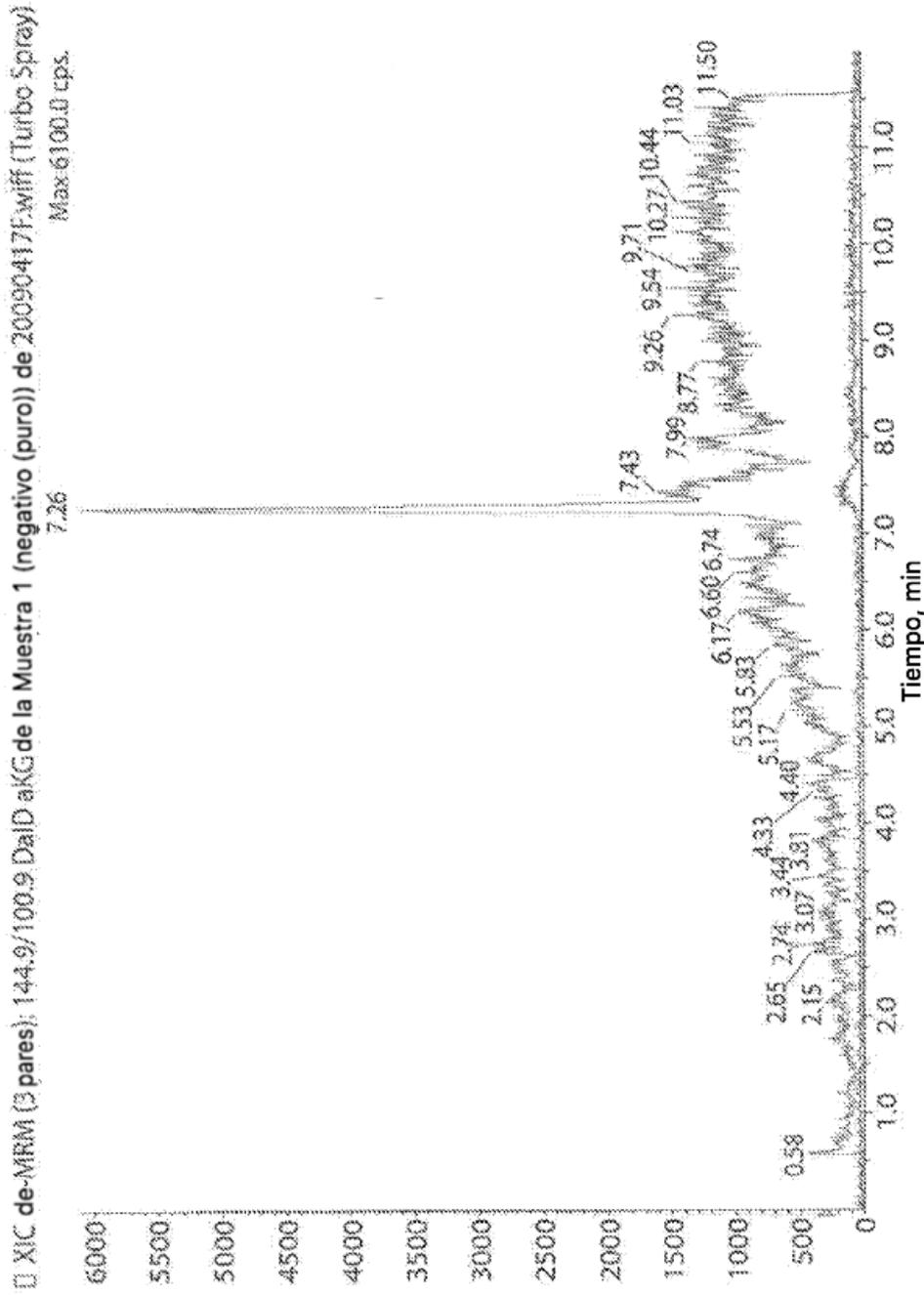
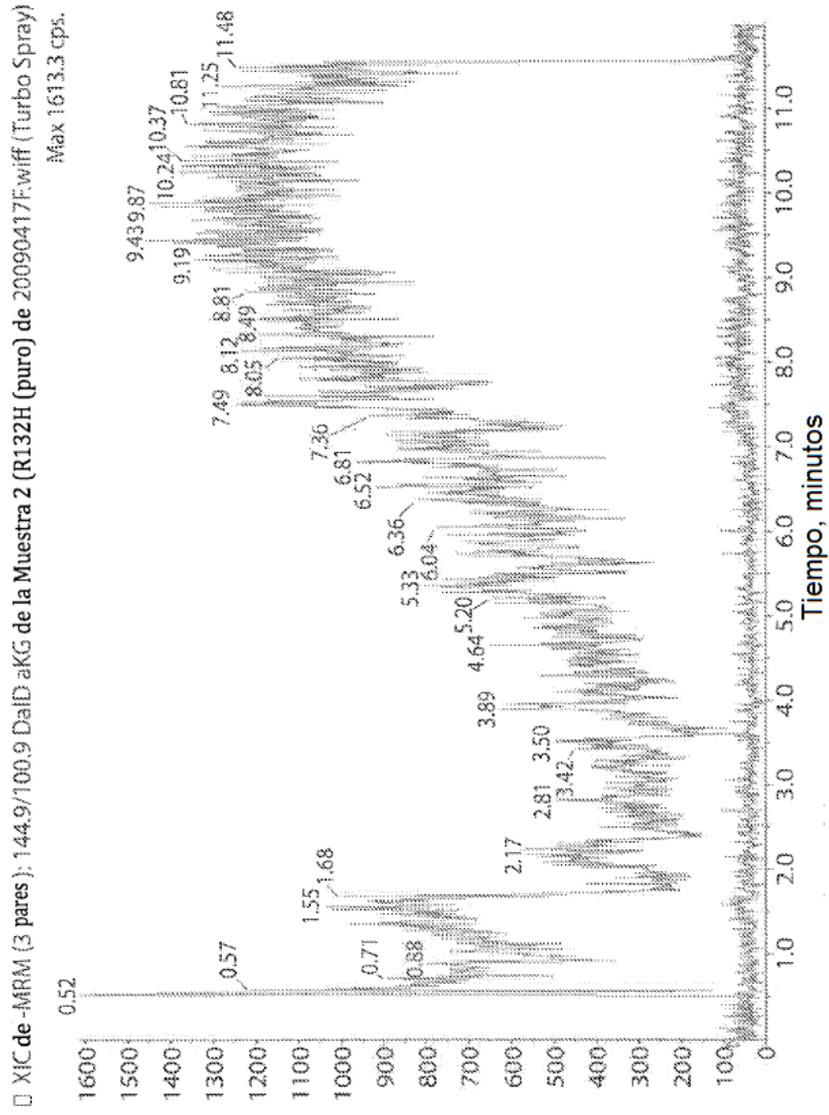


Fig. 17C



Análisis por LC-MS/MS de la reacción de control. La presencia de a-KG está indicada por el pico a 7.26 minutos (azul) mientras que no se observó isocitrato (rojo).

Fig. 18A



Análisis por LC-MS/MS de la reacción que contiene enzima. No se observa isotrato (rojo), y a-KG ha sido completamente consumido (azul).

Fig. 18B

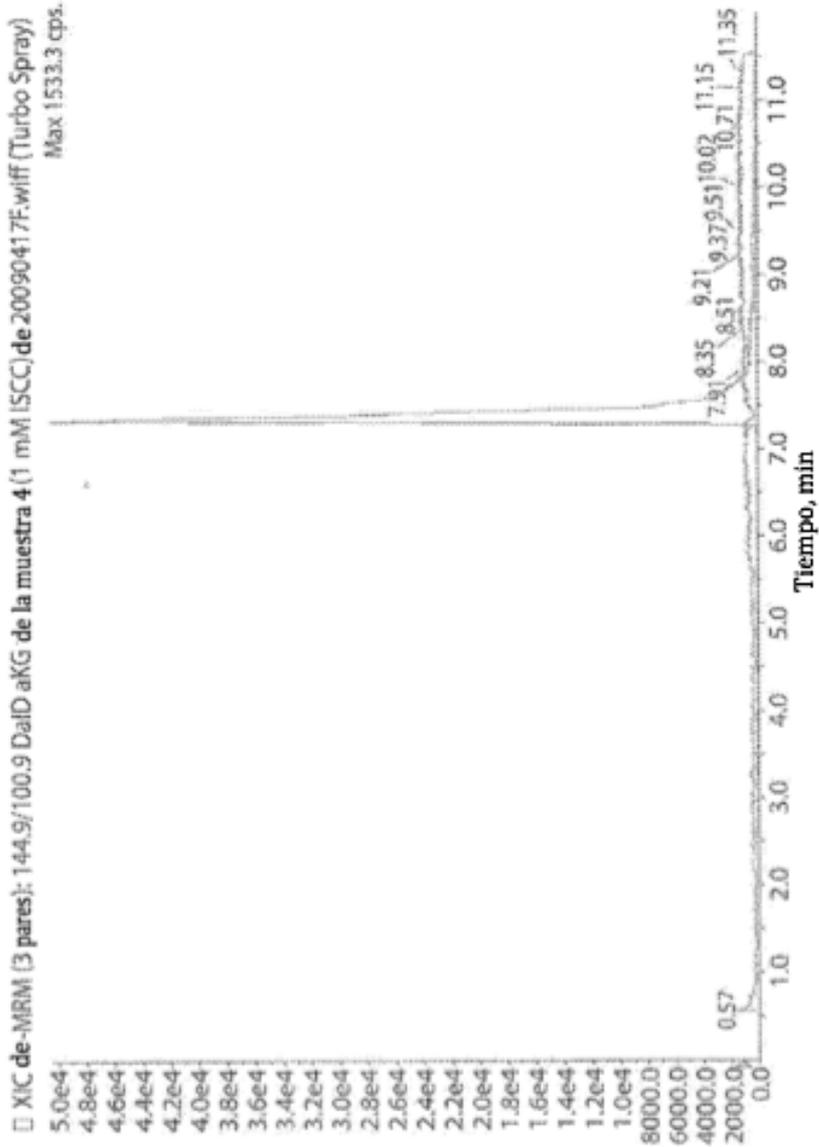
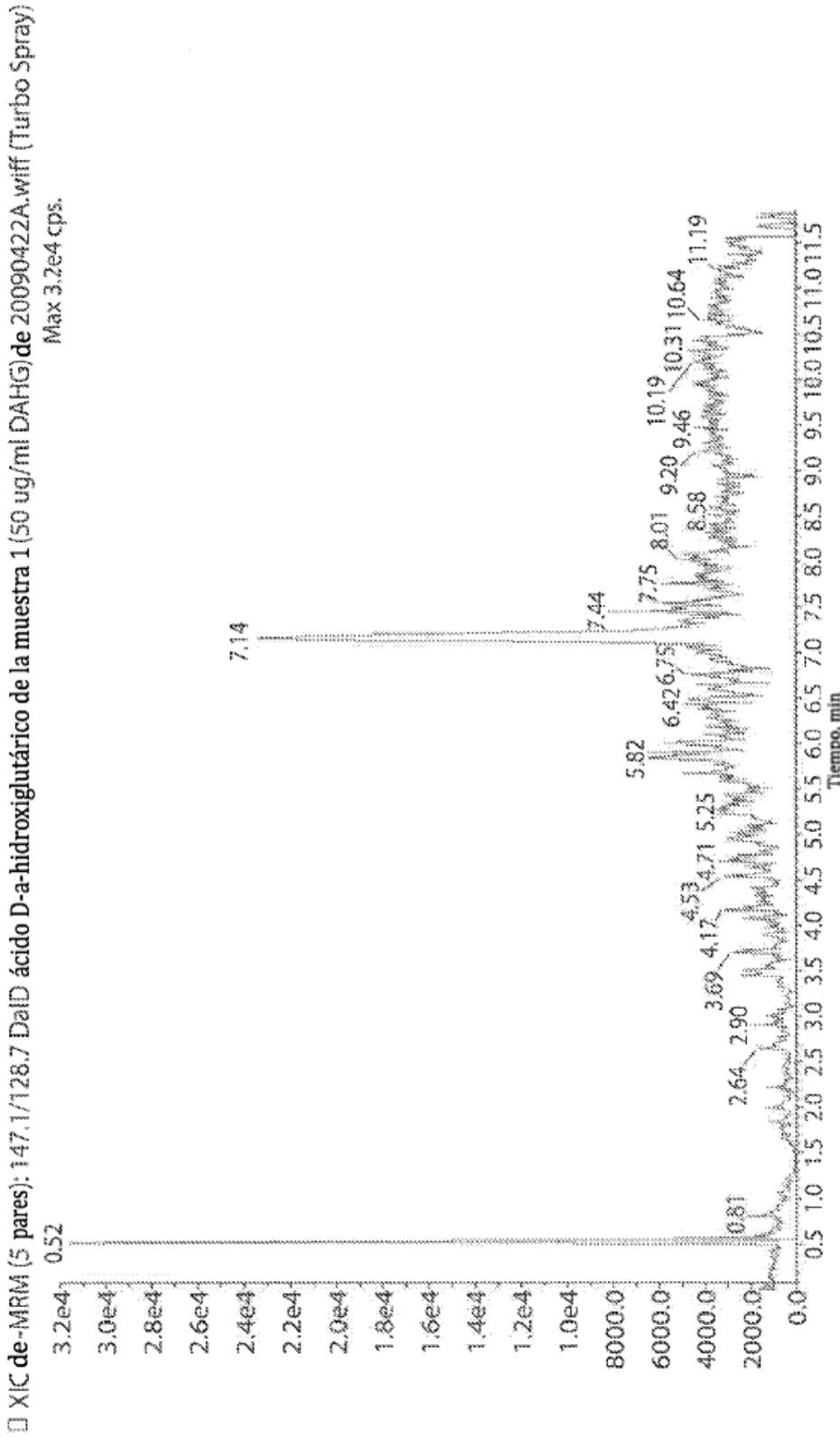


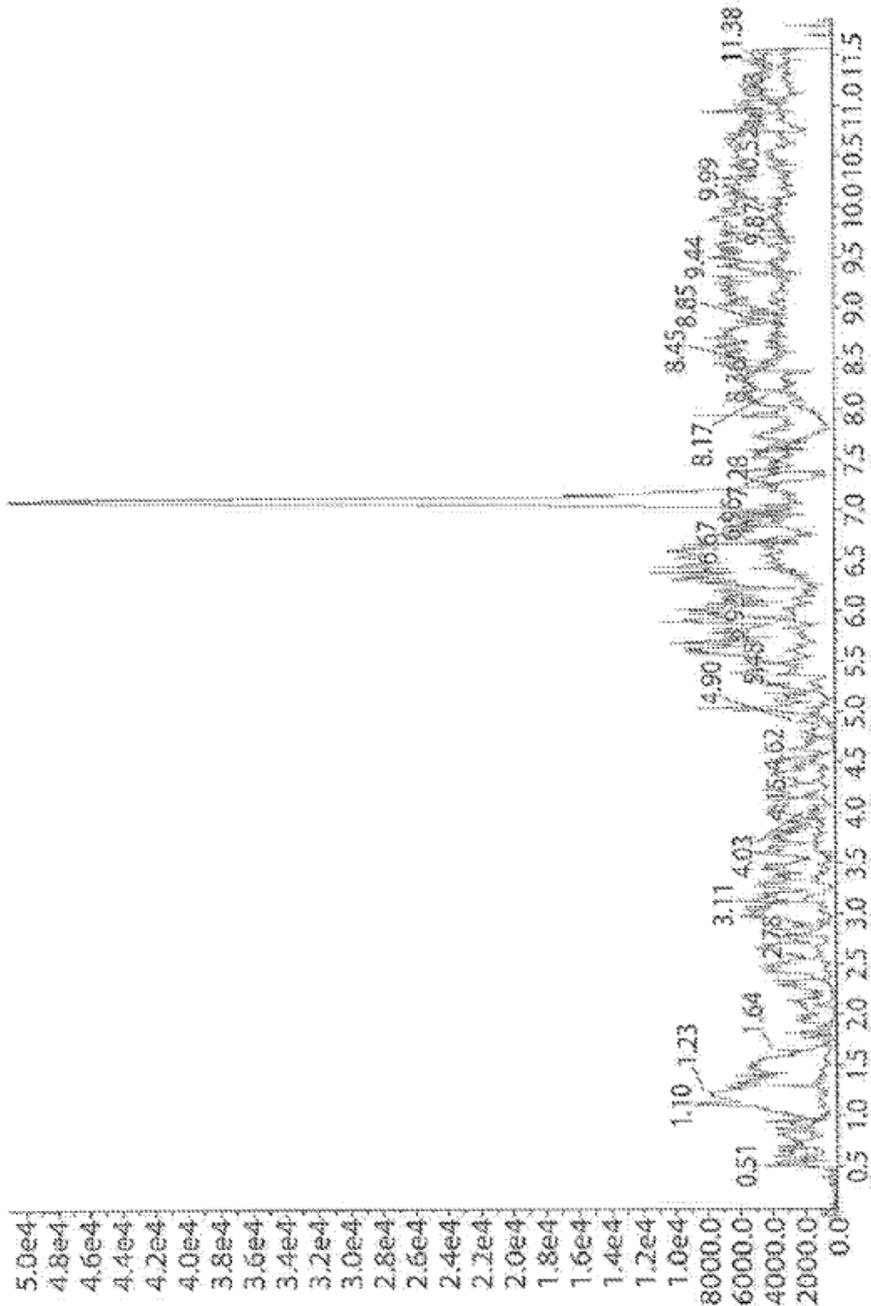
Fig. 18C  
Análisis por LC-MS/MS de la reacción de control introducida. El instrumento de LC-MS/MS como está configurado puede detectar fácilmente la concentración final presuntiva del isocitrato. Cuando la reacción terminada que contiene R132H se le hizo una adición hasta una concentración final isocitrato 1 mM, fue observada fácilmente (rojo); se confirmó el consumo esencialmente completo de a-KG (azul).



Análisis por LC-MS/MS de alfa-hidroxi-glutarato. Se optimizó el instrumento para la detección de 2-hidroxi-glutarato y se identificó la transición MRM 147,1/128,7 como un pico retenido de 7,14 minutos. El pico de 0,52 minutos es un artefacto del instrumento causado por la conmutación de una válvula de desviación en línea.

Fig. 19

□ XIC de -MRM (5 pares): 147,1/128,7 Da | D ácido D-a-hidroxi-glutarico de la muestra 2 (16Apr09 Negativo) de 20090422B.wiff (Turbo Spray)  
Max 8820.0 cps.



Tiempo, min  
Fig. 20

1 mskkisggsv vemqdemtr iiwelikekl ifpyveldlh sydlqienrd atndqvtkda  
61 aeaikkhnvg vkcatitpde krveefklkq mwkspngtir nilggtvfre aiickniprl  
121 vsgwvkpiii grhaygdqyr atdfvvpqpg kveitytpsd gtqkvtylvh nfeegggvam  
181 gmynqdksie dfahssfqma lskgwplyls tkntilkkyd grfkdifgei ydkqyqsqfe  
241 aqkiwyehrl iddmvaqamk seggfiwack nydgdvqsds vaggygslgm mtsvlvcpdg  
301 ktveaeaahg tvtrhymyg kggetstnpi asifawtrgl ahrakldnk elaffanale  
361 evsietieag fmkkdlaaci kglpavgrsd ylnfefmdk lgenlkikla çakl

Fig. 21

```

1 atgtccaaaa aatcagtggt cggttctgtg gtagagatgc aaggagatga aatgacacga
61 atcatttggg aattgattaa agagaaactc atttttccct acgtggaatt ggatctacat
121 agctatgatt taggcataga gaatcgtgat gccaccaacg accaagtcac caaggatgct
181 gcagaagcta taaagaagca taatgltggc gtcaaatgtg ccactatcac tcctgatgag
241 aagaggggtg aggagttcaa gttgaaacaa atgtggaat caccaaatgg caccatacga
301 aatattctgg gtggcacggt cttcagagaa gccattatct gcaaaaaatat cccccggett
361 gtgagtggat gggtaaaacc tatcatcata ggtcgtcatg citatgggga tcaatacaga
421 gcaactgatt ttgttgittc tgggcctgga aaagtagaga taacctacac accaagtgac
481 ggaacccaaa aggtgacata cctggtacat aactttgaag aagggtggtg tgttgccatg
541 gggatgtata atcaagataa gtcaattgaa gattttgcac acagttcctt ccaaatgggt
601 ctgtctaagg gttggccttt gtatctgagc accaaaaaca ctattctgaa gaaatatgat
661 gggcgtttta aagacatctt tcaggagata tatgacaagc agtacaagtc ccagttttaa
721 gctcaaaaaga tctgggtatga gcataggctc atcgacgaca tgggtggcca agctatgaaa
781 tcagagggag gcttcatctg ggcctgtaaa aactatgatg gtgacgtgca gtggactct
841 gtggcccaag ggtatggctc tctggcatg atgaccagcg tgetggttg tccagatggc
901 aagacagtag aagcagaggc tgcccacggg actgtaaccg gtcactaccg catgtaccag
961 aaaggacagg agacgtccac caatcccatt gcttccattt ttgcctggac cagaggggta
1021 gccacagag caaagcttga taacaataaa gagcttgctt tctttgcaaa tgctttggaa
1081 gaagtctcta ttgagacaat tgaggctggc ttcattgacca aggacttggc tgcttgcatt
1141 aaaggtttac ccaatgtgca acgttctgac tacttgaata catttgagtt catggataaa
1201 cttggagaaa acttgaagat caaactagct caggccaac tttaa

```

Fig. 21A

```

1 cctgtggtec cgggtttctg cagagtctac ttcagaagcg gaggcactgg gagtccggtt
61 tgggattgcc aggetgtggg tgtgagtctg agcttgtgag cggetgtggc gcccacaetc
121 ttogccagca tatcatcccg gcaggcgata aactacattc agttgagtct gcaagactgg
181 gaggaactgg ggtgataaga aatctattca ctgtcaaggg ttattgaagt caaaatgtcc
241 aaaaaaatca gtggcgggtc tgtggtagag atgcaaggag atgaaatgac acgaatcatt
301 tgggaattga ttaaagagaa actcattttt cctacgtgg aattggatct acatagctat
361 gatttaggca tagagaatcg tgatgccacc aaocgaccaag tcaccaagga tgcctgcagaa
421 gctataaaga agcataatgt tggcgtcaaa tgtgccacta tcaactctga tgagaagagg
481 gttgaggagt tcaagttgaa acaaatgtgg aaatcaccaa atggcaccat acgaaatatt
541 ctgggtggca cggctctcag agaagccatt atctgcaaaa atatcccccg gcttgtgagt
601 ggatgggtaa aacctatcat cataggctgt catgcttatg gggatcaata cagagcaact
661 gattttgttg ttctggggcc tggaaaagta gagataacct acacaccaag tgacggaacc
721 caaaagggtg catacctggg acataacttt gaagaagggt gtgggtgttc catggggatg
781 tataatcaag ataagtcaat tgaagatttt gcacacagtt ccttccaaat ggetctgtct
841 aagggttggc ctttgtatct gagcaccaaa aacactattc tgaagaaata tgatgggctt
901 tttaaagaca tctttcagga gatatatgac aagcagtaca agtcccagtt tgaagctcaa
961 aagatctggt atgagcatag gctcatcgac gacatggtgg cccaagctat gaaatcagag
1021 ggaggcttca tctgggctctg taaaaactat gatggtgacg tgcagtcgga ctctgtggcc
1081 caagggtatg gctctctcgg catgatgacc agcgtgctgg tttgtccaga tggcaagaca
1141 gtagaagcag aggetgccc cgggactgta acccgtcact accgcatgta ccagaaagga
1201 caggagacgt ccaccaatcc cattgcttcc atttttgctt ggaccagagg gttagcccac
1261 agagcaaagc ttgataacaa taaagagctt gccttctttg caaatgcttt ggaegaagtc
1321 tctattgaga caattgaggc tggettcatg accaaggact tggetgcttg cattaaaggc
1381 ttacccaatg tgcaacgttc tgactacttg aatacatttg agttcatgga taaacttggg
1441 gaaaacttga agatcaaaact agctcaggcc aaactttaag ttcatacctg agctaagaag
1501 gataattgtc ttttggtaac taggtctaca ggtttacatt tttctgtgtt acaetcaagg
1561 ataaaggcaa aatcaatttt gtaatttgtt tagaagccag agtttatctt ttctataagt
1621 ttacagcctt tttcttatat atacagttat tgccaccttt gtgaacatgg caagggactt
1681 ttttacaatt tttattttat tttctagtac cagcctagga attcgggttag tactcatttg
1741 ttttactgtt cactttttct catggtctaa ttataaatga ccaaaatcaa gattgetcaa
1801 aagggtaaat gatagccaca gtattgctcc ctaaaatag cataaagtag aaattcactg
1861 ccttcccctc ctgtccatga cctggggcag agggaaagtc tgggtgcata gatatcccgt
1921 tttgtgaggg agagctgtgc attaaacttg cacatgactg gaacgaagta tgagtgcaac
1981 tcaaatgtgt tgaagatact gcagtcattt ttgtaaagac cttgctgaat gtttccaata
2041 gactaaatac tgtttaggcc gcaggagagt ttggaatccg gaataaatac tacttgaggg
2101 tttgtctctt ccatttttct ctttctctct ctggcctggc ctgaatatta tactactcta
2161 aatagcatat ttcatccaag tgcaataatg taagetgaat ctttttttga cttctgtgtg
2221 cctgttttat ttcttttata taaatgtgat ttctcagaaa ttgatattaa acactatctt
2281 atcttctctt gaactgttga ttttaattaa aattaagtgc taattaccaa aaaaaaaaa

```

Fig. 21B

MAGYLRVVRS LCRASGSRPAWAPAALTAPTSQEQPRRHYADKRIKVAKPV  
VEMDGDEMTRIIWQFIKEKLILPHVDIQLKYFDLGLPNRDQTTDDQVTIDS  
ALATQKYSVAVKCATITPDEARVEEFKLKMMWKSFNGTIRNILGGTVFRE  
PIICKNIPRLVPGWTKPITIGRHAHGDQYKATDFVADRAGTFKMFVTFPKD  
GSGVKEWEVYNFPAGGVGMCMYNTDESISGFAHSCFQYAIQKKWPLYMST  
KNTILKAYDGRFKDIFQEIFDKHYKTDFDKNKIWYEHRLIDDMVAQVLKS  
SGGFVWACKNYDGDVQSDILAQGFGLMTSVLVCPDGKTEAEAAHGT  
VTRHYREHQGRPTSTNPIASIFAWTRGLEHRGKLDGNQDLIRFAQMLEK  
VCVETVESGAMTKDLAGCIHGLSNVKNLNEHFLNTTDFLDTIKSNLDRALG  
RQ

Fig. 22

```

1 atggccggct acctgcgggt cgtgcgctcg ctctgcagag cctcaggctc gggcccgccc
61 tgggcgccgg cggccctgac agccccacc tcgcaagagc agccgcggcg ccactatgce
121 gacaaaagga tcaagggtggc gaagcccgtg gtggagatgg atggtgatga gatgaccctg
181 attatctggc agttcatcaa ggagaagctc atcctgcccc acgtggacat ccagctaaag
241 tattttgacc tcgggctccc aaaccgtgac cagactgatg accaggteac cattgactct
301 gcaactggcca cccagaagta cagtgtggct gtcaagtgtg ccaccatcac ccctgatgag
361 gcccggtgtg aagagttcaa gctgaagaag atgtggaaaa gtoccaatgg aactatccgg
421 aacatctctg gggggactgt cttccgggag cccatcatct gcaaaaacat cccacgccta
481 gtcctctggt ggaccaagcc catcaccatt ggcaggcacg cccatggcga ccagtacaag
541 gccacagact ttgtggcaga ccgggcccgg acittcaaaa tggctctcac cccaaaagat
601 ggcagtggtg tcaaggagtg ggaagtgtac aacttccccg caggcggcgt gggcatgggc
661 atgtacaaca ccgacgagtc catctcaggt tttgcgcaca gctgcttcca gtatgccatc
721 cagaagaaat ggcgcctgta catgagcacc aagaacacca tactgaaagc ctacgatggg
781 cgittcaagg acatcttcca ggagatcttt gacaagcact ataagaccga cttcgacaag
841 aataagatct ggtatgagca ccggctcatt gatgacatgg tggctcaggt cctcaagtct
901 tcgggtggct ttgtgtgggc ctgcaagaac tatgacggag atgtgcagtc agacatctctg
961 gccacggctt ttggctccct tggcctgatg acgtccgtcc tggctctgcc tgatgggaag
1021 acgattgagg ctgaggccgc tcatgggacc gtcaccgcgc actatcggga gcaccagaag
1081 ggcgggcccc ccagcaccac cccatcgcgc agcatctttg cctggacacg tggcctggag
1141 caccggggga agctggatgg gaaccaagac ctcatcaggt ttgccagat gctggagaag
1201 gtgtgcgtgg agacggtgga gagtggagcc atgaccaagg acctggcggg ctgcattcac
1261 ggctoagca atgtgaagct gaacgagcac ttcotgaaca ccacggactt cctcgacacc
1321 atcaagagca acctggacag agccctgggc aggcagtag

```

Fig. 22A

```

1 ccagcgttag ccgcggcca ggcagccggg aggagcggcg cgcgctcgga cctctcccgc
61 cctgctcggt cgctctccag ctgggatgg ccggctacct ggggctcgtg cgtcgcctct
121 gcagagcctc aggcctcgcg ccggcctggg cgcggggcgc cctgacagcc cccacctcgc
181 aagagcagcc gggcgccac tatgcccaca aaaggatcaa ggtggcgaag cccgtggtgg
241 agatggatgg tgatgagatg acccgtatta tctggcagtt catcaaggag aagctcatcc
301 tgccccagct ggacatccag ctaaagtatt ttgacctcgg gctcccaaac cgtgaccaga
361 ctgatgacca ggtcaccatt gactctgcac tggccacca gaagtacagt gtggtgtca
421 agtgtgccac catcaccctt gatgaggccc gtgtggaaga gttcaagctg aagaagatgt
481 ggaaaagtcc caatggaact atccggaaca tccggggggg gactgtcttc cgggagccca
541 tcatctgcaa aaacatcca cgcctagtec ctggctggac caagccctc accattggca
601 ggcagcccca tggcgaccag tacaaggcca cagactttgt ggcagaccgg gccggcactt
661 tcaaaatggt ctccaccaca aaagatggca gtggtgtcaa ggagtgggaa gtgtacaact
721 tccccgagg cggcgtgggc atgggcaggt acaacaccga cgagtccctc tcaggttttg
781 cgcacagctg ctccagtat gccatccaga cgcctggcc gctgtacatg agcaccaaga
841 acaccatact gaaagcctac gatgggcggt tcaaggacat ctccaggag atctttgaca
901 agcactataa gaccgacttc gacaagaata agatctggta tgagcaccgg ctcatlgatg
961 acatggtggc tcaggtcttc aagtctcgg gtggtcttgt gtgggctcgc aagaactatg
1021 acggagatgt gcagtcagac atcctggccc agggctttgg ctcccttggc ctgatgacgt
1081 ccgtcctggt ctgcctgat ggaagaoga ttgaggctga gcccgctcat gggaccgtca
1141 cccgccacta tggggagcac cagaagggcc ggcccaccag caccacccc atcgccagca
1201 tctttgctg gacacgtggc ctggagcacc gggggaagct ggatgggaa caagacctca
1261 tcaggtttgc ccagatgctg gagaagggtg gcgtggagac ggtggagagt ggagccatga
1321 ccaaggacct ggcgggctgc atccagccc tcagcaatgt gaagetgaa gageacttcc
1381 tgaacaccac ggacttcttc gacaccatca agagcaacct ggacagagcc ctgggcaggc
1441 agtaggggga ggcgccacc atggtctcag tggaggggcc aggctgagc cggcgggtcc
1501 tctgagcgc ggcagagggg ggcctcaca gccctctct ggaggccttt ctaggggatg
1561 ttttttata agccagatgt ttttaaaagc atatgtgtgt tccctcat ggtgacgtga
1621 ggcaggagca gtgcgtttta cctcagccag tcagtatgtt ttgcatactg taatttatat
1681 tgccttggg acacatggtg ccatatttag ctactaaaaa gctcttcaca aaaaaaaaaa

```

Fig. 22B

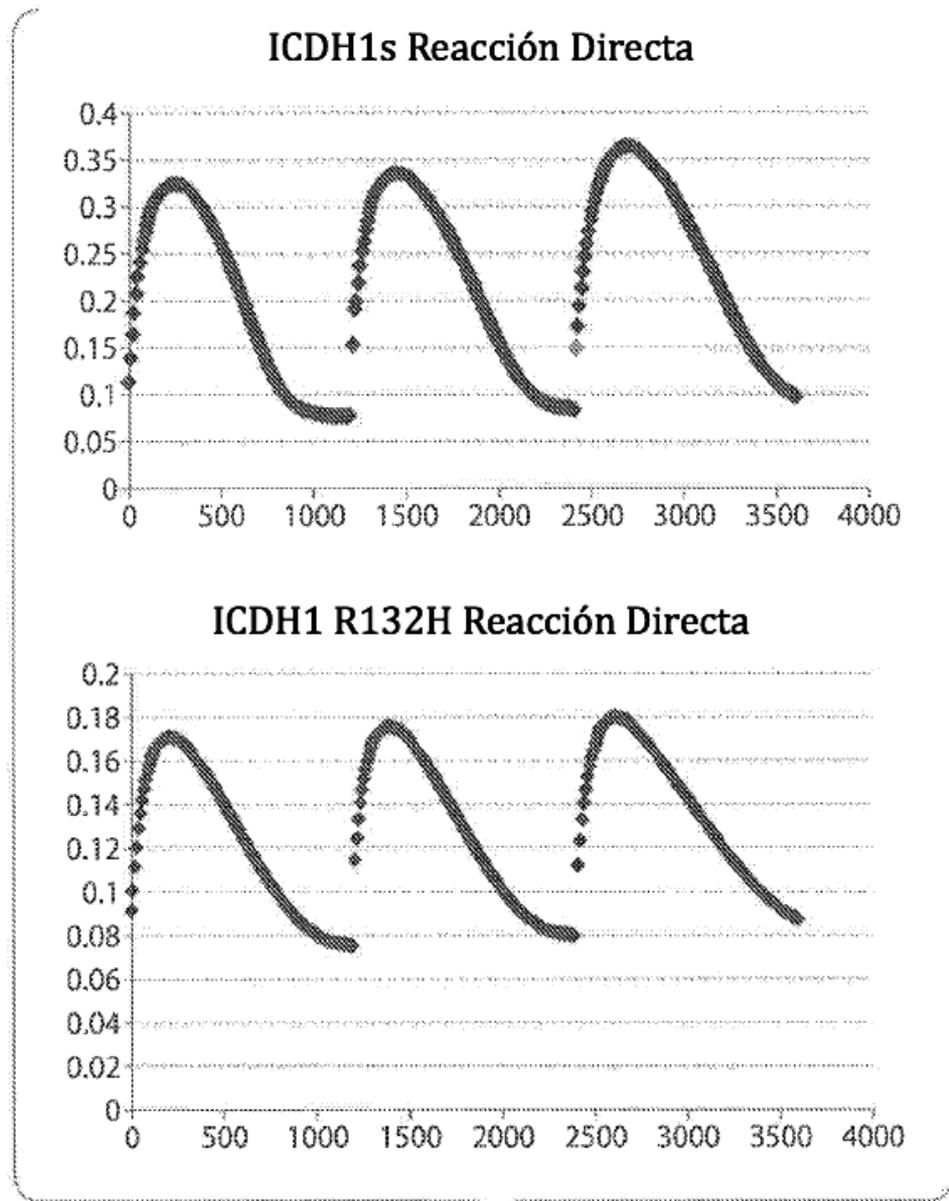


Fig. 23

XIC de-MRM (1 par): 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la muestra 1 (874-DHAG) de 20090617K...

Max 9033.3 cps.

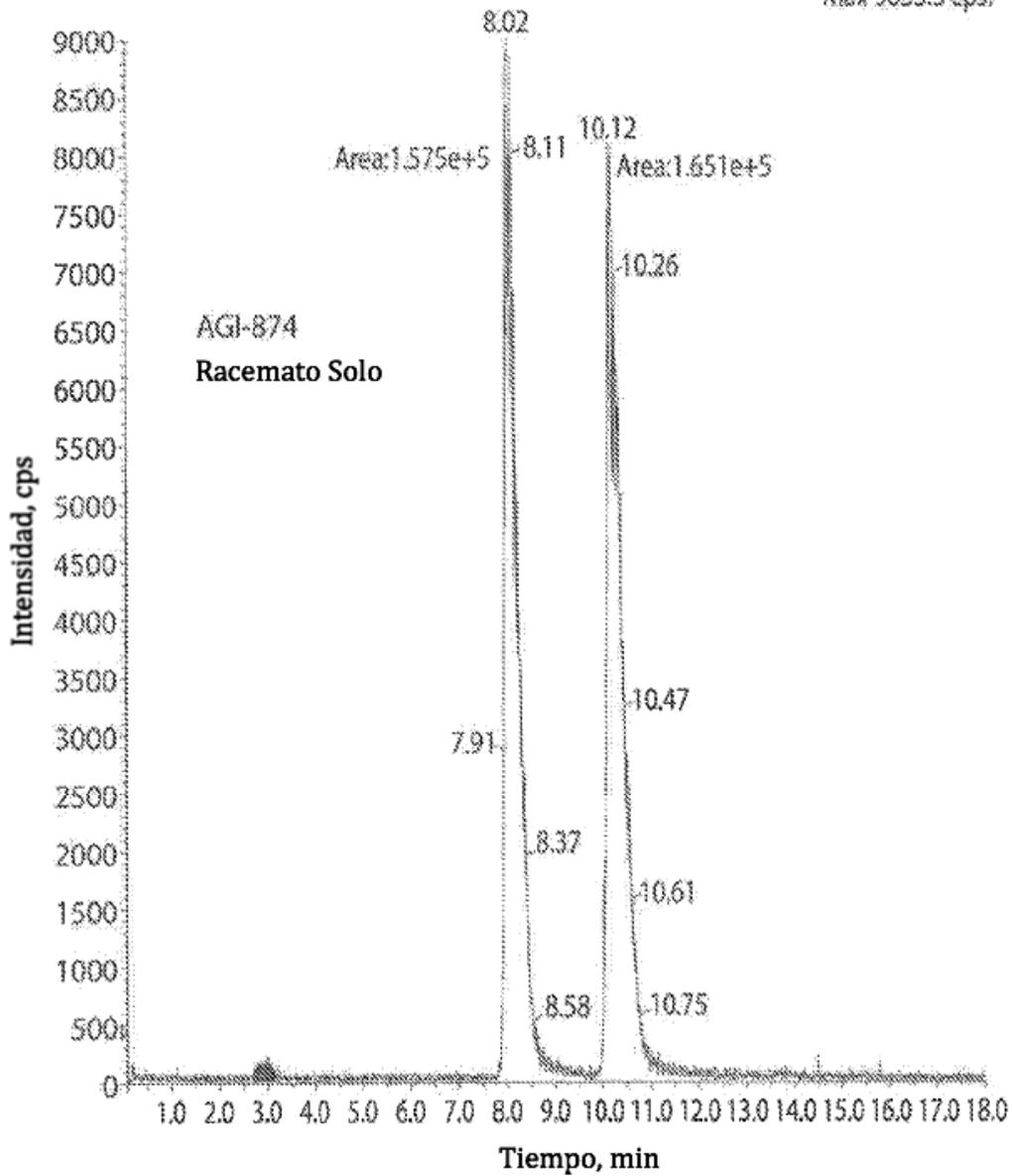


Fig. 24A

XIC de-MRM (1 par): 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la  
Muestra 2 (R-2HG-DHAG) de 200906...

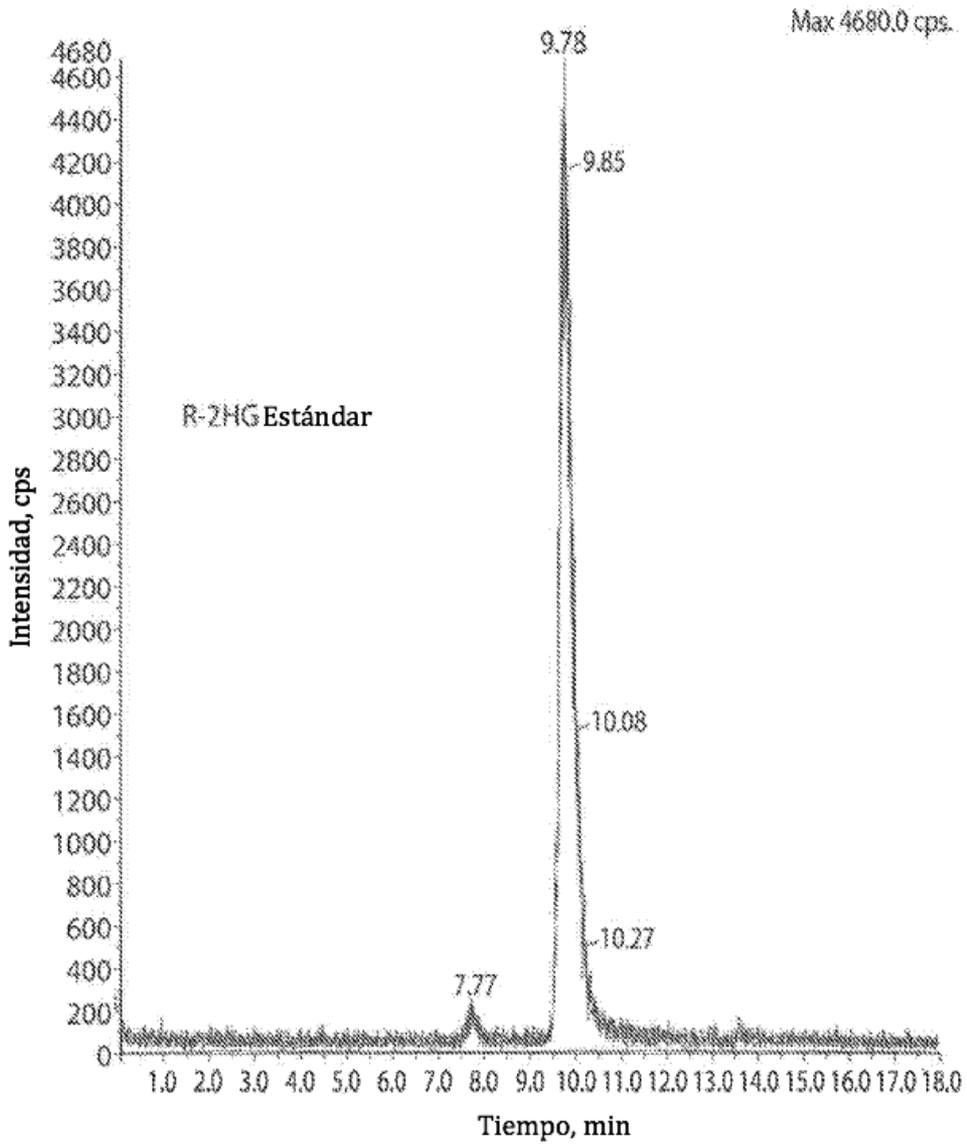


Fig. 24B

☐ XIC de MRM (1 par): 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la  
Muestra 3 (874 + RSTD) de 20090618...

No hay detección de pico si el número de puntos excede de 1040 Max 3890.0 cps.

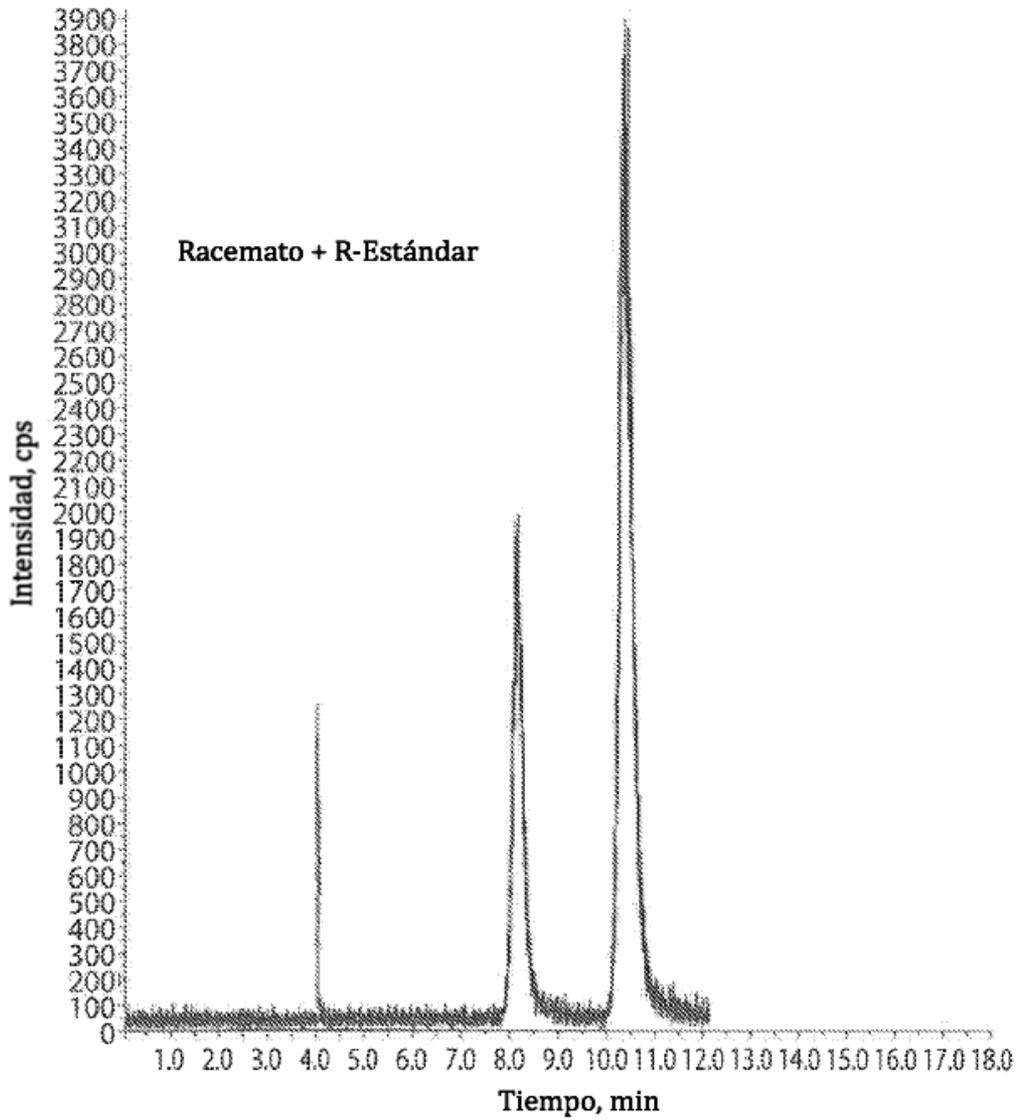


Fig. 24C

OXIC de-MRM (1 par): 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la  
Muestra 1 (Enzima sometida a derivación Rxn 1"

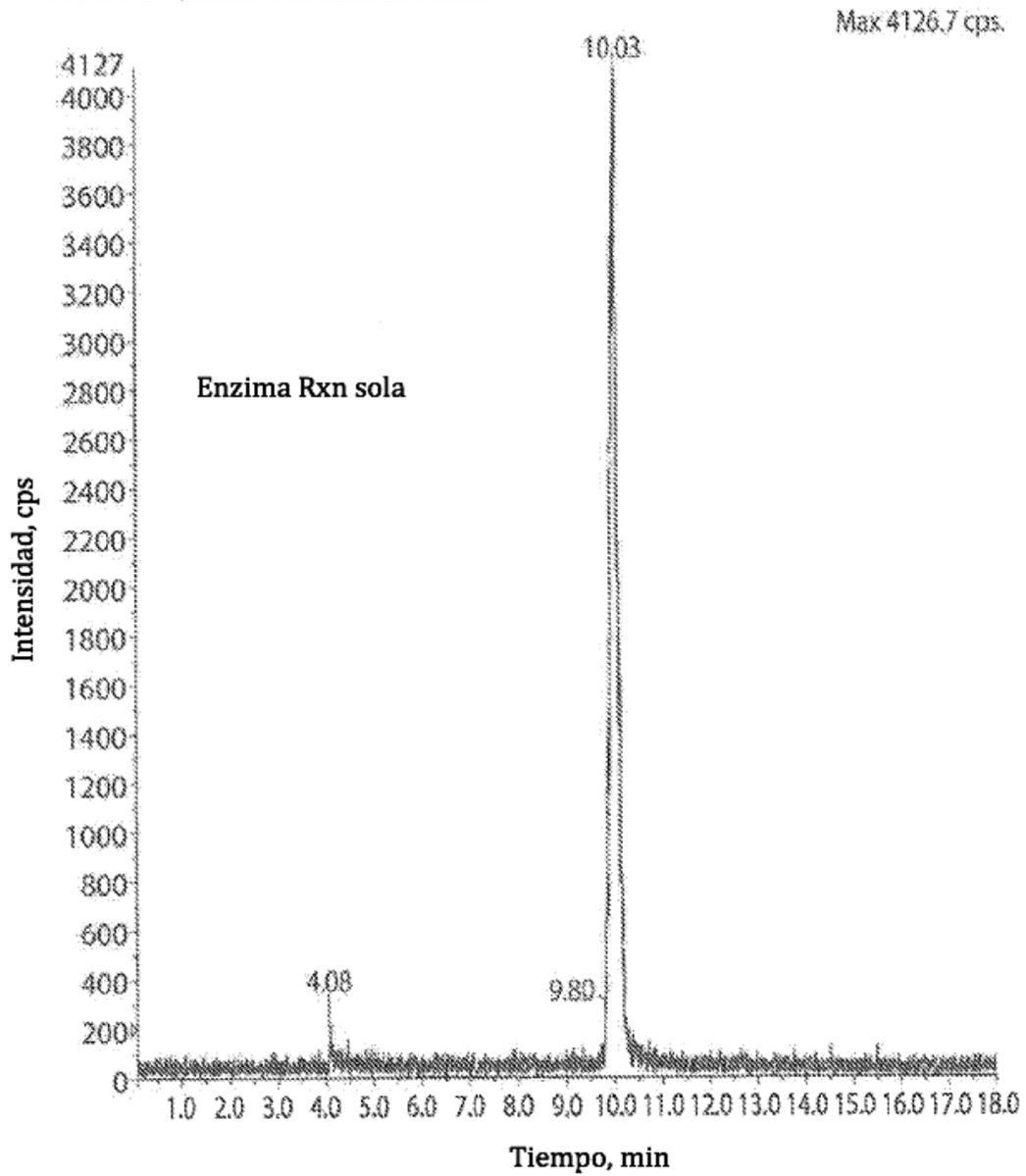


Fig. 24D

XIC de-MRM (1 par); 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la Muestra 2 (Rxn + RSTD) de 20090618...

No hay detección de pico si el número de puntos excede 1040

Max 4726.7 cps.

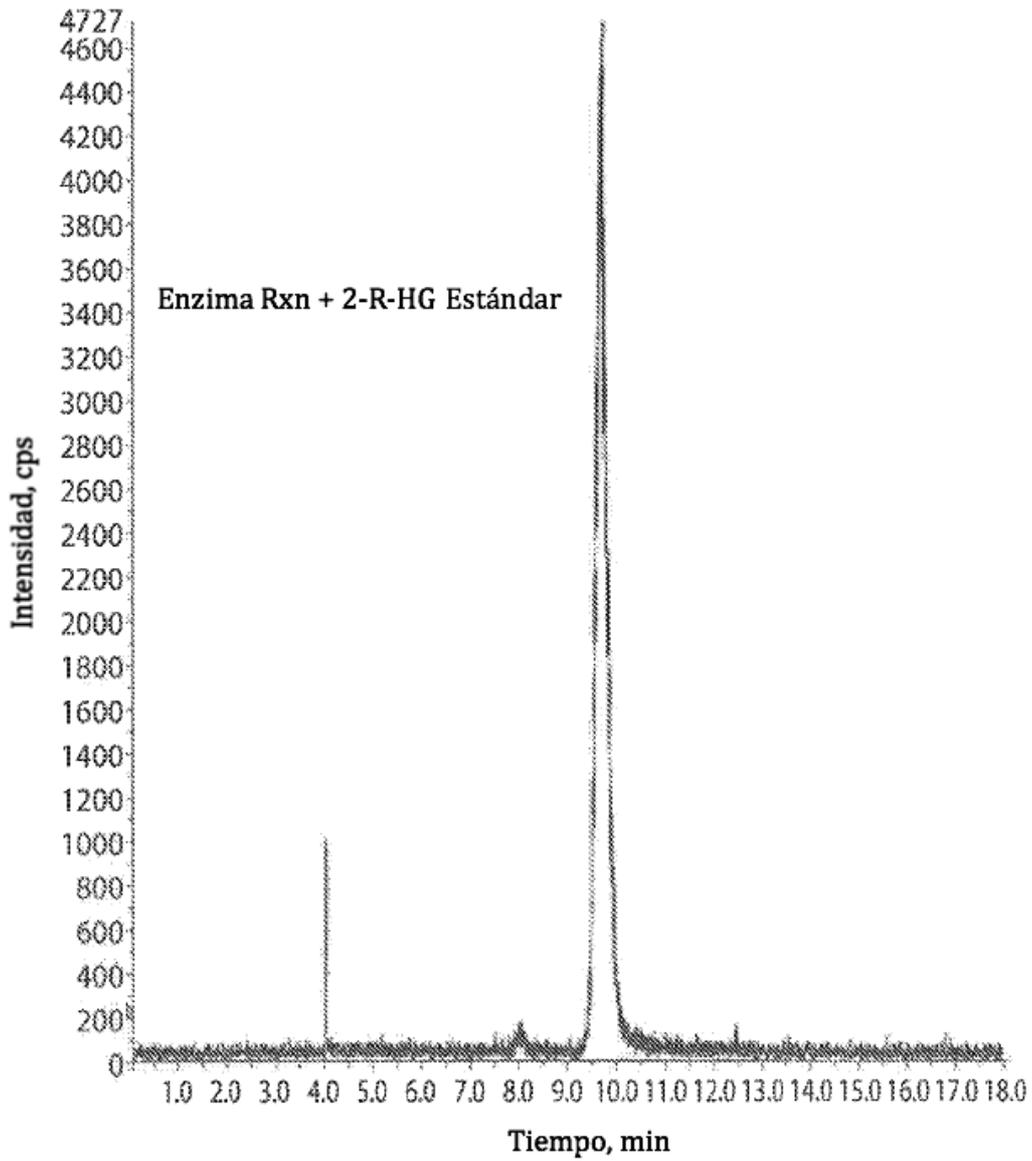


Fig. 24E

XIC de-MRM (1 par): 362.9/146.6 Da ID: DATAN-2HG de la Muestra 5 (Rxn + 874) de200906188...

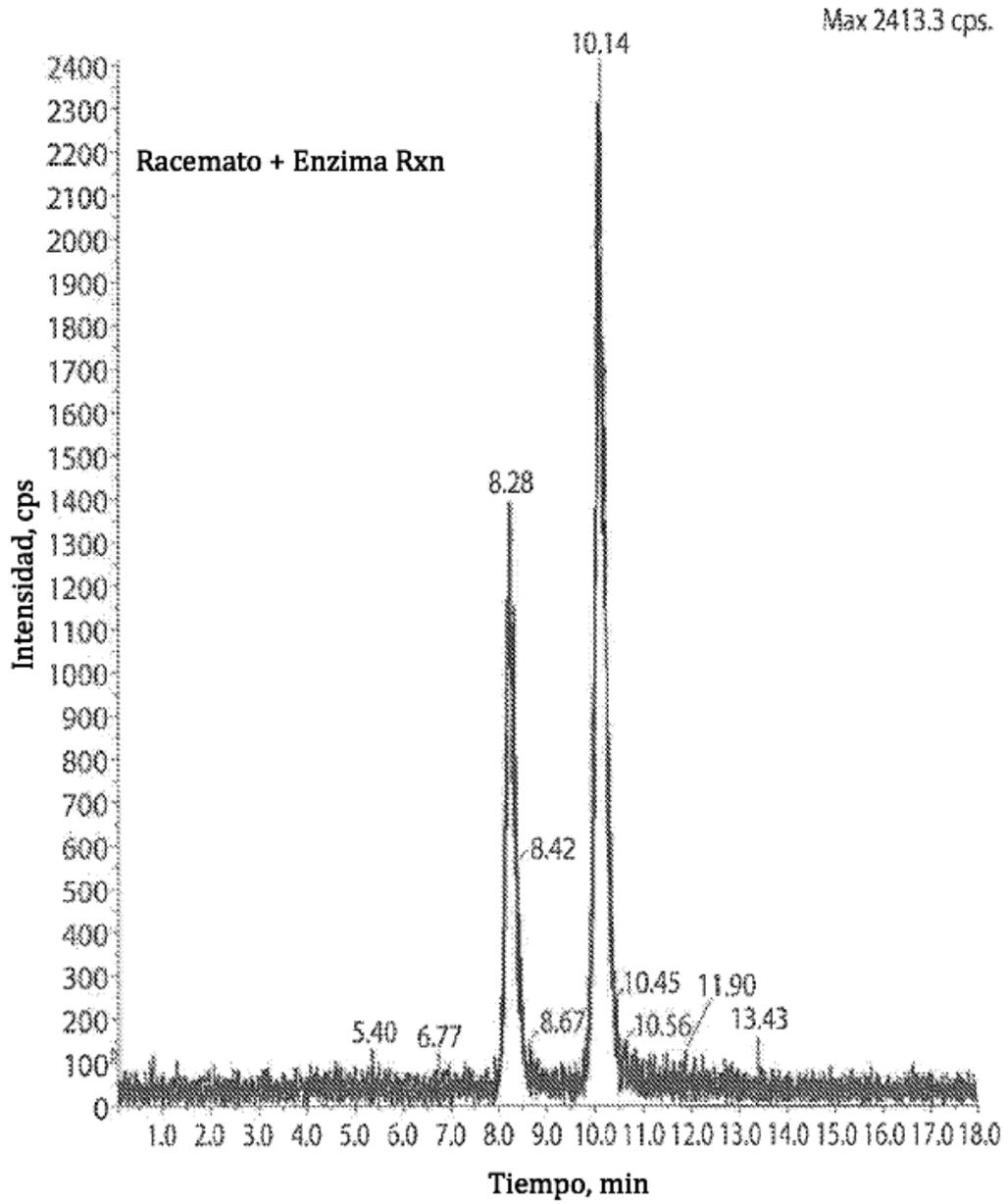


Fig. 24F

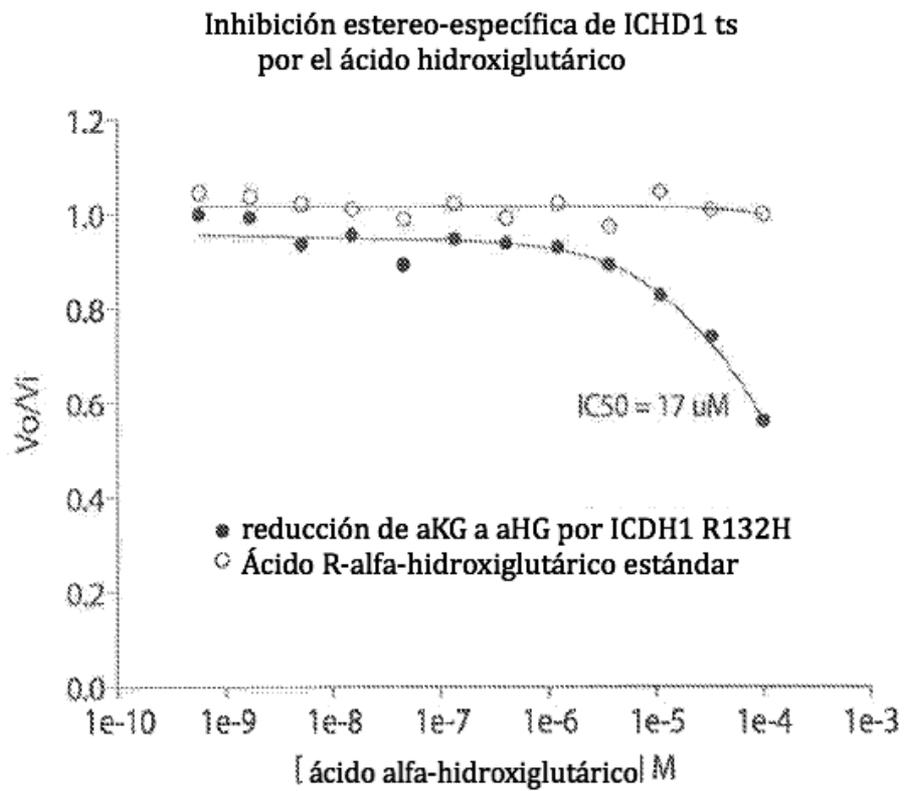


Fig. 25

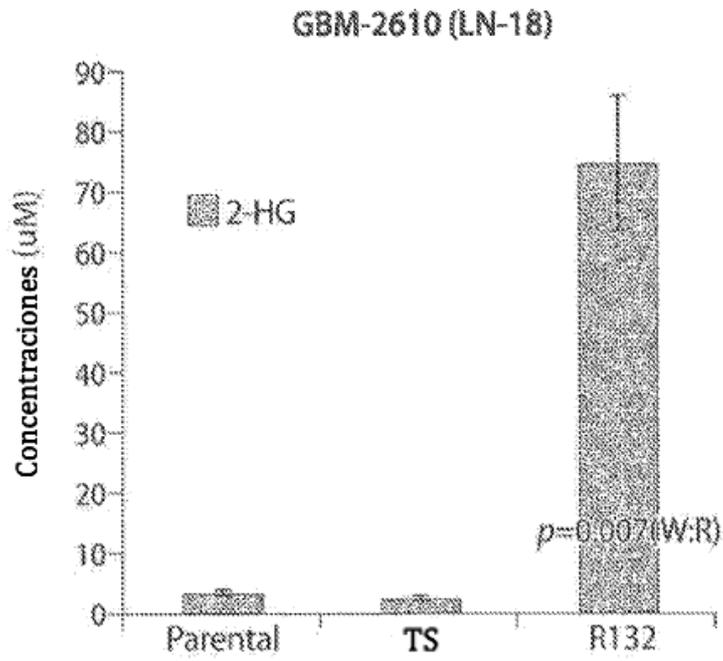


Fig. 26A

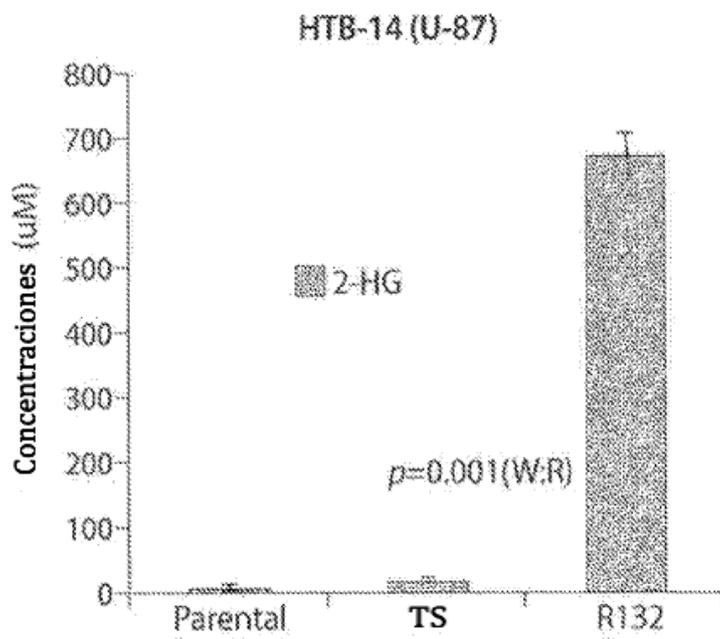


Fig. 26B

gcaataatgagctctatatgccaatcactgcagttgtaggtataactatccatttgtctgaaaaactttgcttc  
 taatthttctcttcaagCTATGATTTAGGCATAGAGAAATCGTGATGCCACCAACGACCAGTCAACCAAGGAT  
 GCTGCAGAAGCTATAAAGAAGCATAATGTTGCCGTCAAAATGTCCACTATCACCTCTGATGAGAAAGAGGGTTG  
 AGGAGTTCAAGTTGAAACAAAATGTGGAATCACCCAAATGCCACCATACGAAAATATTCTGGGTGGCJGFCITCA  
 GAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATATAGGTCGTCA  
 TGCTTATGGGATCAAgtaagtcattgttggcaataaatgtgatthttgcatgbtggcccagaatthtccaacttg  
 tatgtgttttattcttattcttttgggtatctacaccatttaagcaagga

Fig. 27

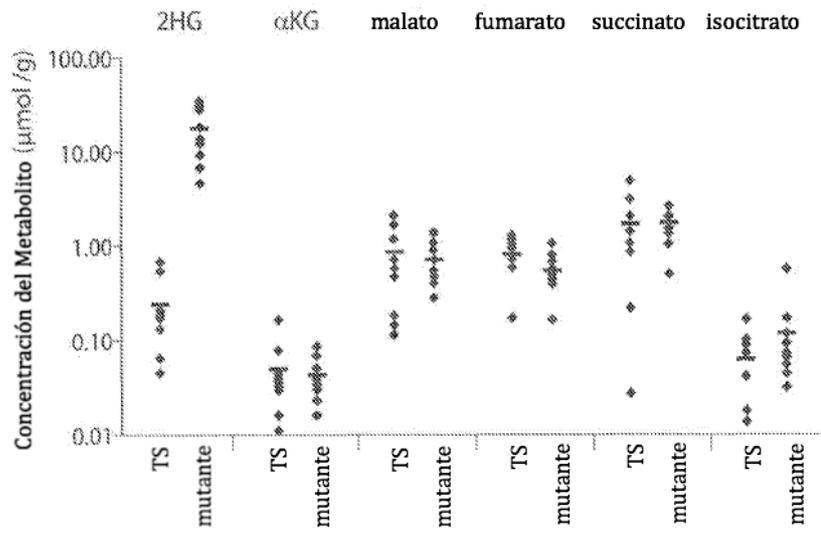


Fig. 28

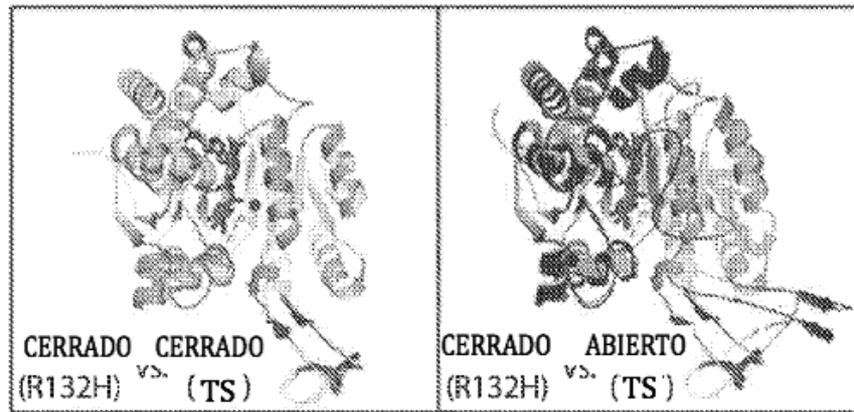


Fig. 29A

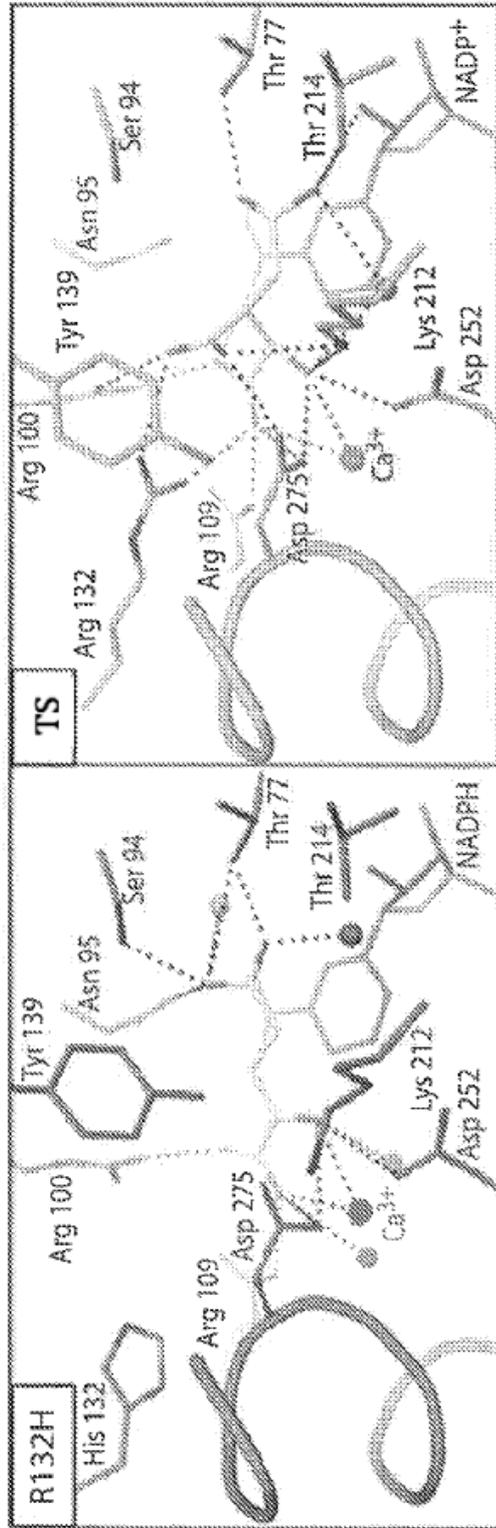


Fig. 29B

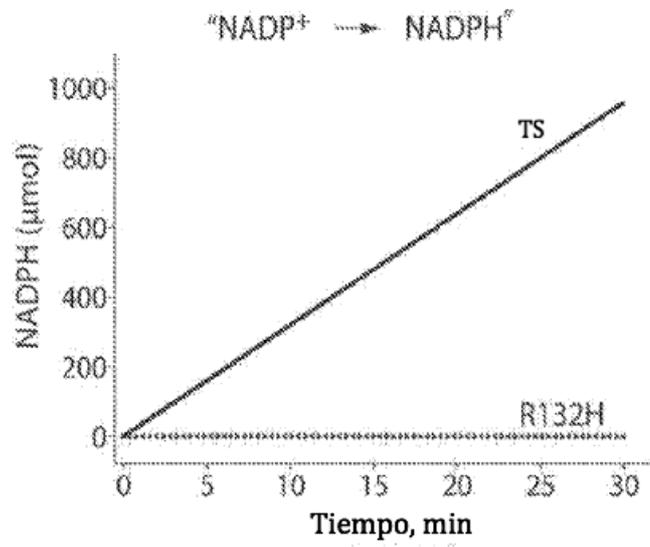


Fig. 30A

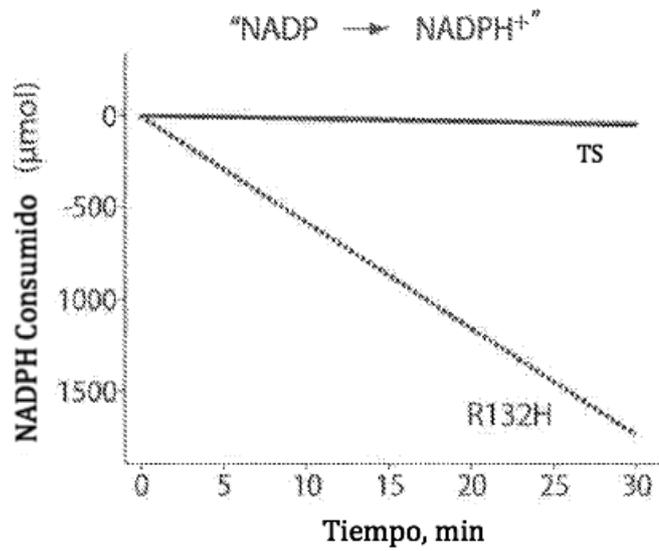


Fig. 30B

Oxidativo ( $\Rightarrow$ NADPH)	TS	R132H	Reductivo ( $\Rightarrow$ NADP+)	TS	R132H
$K_{M,NADP^+}$ ( $\mu$ M)	49	84	$K_{M,NADPH}$ ( $\mu$ M)	n/a*	0.44
$K_{M,iscitrate}$ ( $\mu$ M)	65	370	$K_{M,\alpha KG}$ ( $\mu$ M)	n/a	965
$K_{M,MgCl_2}$ ( $\mu$ M)	29	10085	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	n/a	$1.0 \times 10^3$
$K_{i,\alpha KG}$ ( $\mu$ M)	1871	24			
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$4.4 \times 10^5$	37.5			

\*n/a = Actividad enzimática no medible

Fig. 30C

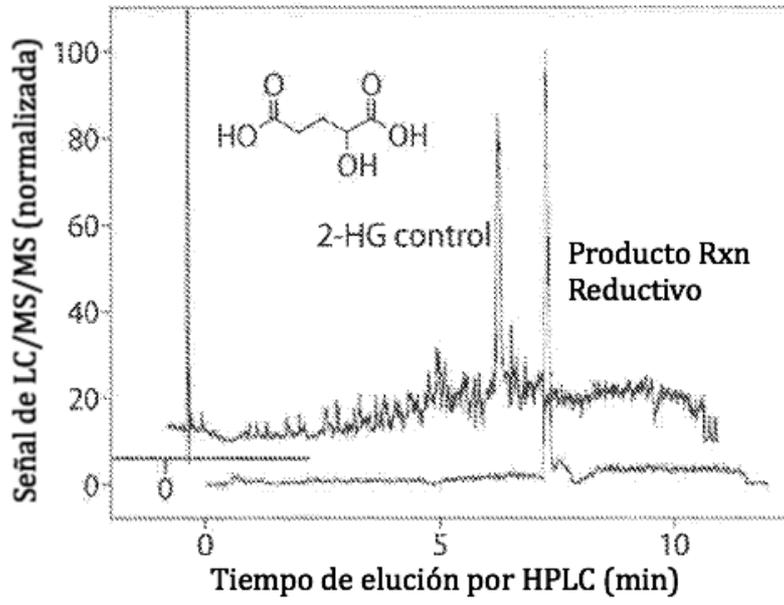


Fig. 31A

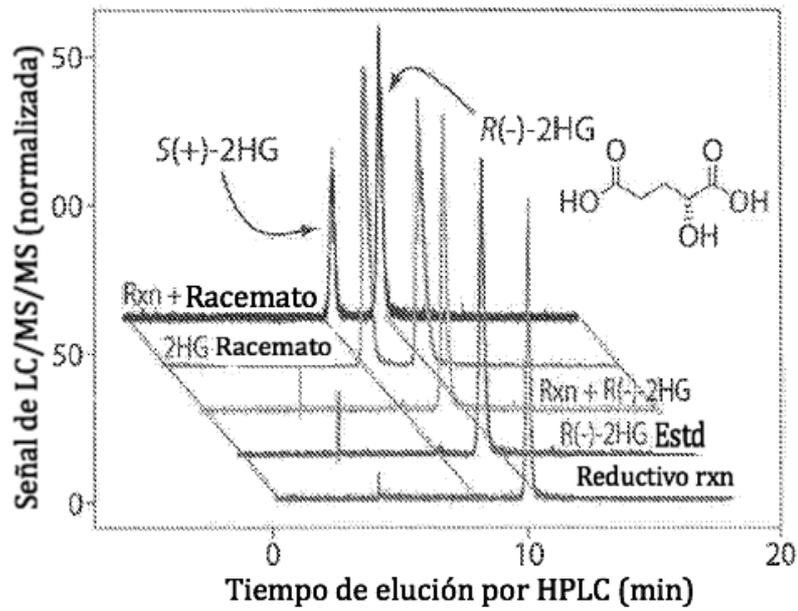


Fig. 31B

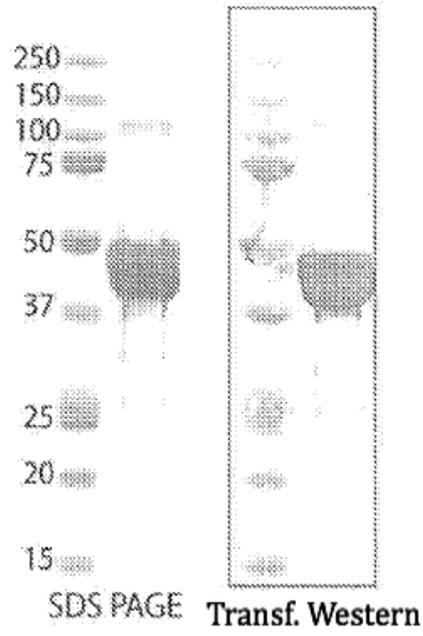


Fig. 32A

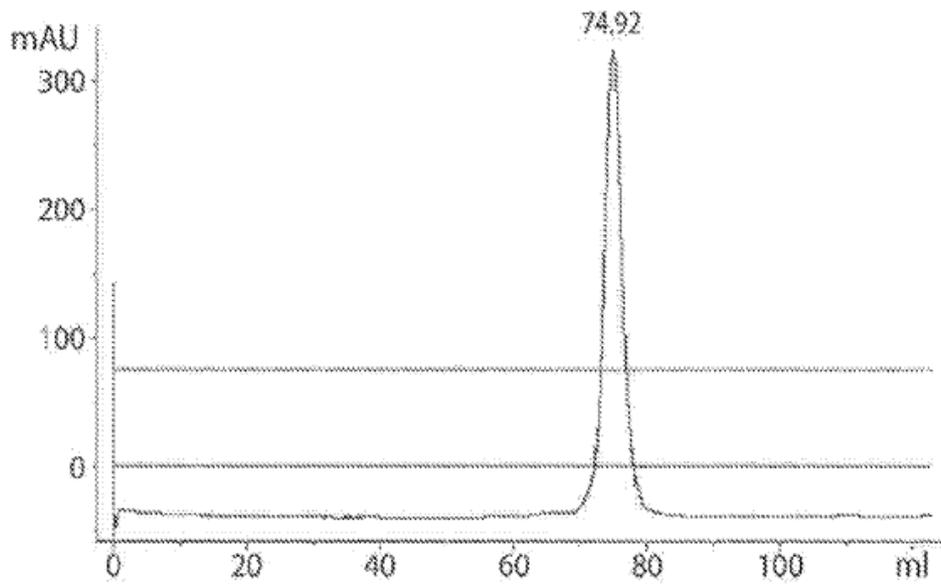


Fig. 32B

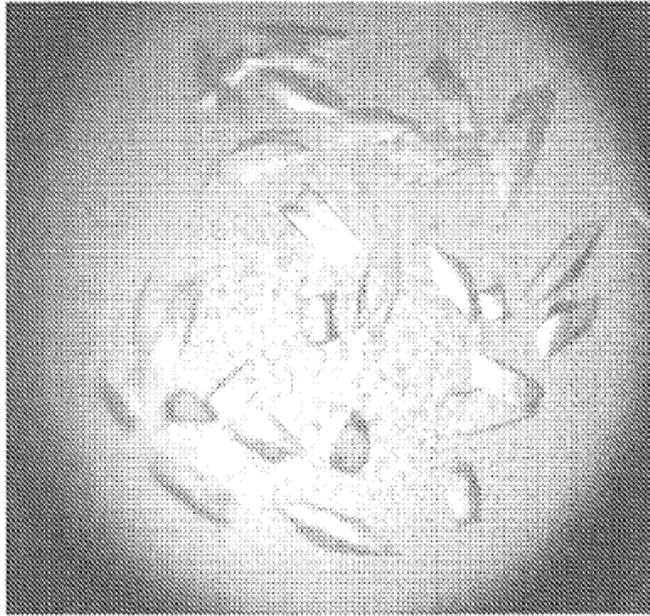


Fig. 33

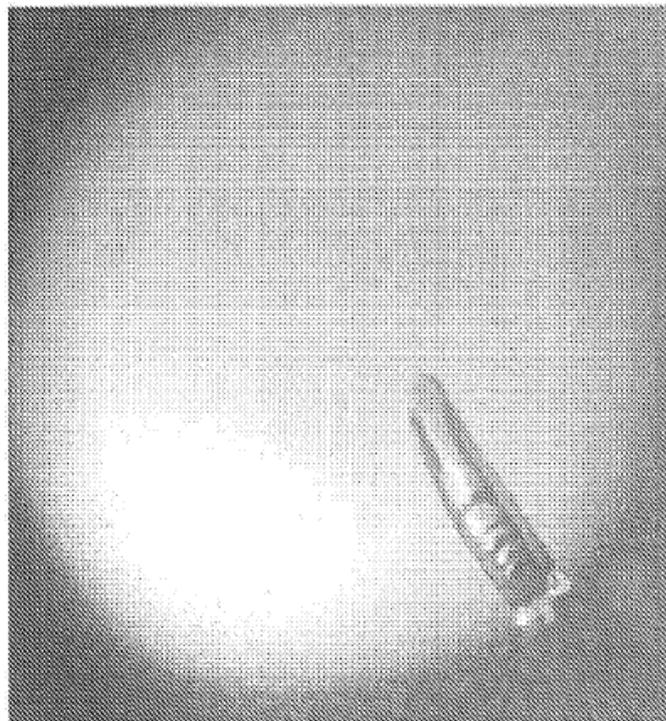
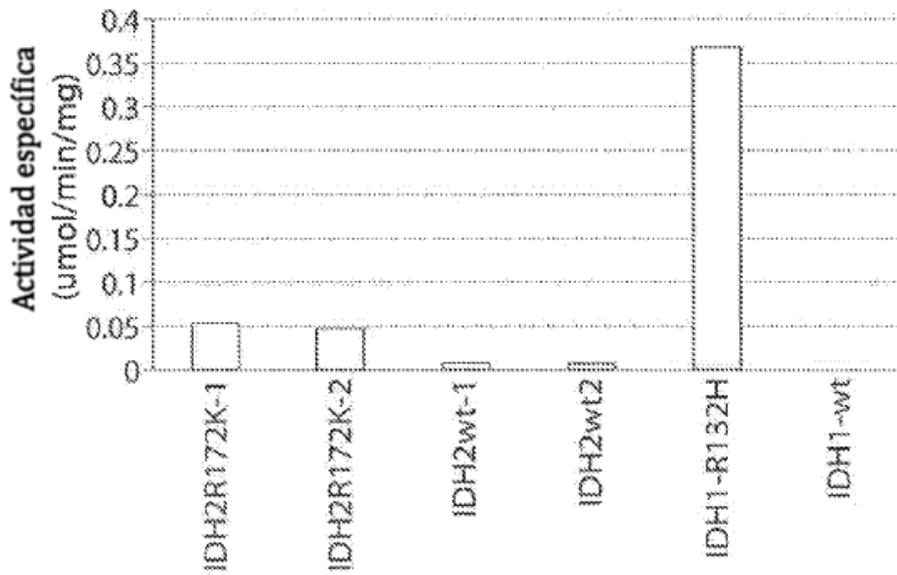


Fig. 34

**El mutante IDH2 R172K tiene catálisis reductiva elevada de NADPH comparado con la enzima de TS**



Comparación de la reducción de NADPH entre enzimas IDH2-R172K, IDH2-ts, IDH1-R132H, y IDH1- ts. Las concentraciones finales de reactante para cada reacción fueron las siguientes:  
 20mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 10% Glicerol, 0.03% BSA, diversas enzimas (1-120 ug/mL), 1 mM NADPH, 5 mM aKG.

Fig. 35

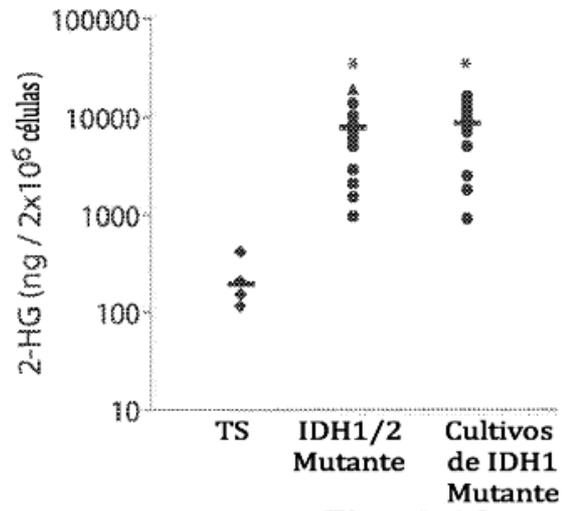


Fig. 36A

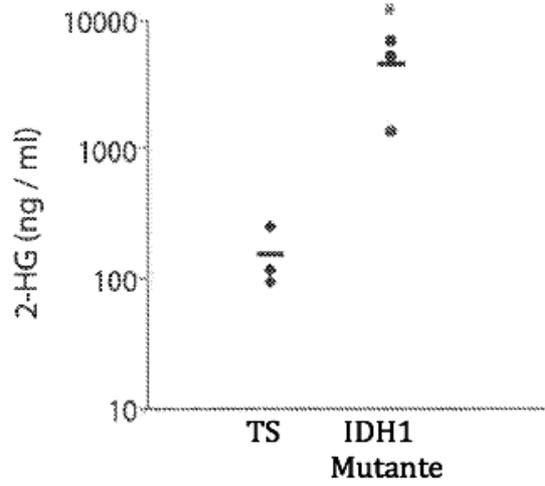


Fig. 36B

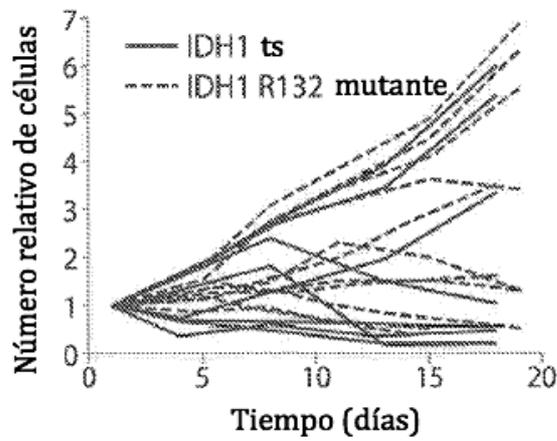
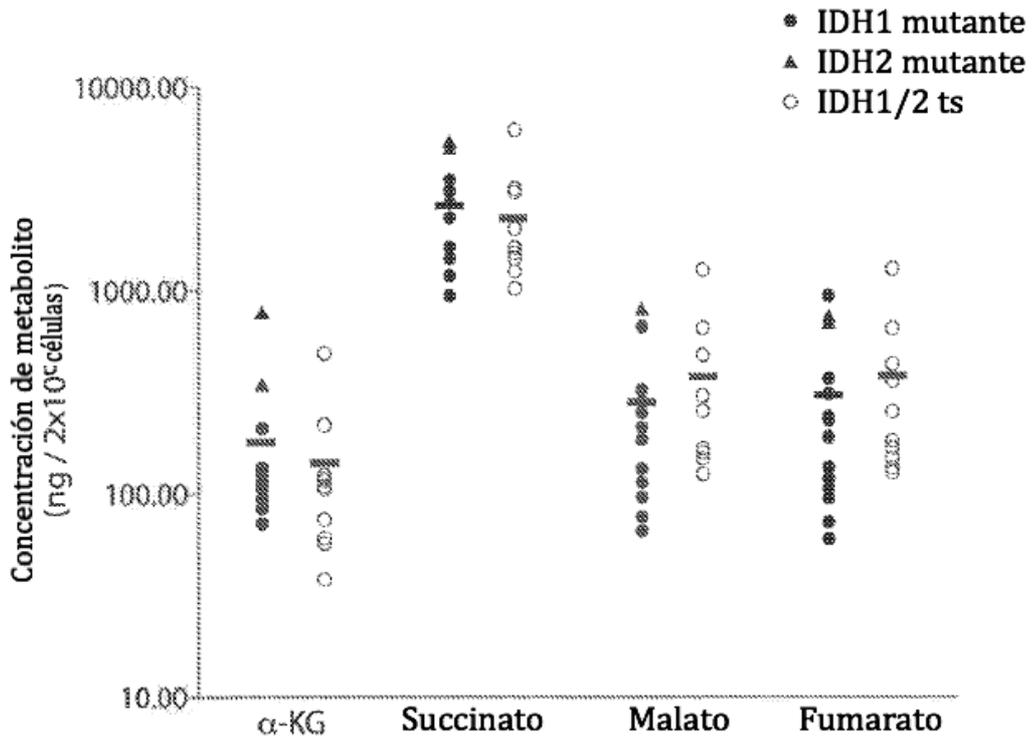


Fig. 36C



Las células de AML con mutante IDH1/2 no muestran niveles alterados de metabolitos de carbono central

Fig. 37

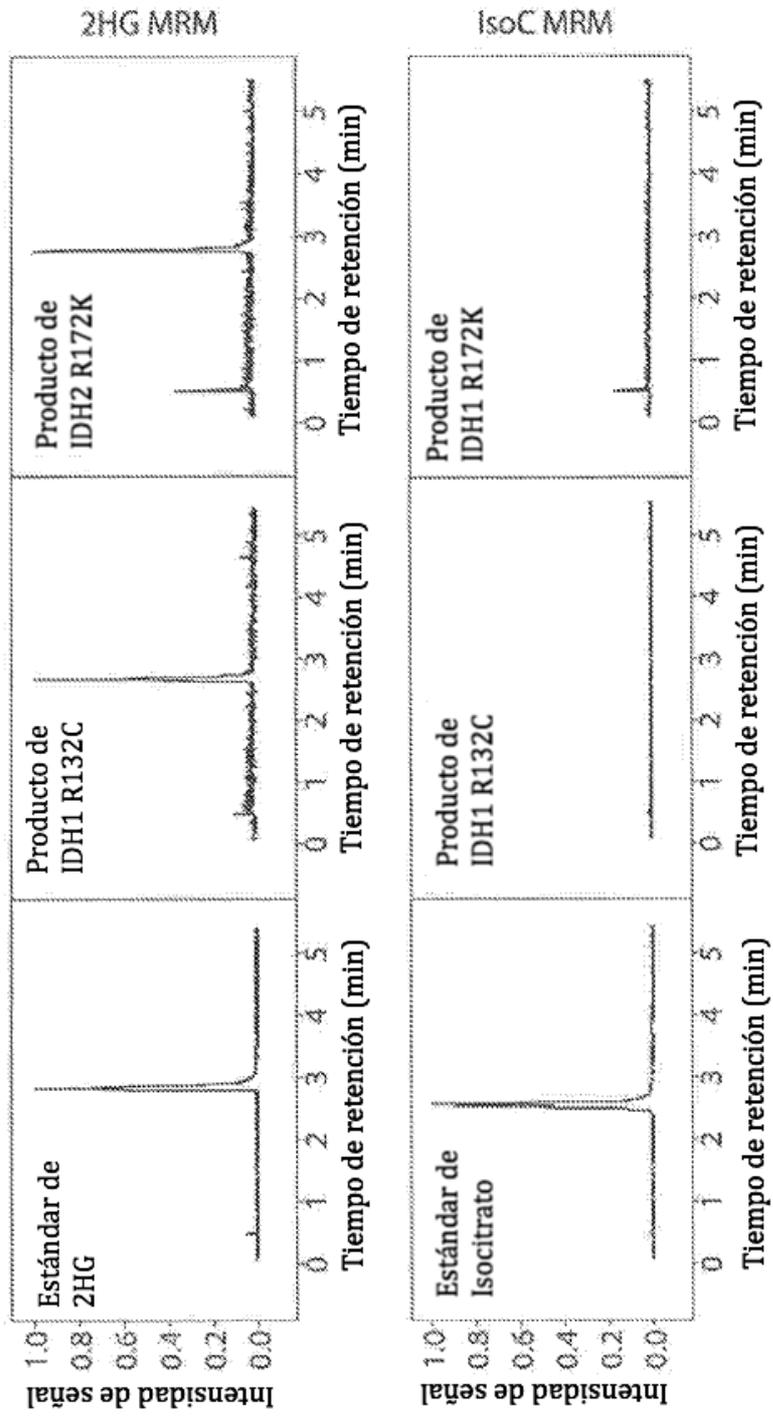


Fig. 38

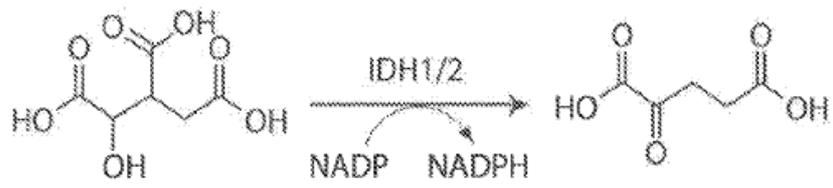


Fig. 39A



Fig. 39B