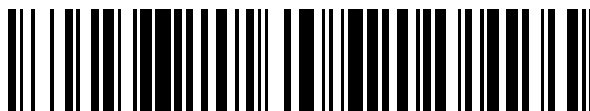


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 872**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/48** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**C40B 30/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/US2011/040918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11160042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11796526 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2582836**

54 Título: **Moduladores PRPK-TPRKB y sus usos**

30 Prioridad:

**18.06.2010 US 356554 P**

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

**23.04.2018**

73 Titular/es:

**TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)  
1-27, Kandanishiki-choChiyoda-ku  
Tokyo 101-8444, JP**

72 Inventor/es:

**PARK, EUN, SUN;  
PELISH, HENRY, E.;  
CLARKE, ASTRID, S.;  
WILLIAMS, GRACE, L.;  
CASTALDI, MARIA, PAOLA;  
AREFOLOV, ALEXANDER;  
RING, JENNIFER, E.;  
SHAIR, MATTHEW, D. y  
KING, RANDALL, W.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 664 872 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

Moduladores PRPK-TPRKB y sus usos

5 **Antecedentes de la invención**

10 Revlimid® (lenalidomida) es un fármaco de molécula pequeña aprobado por la FDA desarrollado y comercializado por Celgene para el tratamiento del mieloma múltiple (MM) en combinación con dexametasona y para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos en pacientes con una delección cromosómica 5q específica. La diana celular y el mecanismo de acción de Revlimid® son desconocidos en la técnica. En 2009, las ventas de Revlimid® alcanzaron 1700 millones de dólares y se espera que las ventas en 2010 excedan 2000 millones de dólares, haciendo que Revlimid® sea uno de los productos de oncología más exitosos introducidos en el comercio en los últimos cinco años. Basándose en este éxito comercial demostrado y la ausencia de cualquier fármaco terapéutico competitivo aprobado por la FDA con un mecanismo de acción similar, el posible valor económico de la(s) diana(s) anticancerígenas demostradas de Revlimid® (lenalidomida) es considerable.

20 Revlimid® pertenece a una clase de compuestos denominados fármacos inmunomoduladores (IMiD) que incluyen los análogos talidomida (aprobada por la FDA para MM y lepra) y pomalidomida (actimid™, en desarrollo por Celgene). Thomson Pharma ha proyectado que las ventas anuales de fármaco Revlimid® alcanzarían 3800 millones de dólares en 2013. Debido a los conocidos efectos teratogénicos de la talidomida, Revlimid® se vende bajo un programa de mitigación de riesgos establecido por la FDA con una "advertencia de recuadro negro" que describe los riesgos de defectos de nacimiento. Recientemente, la proteína diana responsable de la teratogenicidad de la talidomida se publicó como Cereblon (CRBN) (Ito y col., Science 327: 1345-1350 (2010)); sin embargo, aún se desconocen la(s) diana(s) anticancerígena(s) de IMiD.

25 Miyoshi, A. y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, 303 (2003) 309-405 divulga un complejo PRPK/TPRKB que tiene actividad de proteína quinasa.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención abarca el reconocimiento de que compuestos tales como lenalidomida, pomalidomida y talidomida interactúan con un complejo PRPK/TPRKB con el fin de afectar sus actividades. La presente invención abarca además el reconocimiento de que PRPK/TPRKB interactúa con OSGEP y LAGE3 y sus homólogos para formar un complejo de KEOPS humano. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la modulación de un complejo PRPK/TPRKB, un complejo KEOPS o cualquier subunidad de los mismos es útil para tratar diversas enfermedades, trastornos o afecciones.

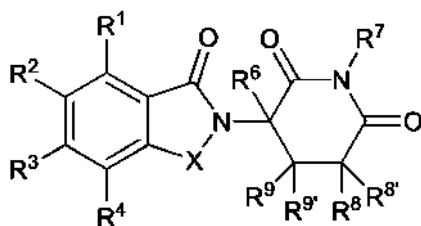
40 La presente invención proporciona métodos para identificar un agente que interactúa con (*p. ej.*, modula) un complejo PRPK/TPRKB que comprende proporcionar un sistema que comprende PRPK y TPRKB, proporcionar uno o más agentes de prueba, poner en contacto el uno o más agentes de prueba con el sistema, y detectar una interacción entre al menos uno de los agentes de prueba y al menos uno de PRPK y TPRKB como se define adicionalmente en la reivindicación 1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar un agente que interactúa (*p. ej.*, modula) un complejo KEOPS que comprende proporcionar un sistema que comprende PRPK (también conocido como TP53RK), TPRKB, OSGEP y LAGE3 y sus homólogos, proporcionar uno o más agentes de prueba, poner en contacto uno o más agentes de prueba con el sistema, y detectar una interacción entre al menos uno de los agentes de prueba y al menos uno de PRPK, TPRKB, OSGEP, y LAGE3 y sus homólogos. También se divulgan métodos para identificar un agente que interactúa (*p. ej.*, modula) PRPK, TPRKB, OSGEP, o LAGE3 y sus homólogos que comprenden proporcionar un sistema que comprende PRPK, TPRKB, OSGEP, o LAGE3 y sus homólogos, proporcionar uno o más agentes de prueba, poner en contacto el uno o más agentes de prueba con el sistema, y detectar una interacción entre al menos uno de los agentes de prueba y PRPK, TPRKB, OSGEP o LAGE3 y sus homólogos. En algunas realizaciones, cualquier método de identificación de un agente comprende proporcionar una pluralidad de agentes de prueba. En algunas realizaciones, dos o más miembros de agentes de prueba de dicha pluralidad comparten al menos un elemento o resto estructural común. En algunas realizaciones, dos o más miembros de agentes de prueba de dicha pluralidad comparten un elemento de estructura de núcleo.

50 En algunas realizaciones, PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK/TPRKB o complejo KEOPS como se describe en el presente documento es PRPK humana, TPRKB humana, OSGEP humana, LAGE3 humana y sus homólogos, complejo PRPK/TPRKB humano, o complejo KEOPS humano.

60 En algunas realizaciones, un agente de prueba modula PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK/TPRKB y/o complejo KEOPS pero no modula CRBN.

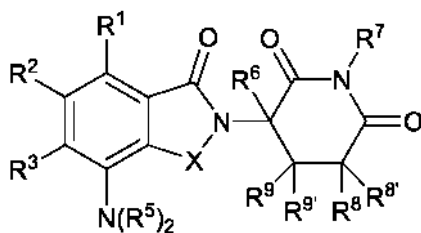
65 La presente invención también divulga moduladores de un complejo PRPK/TPRKB y/o moduladores de un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente de los mismos. Un modulador de acuerdo con la presente invención es un agente descubierto para modular un complejo PRPK/TPRKB y/o moduladores de un complejo KEOPS y/o

cualquier subunidad o componente del mismo usando los métodos descritos en el presente documento que tiene una estructura de Fórmula I:



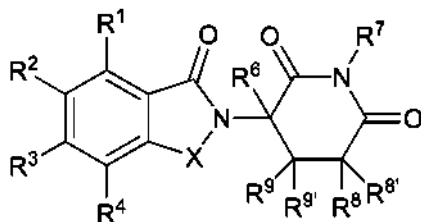
I

5 en la que X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son como se define y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un modulador de acuerdo con la presente invención tiene una estructura de Fórmula II:



II

10 en la que X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son como se define y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un modulador de acuerdo con la presente invención tiene una estructura de Fórmula III:



III

15 en la que X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son como se define y se describe en el presente documento.

También se divulgan métodos para inhibir la proliferación celular que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar una disminución en la proliferación celular en comparación con un control. También se divulgan métodos para inhibir la proliferación de células B que comprende poner en contacto una célula B con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar una disminución en la proliferación de células B en comparación con un control. También se divulgan métodos para inducir la producción de IL-2 que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar un aumento en la producción de IL-2 en comparación con un control. También se divulgan métodos para inhibir o activar la producción de TNF- $\alpha$  que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  en comparación con un control.

La presente invención también divulga métodos y reactivos, que incluyen compuestos y/o composiciones, útiles en medicina. Se divulgan métodos para tratar una enfermedad, un trastorno o una afección asociada a un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo. También se divulga un método para tratar la inflamación, enfermedad inflamatoria o enfermedad autoinmune que comprende administrar a un mamífero que necesita tratamiento una cantidad eficaz de al menos un modulador de un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente de la misma. También se divulga un método para

tratar una afección cancerígena u oncogénica que comprende administrar a un mamífero que necesita tratamiento una cantidad eficaz de al menos un modulador de un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente de la misma.

## 5 Breve descripción de los dibujos

*Figura 1.* Actividades de agentes de prueba a modo de ejemplo en la inhibición del crecimiento y ensayos de producción de IL-2.

10 *Figura 2.* PRPK y TPRKB capturados con reactivo de afinidad a base de pomalidomida. PRPK y TPRKB solo se capturaron a partir de líneas celulares sensibles (Jurkat, Jeko-1, HS-Sultan); PRPK y TPRKB no se capturaron de las células HeLa S3.

*Figura 3.* PRPK y TPRKB capturados con tres reactivos de afinidad procedentes de compuestos de Fórmula I. Una versión acilada no capturó PRPK o TPRKB. Las proteínas marcadas con C-terminal se capturaron como proteínas endógenas.

15 *Figura 4.* Resultados que muestran que la pomalidomida, lenalidomida, talidomida, CMPD 31, y CMPD 29 compiten por la unión de la diana PRPK/TPRKB al reactivo de afinidad a base de pomalidomida, pero el CMPD 30 no lo hace.

*Figura 5.* Resultados que muestran que el reactivo de afinidad a base de pomalidomida captura PRPK y TPRKB, pero no PRPK o TPRKB solos, que soportan el complejo PRPK/TPRKB como la diana.

20 *Figura 6.* Resultados que muestran que PRPK y TPRKB interactúan en células Jurkat, que soportan la formación del complejo PRPK/TPRKB en un contexto celular. El complejo PRPK/TPRKB estabiliza TPRKB en las células Jurkat.

*Figura 7.* Resultados de la cromatografía de afinidad cuantitativa que muestran ortólogos humanos de la unión del complejo de KEOPS en levaduras.

25 *Figura 8.* Resultados que muestran que CMPD 31 suprime la actividad de lenalidomida y pomalidomida en la inducción de la producción de IL-2 y la inhibición del crecimiento de células B.

*Figura 9.* Activación de células asesinas naturales en PBMC por lenalidomida y pomalidomida.

## Definiciones

30 *Aminoácido:* Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, un aminoácido tiene la estructura general  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido de origen natural. En algunas realizaciones, un aminoácido es un aminoácido sintético  
35 o no natural; en algunas realizaciones, un aminoácido es un D-aminoácido (*p. ej.*, aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico); en algunas realizaciones, un aminoácido es un L-aminoácido. "Aminoácido convencional" se refiere a cualquiera de los veinte L-aminoácidos convencionales que se encuentran comúnmente en péptidos de origen natural. "Aminoácidos no convencionales o poco convencionales" se refiere a cualquier aminoácido, distinto de los aminoácidos convencionales, independientemente de si se preparan sintéticamente o se  
40 obtienen de una fuente natural. Tal como se usa en el presente documento, "aminoácido sintético o no natural" abarca aminoácidos químicamente modificados, que incluyen pero sin limitación, sales, derivados de aminoácidos (tales como amidas) y/o sustituciones. Los aminoácidos, incluidos los aminoácidos carboxi y/o amino terminales en péptidos, se pueden modificar mediante metilación, amidación, acetilación y/o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida circulante del péptido sin afectar negativamente a su actividad. Ejemplos de  
45 aminoácidos no convencionales o no naturales incluyen, pero sin limitación, citrulina, ornitina, norvalina, 4-(*E*)-butenil-4(*R*)-metil-N-metiltreonina (MeBmt), N-metil-leucina (MeLeu), ácido aminoisobutírico, estatina y N-metil-alanina (MeAla). Los aminoácidos pueden participar en un enlace disulfuro. El término "aminoácido" se usa de forma indistintamente con "resto de aminoácido", y puede referirse a un aminoácido libre y/o a un resto de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un  
50 resto de un péptido.

*Animal:* Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino animal. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier fase de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier fase de desarrollo. En determinadas  
55 realizaciones, el animal no humano es un mamífero (*p. ej.*, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado, un primate, y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces, insectos y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal modificado genéticamente por ingeniería genética y/o un clon.

60 *Anticuerpo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina, ya sea natural o producida entera o parcialmente sintéticamente. Todos los derivados de los mismos que mantienen la capacidad de unión específica también se incluyen en el término. El término también incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran parte homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Dichas proteínas pueden obtenerse de fuentes naturales, o producirse parcial o  
65 enteramente sintéticamente. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede ser miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD, y IgE. Tal

como se usa en el presente documento, las expresiones "fragmento de anticuerpo" o "porción característica de un anticuerpo" se usan indistintamente y se refieren a cualquier derivado de un anticuerpo que es inferior a la longitud completa. En general, un fragmento de anticuerpo conserva al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv diacuerpo y fragmentos Fd. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia de anticuerpo parcial. Como alternativa o además, un fragmento de anticuerpo puede producirse entera o parcialmente sintéticamente. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. Como alternativa o además, un fragmento de anticuerpo puede comprender cadenas múltiples que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional normalmente comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más normalmente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

**Aproximadamente:** Tal como se usa en el presente documento, "alrededor de" o "aproximadamente", tal como se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En determinadas realizaciones, el término "alrededor de" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que pertenecen al 25 %, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, o menos en cualquier dirección (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo en el contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100% de un posible valor).

**Biológicamente activo:** Tal como se usa en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" se refiere a una característica de cualquier sustancia que tiene actividad en un sistema biológico y/u organismo. Por ejemplo, una sustancia que, cuando se administra a un organismo, tiene un efecto biológico sobre ese organismo, se considera que es biológicamente activa. En realizaciones particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se denomina normalmente una porción "biológicamente activa".

**Diana biológica:** Tal como se usa en el presente documento, la expresión "diana biológica" se refiere a cualquier diana que puede utilizarse en los sistemas, métodos, ensayos y/o composiciones descritos en el presente documento. Una "diana biológica" puede referirse a uno o más de los siguientes: (1) una proteína PRPK, un ácido nucleico que codifica PRPK, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (2) una proteína TPRKB, un ácido nucleico que codifica TPRKB, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (3) una proteína OSGEP, un ácido nucleico que codifica OSGEP, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (4) un LAGE3 y su proteína homóloga, un ácido nucleico que codifica LAGE3 y sus homólogos, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; y/o (5) un complejo de cualquiera dos o más de PRPK, TPRKB, OSGEP, y/o LAGE3 y sus homólogos.

**Porción característica:** Tal como se usa en el presente documento, la expresión "porción característica" de una sustancia, en el sentido más amplio, es aquella que comparte algún grado de secuencia y/o identidad estructural y/o al menos una característica funcional con la sustancia intacta relevante. Por ejemplo, una "porción característica" de una proteína o polipéptido es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o una colección de tramos continuos de aminoácidos, que juntos son característicos de una proteína o polipéptido. En algunas realizaciones, cada uno de dichos tramos continuos generalmente contendrá al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 29, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos. En general, una porción característica es aquella que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la proteína intacta relevante. En algunas realizaciones, la porción característica puede ser biológicamente activa y/o puede conferir actividad biológica a un polipéptido en el que está incluido.

**Control:** Tal como se usa en el presente documento, el término "control" tiene su significado entendido en la técnica de ser un patrón frente al cual se comparan los resultados. Normalmente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables con el fin de llegar a una conclusión sobre dichas variables. En algunas realizaciones, un control es una reacción o un ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción de ensayo o un ensayo para proporcionar un elemento de comparación. En un experimento, se aplica el "ensayo" (es decir, la variable que se ensaya). En el segundo experimento, el "control", la variable que se ensaya no se aplica. En algunas realizaciones, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas realizaciones, un control es o comprende un registro impreso o salvado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

**Elemento de estructura de núcleo:** Tal como se usa en el presente documento, la expresión "elemento de estructura de núcleo" se refiere a una característica o colección de características de una molécula que representa características específicas responsables de la actividad biológica o la falta de la misma. Por ejemplo, se puede decir

que los agentes de prueba que contienen un resto de isoindolinona comparten un elemento de estructura de núcleo. Un elemento de estructura de núcleo puede ser, *p. ej.*, un sistema de anillo, o un elemento de estructura de núcleo puede ser, *p. ej.*, una estructura lineal que es similar en longitud e identidad de átomo.

5 *Modificado por ingeniería:* En general, la expresión "modificado por ingeniería" se refiere al aspecto de haber sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, un polinucleótido se considera "modificado por ingeniería" cuando dos o más secuencias, que no están unidas entre sí en ese orden en la naturaleza, son manipuladas por la mano del hombre para estar directamente unidas entre sí en el polinucleótido modificado por ingeniería. Por ejemplo, un polinucleótido manipulado por ingeniería comprende una secuencia reguladora que se encuentra en la naturaleza en asociación operativa con una primera secuencia codificante pero no en asociación operativa con una segunda secuencia codificante, está unido por la mano del hombre de modo que está operativamente asociado con la segunda secuencia codificante.

15 *Expresión:* Tal como se usa en el presente documento, "expresión" de una secuencia de ácido nucleico se refiere a uno o más de los siguientes eventos: (1) producción de un molde de ARN a partir de una secuencia de ADN (*p. ej.*, mediante transcripción); (2) procesamiento de un transcrito de ARN (*p. ej.*, mediante corte y empalme, edición y/o formación en el extremo 3'); (3) traducción de un ARN en un polipéptido o proteína; (4) modificación postraduccional de un polipéptido o proteína.

20 *Heterólogo:* El término "heterólogo", tal como se usa en el presente documento para referirse a ácidos nucleicos (*p. ej.*, ácidos nucleicos que incluyen secuencias reguladoras y/o genes) o polipéptidos, se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que se introduce artificialmente en una célula y/o no se produce naturalmente en la célula en la que está presente. En algunas realizaciones, un ácido nucleico heterólogo tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica a la de un ácido nucleico presente de forma natural en la célula. En muchas realizaciones, un ácido nucleico heterólogo tiene una secuencia de nucleótidos que es diferente de la de cualquier ácido nucleico que está presente de forma natural en la célula. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que es heterólogo con una célula particular tiene una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la de un ácido nucleico que se encuentra de forma natural en un organismo fuente que es diferente de la célula en la que se introduce el ácido nucleico heterólogo.

30 *Célula huésped:* Tal como se usa en el presente documento, la "célula huésped" es una célula que se manipula de acuerdo con la presente divulgación. Una "célula huésped modificada", tal como se usa en el presente documento, es cualquier célula huésped que ha sido modificada, modificada por ingeniería o manipulada de acuerdo con la presente divulgación en comparación con una célula parental por lo demás idéntica, y/o en comparación con una célula de referencia particular (*p. ej.*, una célula de tipo silvestre).

35 *Introducir:* El término "introducir", tal como se usa en el presente documento con referencia a la introducción de un ácido nucleico en una célula u organismo, pretende tener su significado más amplio y abarcar la introducción, por ejemplo, mediante métodos de transformación (*p. ej.*, transformación mediada por cloruro de calcio, electroporación, bombardeo de partículas), y también la introducción mediante otros métodos que incluyen trasducción, conjugación y apareamiento. En algunas realizaciones, se utiliza un vector para introducir un ácido nucleico en una célula u organismo.

40 *In vitro:* Tal como se usa en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, *p. ej.*, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, *etc.*, en lugar de dentro de un organismo multicelular.

*In vivo:* Tal como se usa en el presente documento, la expresión "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular tal como un animal no humano.

50 *Aislado:* Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una sustancia y/o entidad que ha sido (1) separada de al menos algunos de los componentes con los que se asoció cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) producida, preparada y/o fabricada por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas se pueden separar de al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99%, sustancialmente el 100 %, o el 100 % de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas realizaciones, los agentes aislados tienen una pureza de más de aproximadamente 80 %, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, sustancialmente 100 %, o 100 %. Tal como se usa en el presente documento, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula aislada" se refiere a una célula no contenida en un organismo multicelular.

65 *Modificado:* El término "modificado" puede usarse en el presente documento para referirse a una entidad (*p. ej.*, una célula u organismo) que ha sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una

modificación puede ser o comprender cualquier modificación química, fisiológica, genética u otra modificación que altere adecuadamente las características de un organismo huésped en comparación con un organismo de referencia, por lo demás idéntico, no sometido a la modificación. En la mayoría de las realizaciones, una modificación comprenderá una modificación genética. En algunas realizaciones, una modificación comprende al menos una modificación química, fisiológica, genética u otra modificación; en algunas realizaciones, una modificación comprende más de una modificación química, fisiológica, genética u otra modificación. En determinados aspectos en los que se utiliza más de una modificación, dichas modificaciones pueden comprender cualquier combinación de modificación química, fisiológica, genética u otra modificación (*p. ej.*, una o más modificación (es) genética (s), química (s) y/o fisiológica(s)).

**Modulador:** Tal como se usa en el presente documento, el término "modulador" normalmente se refiere a un compuesto que altera o provoca una actividad. Por ejemplo, la presencia de un modulador puede dar como resultado un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada actividad en comparación con la magnitud de la actividad en ausencia del modulador. En determinadas realizaciones, un modulador es un inhibidor o un antagonista, que disminuye la magnitud de una o más actividades. En determinadas realizaciones, un inhibidor evita completamente una o más actividades biológicas. En determinadas realizaciones, un modulador es un activador o un agonista, que aumenta la magnitud de al menos una actividad. En determinadas realizaciones, la presencia de un modulador da como resultado una actividad que no se produce en ausencia del modulador. Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "que inhibe", "que reduce", "que evita" o "que antagoniza", o cualquier variación de estos términos tal como se usa en el presente documento, se refieren a una disminución medible de una actividad biológica. En algunas realizaciones, la disminución es una reducción del 10 %, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en la actividad biológica relativa a un control. Tal como se usa en el presente documento, los términos "que estimula", "que aumenta", o "que agoniza", o cualquier variación de estos términos tal como se usa en el presente documento, se refieren a un aumento medible de una actividad biológica. En algunas realizaciones, el aumento es un aumento del 10 %, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en la actividad biológica relativa a un control. Un modulador también puede ser un "modulador silencioso", en el que el modulador interacciona (*p. ej.*, se une a) con la diana de interés pero no provoca o altera una actividad de la diana.

**Producto natural:** Tal como se usa en el presente documento, el término "producto natural" se refiere a un compuesto químico o sustancia que es o puede ser producida por un organismo vivo. En algunas realizaciones, un producto natural no es un biopolímero tal como un polinucleótido, péptido o polipéptido o un oligosacárido. Un compuesto que es estructuralmente idéntico a un producto natural se puede denominar un "producto natural" incluso si el compuesto en sí mismo se prepara de hecho por la mano del hombre (*p. ej.*, mediante síntesis química).

**Ácido nucleico:** Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico", en su sentido más amplio, se refiere a cualquier compuesto y/o sustancia que puede incorporarse en una cadena de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" abarca ARN así como ADN y/o ADNc monocatenario y/o bicatenario. Además, los términos "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y/o términos similares incluyen análogos de ácido nucleico, es decir, análogos que tienen una cadena principal distinta de un fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que son conocidos en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, se consideran dentro del alcance de la presente invención. La expresión "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y/o codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y/o ARN pueden incluir intrones.

**Péptido:** Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" o "polipéptido" se refiere a una macromolécula que comprende una multiplicidad de amino o iminoácidos (o sus equivalentes) en el enlace peptídico. En la notación de polipéptidos o péptidos usada en el presente documento, la dirección de la mano izquierda es la dirección del amino terminal y la dirección de la derecha es la dirección del carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención convencional. Los péptidos pueden incluir restos distintos de aminoácidos (*p. ej.*, pueden ser glicoproteínas, proteoglicanos, etc.) y/o pueden procesarse o modificarse de otro modo. Los péptidos pueden contener L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos, y pueden contener cualquiera de diversas modificaciones o análogos de aminoácidos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, *p. ej.*, acetilación terminal, amidación, etc. En algunas realizaciones, los péptidos pueden comprender aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, aminoácidos sintéticos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los péptidos pueden contener hasta 25 aminoácidos. Tal como se usa en el presente documento, los péptidos que contienen hasta 25 aminoácidos también se denominan péptidos cortos. El término "péptido" o "polipéptido" también se usa para referirse a clases funcionales específicas de polipéptidos, tales como, por ejemplo, desaturasas, elongasas. Los expertos en la técnica apreciarán que el término "polipéptido" está destinado a ser suficientemente general como para abarcar no solo polipéptidos que tienen la secuencia completa enumerada en el presente documento (o en una referencia o base de datos específicamente mencionada en el presente documento), sino también para abarcar polipéptidos que representan fragmentos funcionales (*es decir*, fragmentos que conservan al menos una actividad) de dichos polipéptidos completos. Además, los expertos en la materia entienden que las secuencias de proteínas generalmente toleran alguna sustitución sin destruir la actividad. Así, cualquier polipéptido que conserva actividad y comparte al menos aproximadamente 30-40 % de identidad de secuencia global, a menudo mayor que

aproximadamente 50 %, 60 %, 70 % u 80 %, y que generalmente incluye adicionalmente al menos una región de identidad mucho mayor, a menudo mayor que 90 % o incluso 95 %, 96%, 97%, 98 % o 99 % en una o más regiones altamente conservadas, que generalmente abarcan al menos 3-4 y a menudo hasta 20 o más aminoácidos, con otro polipéptido de la misma clase, se abarcan dentro del término relevante "polipéptido" tal como se usa en el presente documento. Los expertos en la técnica pueden determinar otras regiones de similitud y/o identidad mediante el análisis de las secuencias de diversos polipéptidos descritos en el presente documento. Como es sabido por los expertos en la técnica, se conocen diversas estrategias, y hay herramientas disponibles, para realizar comparaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos con el fin de evaluar los grados de identidad y/o similitud. Estas estrategias incluyen, por ejemplo, alineación manual, alineación de secuencias asistida por ordenador y combinaciones de los mismos. Un número de algoritmos (que generalmente están implementados por ordenador) para realizar la alineación de secuencias están ampliamente disponibles, o pueden ser producidos por un experto en la técnica. Los algoritmos representativos incluyen, *p. ej.*, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482); el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443); la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 1988, 85: 2444); y/o mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (*p. ej.*, GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.). Los programas informáticos fácilmente disponibles que incorporan dichos algoritmos incluyen, por ejemplo, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST, PILEUP, CLUSTALW, *etc.* Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas. Como alternativa, el facultativo puede usar parámetros no predeterminados dependiendo de sus requisitos experimentales u otros (véase por ejemplo, ncbi.nlm.nih.gov).

*Puro*: Tal como se usa en el presente documento, una sustancia y/o entidad es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. Por ejemplo, una preparación que contiene más de aproximadamente el 90 % de una sustancia y/o entidad particular normalmente se considera que es una preparación pura. En algunas realizaciones, una sustancia y/o entidad tiene al menos una pureza del 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98 %, o 99 %.

*Agente de referencia*: La expresión "agente de referencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia (*p. ej.*, un compuesto químico, una molécula pequeña, un producto natural, una proteína, un péptido, un ácido nucleico) que tiene una actividad conocida en un ensayo particular. Un agente de referencia también puede denominarse "patrón". Un agente de referencia puede ser un patrón positivo, que muestra actividad positiva en un ensayo particular, o puede ser un patrón negativo, conocido por ser inactivo en un ensayo particular. Un agente de referencia puede ser contemporáneo de un agente de interés o puede ser un patrón histórico. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y un agente de referencia se evalúan en condiciones de ensayo comparables.

*Molécula pequeña*: En general, se entiende en la técnica que una "molécula pequeña" es una molécula orgánica que tiene un tamaño menor que aproximadamente 5 kilodalton (Kd). En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de aproximadamente 4 Kd, aproximadamente 3 Kd, aproximadamente 2 Kd, o aproximadamente 1 Kd. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es menor de aproximadamente 800 daltons (D), aproximadamente 600 D, aproximadamente 500 D, aproximadamente 400 D, aproximadamente 300 D, aproximadamente 200 D, o aproximadamente 100 D. En algunas realizaciones, una molécula pequeña es menor de aproximadamente 2000 g/mol, menor de aproximadamente 1500 g/mol, menor de aproximadamente 1000 g/mol, menor de aproximadamente 800 g/mol o menor de aproximadamente 500 g/mol. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son poliméricas. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son proteínas, péptidos o aminoácidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son ácidos nucleicos o nucleótidos. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas no son sacáridos o polisacáridos.

*Organismo fuente*: Un "organismo fuente", tal como se usa ese término en el presente documento, es un organismo que contiene o produce naturalmente un polinucleótido, polipéptido u otro compuesto (*p. ej.*, un ácido nucleico heterólogo) que debe introducirse de acuerdo con la presente invención en un receptor o célula huésped. En algunas realizaciones, el organismo fuente particular a seleccionar no es esencial para la práctica de la presente divulgación. Las consideraciones relevantes pueden incluir, por ejemplo, qué tan estrechamente relacionados están la fuente potencial y los organismos huésped en la evolución, o qué tan relacionado están el organismo fuente con otros organismos fuente de los que se han seleccionado secuencias de otros ácidos nucleicos y/o polipéptidos relevantes. Cuando una célula huésped debe introducir y/o expresar una pluralidad de diferentes ácidos nucleicos heterólogos, diferentes secuencias pueden ser de diferentes organismos fuente, o del mismo organismo fuente. Por dar un solo ejemplo, en algunos casos, los polipéptidos individuales pueden representar subunidades individuales de una actividad de proteína compleja y/o se puede requerir que trabajen en concierto con otros polipéptidos con el fin de alcanzar los objetivos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, con frecuencia será deseable que dichos polipéptidos sean del mismo organismo fuente, y/o estén suficientemente relacionados para funcionar de manera adecuada cuando se expresan juntos en una célula huésped. En algunas realizaciones, dichos polipéptidos pueden ser de organismos fuente diferentes, incluso no relacionados. Se entenderá además que, cuando un polipéptido heterólogo se va a expresar en una célula huésped, a menudo será deseable utilizar secuencias de ácido nucleico que codifiquen el polipéptido que se hayan ajustado para acomodar las preferencias de codones de la célula huésped y/o unir las secuencias codificantes con elementos reguladores activos en la célula huésped. En determinadas realizaciones, una secuencia génica que codifica un polipéptido dado se optimiza incluso cuando dicha



secuencia génica se obtiene de la propia célula huésped (y por tanto no es heteróloga). Por ejemplo, una secuencia génica que codifica un polipéptido de interés puede no ser codón optimizada para la expresión en una célula huésped dada aunque dicha secuencia génica esté aislada de la cepa de la célula huésped. En dichas realizaciones, la secuencia génica puede optimizarse adicionalmente para tener en cuenta las preferencias de codones de la célula huésped. Los expertos en la técnica tendrán en cuenta las preferencias de codones de la célula huésped y podrán emplear los métodos y reactivos descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica para acomodarlos.

*Sujeto:* Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier organismo al que pueden administrarse agentes o composiciones de acuerdo con la invención, p. ej., con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (p. ej., mamíferos tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y humanos, insectos; gusanos; etc.).

*Sustancialmente:* Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la condición cualitativa de mostrar la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

*Que padece:* Un individuo que "padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección.

*Susceptible a:* Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección no ha sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no mostrar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

*Agente terapéutico:* Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado. En algunas realizaciones, un agente terapéutico de la invención se refiere a un inhibidor peptídico o derivados del mismo de acuerdo con la invención.

*Índice terapéutico:* Tal como se usa en el presente documento, la expresión "índice terapéutico" se refiere a una medida cuantitativa de la selectividad de un fármaco cuando se comparan un efecto terapéutico ("E") y un efecto tóxico ("T"). El índice terapéutico puede calcularse entonces como  $ED_{50}/TD_{50}$ , a algún nivel arbitrario de respuesta observada en un sujeto que recibe el fármaco. El  $ED_{50}$  es la dosis requerida para generar la intensidad deseada del efecto terapéutico en el 50 % de los sujetos ensayados. El  $TD_{50}$  es la dosis requerida para generar el efecto tóxico en el 50 % de los sujetos ensayados.

*Tratamiento:* Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "que trata" se refiere a cualquier método usado para aliviar parcial o completamente, recuperar, mitigar, inhibir, evitar, retrasar el inicio de, reducir la gravedad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad y/o muestra solo signos tempranos de la enfermedad con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.

*Vector:* Tal como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación cromosómica extra y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes unidos de forma operativa se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

Las definiciones de grupos funcionales específicos, términos químicos y términos generales usados a lo largo de la memoria descriptiva se describen con más detalle a continuación. Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed., portada interior, y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe en la misma. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March March's Advanced Organic Chemistry, 5ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; Carruthers, Algunos métodos modernos de síntesis orgánica, 3ª edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

A menos que se indique lo contrario, se entiende que las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir todas las formas isómeras (p. ej., enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o

conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace Z y E e isómeros conformacionales Z y E. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautómeras de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Además, a menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en el presente documento pretenden incluir también compuestos que difieren solamente en presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las estructuras presentes incluyendo la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono  $^{13}\text{C}$ - o  $^{14}\text{C}$  enriquecido en C están dentro del alcance de la presente invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas de análisis, como sondas en ensayos biológicos o como agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención.

Cuando se prefiere un enantiómero particular, puede, en algunas realizaciones, proporcionarse sustancialmente libre del correspondiente enantiómero, y también puede denominarse "ópticamente enriquecido". "Enriquecido ópticamente", tal como se usa en el presente documento, significa que el compuesto está constituido por una proporción significativamente mayor de un enantiómero. En determinadas realizaciones, el compuesto está constituido por al menos aproximadamente 90 % en peso de un enantiómero preferente. En otras realizaciones, el compuesto está constituido por al menos aproximadamente 95 %, 98 % o 99 % en peso de un enantiómero preferente. Los enantiómeros preferentes se pueden aislar a partir de mezclas racémicas mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales o preparadas por síntesis asimétrica. Véase, por ejemplo, Jacques y *col.*, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, y *col.*, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, EL, *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, SH, *Tablas de agentes resolutivos y resoluciones ópticas* p. 268 (EL Eliel, Ed., Univ. de Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

*Acilo*: Tal como se usa en el presente documento, el término "acilo," se refiere a un grupo que tiene la fórmula general  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{X}1})_2$ ,  $-\text{C}(=\text{S})\text{R}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{X}1})_2$ , y  $-\text{C}(=\text{S})\text{S}(\text{R}^{\text{X}1})$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{X}1})\text{R}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{X}1})\text{OR}^{\text{X}1}$ ,  $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{X}1})\text{SR}^{\text{X}1}$ , y  $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{X}1})\text{N}(\text{R}^{\text{X}1})_2$ , en la que  $\text{R}^{\text{X}1}$  es hidrógeno; halógeno; hidroxilo sustituido o no sustituido; tiol sustituido o no sustituido; amino sustituido o no sustituido; acilo sustituido o no sustituido; un alifático cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; un heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; un alquilo cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; alqueno cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; alquino sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, alifaticoxi, heteroalifaticoxi, alquiloxi, heteroalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, alifaticotioxi, heteroalifaticotioxi, alquiltioxi, heteroalquiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, mono o di alifaticamino, mono- o di-heteroalifaticamino, mono o dialquilamino, mono- o di-heteroalquilamino, mono- o di-arilamino, o mono- o di-heteroarilamino; o dos grupos  $\text{R}^{\text{X}1}$  tomados juntos forman un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros. Ejemplos de grupos acilo incluyen aldehídos (-CHO), ácidos carboxílicos (-CO<sub>2</sub>H), cetonas, haluros de acilo, ésteres, amidas, iminas, carbonatos, carbamatos, y ureas. Los sustituyentes acilo incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los sustituyentes descritos en el presente documento, que dan como resultado la formación de un resto estable (*p. ej.*, alifático, alquilo, alqueno, alquino, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, acilo, oxo, imino, tiooxo, ciano, isociano, amino, azido, nitro, hidroxilo, tiol, halo, amino alifático, heteroalifaticamino, alquilamino, heteroalquilamino, arilamino, heteroarilamino, alquilarilo, arilalquilo, alifaticoxi, heteroalifaticoxi, alquiloxi, heteroalquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, alifaticotioxi, heteroalifaticotioxi, alquiltioxi, heteroalquiltioxi, ariltioxi, heteroariltioxi, aciloxi, y similares. cada uno de los cuales puede o no estar sustituidos adicionalmente).

*Alifático*: Tal como se usa en el presente documento, el término "alifático" o la expresión "grupo alifático" indica un resto hidrocarburo opcionalmente sustituido que puede ser de cadena lineal (es decir, no ramificado), ramificado o cíclico ("carbocíclico") y puede estar completamente saturado o puede contener una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alifáticos contienen 1-12 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono, y en otras realizaciones más, los grupos alifáticos contienen 1-3 átomos de carbono. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo, alqueno y alquino lineales o ramificados, e híbridos de los mismos, tales como (cicloalquil)alquilo, (cicloalqueno)alquilo o (cicloalquino)alquilo.

*Alqueno*: Tal como se usa en el presente documento, el término "alqueno" indica un grupo monovalente opcionalmente sustituido procedente de un resto alifático de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. En determinadas realizaciones, el grupo alqueno empleado en la invención contiene 2-6 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, el grupo alqueno empleado en la invención contiene 2-5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alqueno empleado en la invención contiene 2-4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alqueno empleado contiene 2-3 átomos de carbono. Los grupos alqueno incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, y similares.

*Alquilo*: Tal como se usa en el presente documento, el término alquilo se refiere a radicales hidrocarburo saturados

de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, procedentes de un resto alifático que contiene entre 1-6 átomos de carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. En algunas realizaciones, el grupo alquilo empleado en la invención contiene 1-5 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquilo empleado contiene 1-4 átomos de carbono. En aún otras realizaciones, el grupo alquilo contiene 1-3 átomos de carbono. En otra realización más, el grupo alquilo contiene 1-2 carbonos. Ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, sec-pentilo, iso-pentilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, dodecilo y similares.

*Alquinilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a un grupo monovalente opcionalmente sustituido procedente de un resto alifático de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. En determinadas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-6 átomos de carbono. En determinadas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en la invención contiene 2-4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquinilo empleado contiene 2-3 átomos de carbono. Los grupos alquinilo representativos incluyen, pero sin limitación, etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo, y similares.

*Ariilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "ariilo" usado solo o como parte de un resto mayor como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillo monocíclicos y bicíclicos opcionalmente sustituidos que tienen una un total de cinco a 10 miembros de anillo, en el que al menos un anillo en el sistema es aromático y en el que cada anillo en el sistema contiene de tres a siete miembros de anillo. El término "ariilo" puede usarse indistintamente con la expresión "anillo de ariilo". En determinadas realizaciones de la presente invención, "ariilo" se refiere a un sistema de anillo aromático que incluye, aunque sin limitación, fenilo, bifenilo, naftilo, antracilo y similares, que pueden llevar uno o más sustituyentes.

*Arialquilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "arialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo ariilo (y *col.*, un grupo aromático o heteroaromático).

*Cadena de hidrocarburo bivalente:* Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cadena de hidrocarburo bivalente" (también denominada un "grupo alquileo bivalente") es un grupo polimetileno, es decir,  $-(CH_2)_z-$ , en la que z es un número entero positivo de 1 a 30, de 1 a 20, de 1 a 12, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, de 2 a 30, de 2 a 20, de 2 a 10, de 2 a 8, de 2 a 6, de 2 a 4, o de 2 a 3. Una cadena de hidrocarburo bivalente sustituida es un grupo polimetileno en el que uno o más átomos de hidrógeno de metileno están sustituidos por un sustituyente. Los sustituyentes adecuados incluyen los descritos a continuación para un grupo alifático sustituido.

*Carbonilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "carbonilo" se refiere a un resto monovalente o bivalente que contiene un doble enlace carbono-oxígeno. Ejemplos no limitantes de grupos carbonilo incluyen aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, éster, amida, enonas, haluros de acilo, anhídridos, ureas, carbamatos, carbonatos, tioésteres, lactonas, lactamas, hidroxamatos, isocianatos, y cloroformatos.

*Cicloalifático:* Tal como se usa en el presente documento, los términos "cicloalifático", "carbociclo" o "carbocíclico", usados solos o como parte de un resto mayor, se refieren a un sistema de anillos cíclicos alifáticos monocíclicos o bicíclicos saturados o parcialmente insaturados opcionalmente sustituidos, como se describe en el presente documento, que tiene de 3 a 10 miembros. Los grupos cicloalifáticos incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, ciclooctilo, ciclooctenilo y ciclooctadienilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo tiene 3-6 carbonos.

*Halógeno:* Tal como se usa en el presente documento, los términos "halo" y "halógeno" se refieren a un átomo seleccionado entre flúor (flúor, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br), y yodo (yodo, -I).

*Heteroalifático:* Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroalifático" o la expresión "grupo heteroalifático", indican un resto hidrocarburo opcionalmente sustituido que tiene, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos, que puede ser de cadena lineal (es decir, no ramificado), ramificado o cíclico ("heterocíclico") y puede estar completamente saturado o puede contener una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático. A menos que se especifique lo contrario, los grupos heteroalifáticos contienen 1-6 átomos de carbono en los que 1-3 átomos de carbono se sustituyen opcional e independientemente por heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. En algunas realizaciones, los grupos heteroalifáticos contienen 1-4 átomos de carbono, en los que 1-2 átomos de carbono se sustituyen opcional e independientemente por heteroátomos seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre. En otras realizaciones más, los grupos heteroalifáticos contienen 1-3 átomos de carbono, en los que 1 átomo de carbono se sustituye opcional e independientemente por un heteroátomo seleccionado de oxígeno, nitrógeno y azufre. Los grupos heteroalifáticos adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos heteroalquilo, heteroalquenilo y heteroalquinilo.

*Heteroaralquilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heteroarilo, en el que las porciones de alquilo y heteroarilo están opcionalmente sustituidas independientemente.

*Heteroarilo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" usado solo o como parte de un resto mayor, p. ej., "heteroaralquilo", o "heteroaralcoxi", se refiere a un grupo opcionalmente sustituido que tiene de 5 a 10 átomos en el anillo, preferentemente 5, 6 o 9 átomos en el anillo; que tiene 6, 10, o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica; y que tiene, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolizínilo, purinilo, naftiridinilo, y pteridinilo. Los términos "heteroarilo" y "heteroar-", tal como se usa en el presente documento, también incluyen grupos en los que un anillo heteroaromático se fusiona con uno o más arilos, anillos carbocíclicos o heterocíclicos, en los que el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático. Ejemplos no limitantes incluyen indolilo, isoindolilo, benzotienilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, indazolilo, benzoimidazolilo, benzotiazolilo, quinolilo, isoquinolilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 4*H*-quinolizínilo, carbazolilo, acridinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, tetrahydroquinolinilo, y tetrahydroisoquinolinilo. Un grupo heteroarilo puede ser mono o bicíclico. El término "heteroarilo" puede usarse indistintamente con las expresiones "anillo heteroarilo", "grupo heteroarilo" o "heteroaromático", cualquiera de cuyas expresiones incluye anillos que están opcionalmente sustituidos.

*Heteroátomo:* Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" se refiere a nitrógeno, oxígeno o azufre, e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno o azufre, y cualquier forma cuaternizada de un nitrógeno básico. El término "nitrógeno" también incluye un nitrógeno sustituido.

*Heterocíclico:* Tal como se usa en el presente documento, los términos "heterociclo", "heterocíclilo", y las expresiones "radical heterocíclico", y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente y se refieren a un resto heterocíclico de 5 a 7 miembros monocíclico o de 7 a 10 miembros bicíclico opcionalmente sustituido que está saturado o parcialmente insaturado y que tiene, además de átomos de carbono, uno o más heteroátomos, tal como se ha definido anteriormente. Un anillo heterocíclico se puede unir a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable y cualquiera de los átomos del anillo puede estar opcionalmente sustituido. Ejemplos de dichos radicales heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahydrofuranilo, tetrahydrotienilo, pirrolidinilo, pirrolidonilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo, y quinuclidinilo. Los términos "heterociclo", "heterocíclilo", y las expresiones "anillo heterocíclilo", "grupo heterocíclico", "resto heterocíclico" y "radical heterocíclico", se usan indistintamente en el presente documento, y también incluyen grupos en los que un anillo heterocíclilo se fusiona con uno o más arilo, heteroarilo o anillos carbocíclicos, tales como indolinilo, 3*H*-indolilo, cromanilo, fenantridinilo, o tetrahydroquinolinilo, en los que el radical o punto de unión está en el anillo de heterocíclilo. Un grupo heterocíclilo puede ser mono o bicíclico. El término "heterocíclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heterocíclilo, en el que las porciones de alquilo y heterocíclilo están opcionalmente sustituidas independientemente.

*Insaturado:* Tal como se usa en el presente documento, el término "insaturado", significa que un resto tiene uno o más dobles o triples enlaces.

*Parcialmente insaturado:* Tal como se usa en el presente documento, el término "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. La expresión "parcialmente insaturado" pretende abarcar anillos que tienen sitios múltiples de insaturación, pero no pretende incluir restos arilo o heteroarilo, como se define en el presente documento.

*Opcionalmente sustituido:* Tal como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden contener restos "opcionalmente sustituidos". En general, el término "sustituido", ya esté precedido o no por el término "opcionalmente", significa que se sustituyen uno o más hidrógenos del resto designado por un sustituyente adecuado. A menos que se indique lo contrario, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede estar sustituida por más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por la presente invención son preferentemente aquellas que dan como resultado la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término "estable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no están alterados de forma sustancial cuando se los somete a condiciones para permitir su producción, detección y, en determinadas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines divulgados en el presente documento.

Sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno;  $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$ ;  $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}Ph$ , que puede sustituirse por  $R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$  que puede sustituirse por  $R^\circ$ ;  $-CH=CHPh$ , que puede sustituirse por  $R^\circ$ ;  $-NO_2$ ;  $-CN$ ;  $-N_3$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ;  $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ;  $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$ ;  $N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$ ;  $-C(S)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$ ;  $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$ ;  $SC(S)SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$ ;  $-C(S)NR^\circ_2$ ;  $-C(S)SR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$ ;  $C(O)N(OR^\circ)R^\circ$ ;  $-C(O)C(O)R^\circ$ ;  $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$ ;  $-C(NOR^\circ)R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)2R^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)2OR^\circ$ ;  $-(CH_2)_{0-4}OS(O)2R^\circ$ ;  $-S(O)_2NR^\circ_2$ ;  $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$ ;  $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$ ;  $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$ ;  $-N(OR^\circ)R^\circ$ ;  $-C(NH)NR^\circ_2$ ;  $-$

- $P(O)_2R^\circ$ ;  $-P(O)R^\circ_2$ ;  $-OP(O)R^\circ_2$ ;  $-OP(O)(OR^\circ)_2$ ;  $SiR^\circ_3$ ;  $-(alquileo\ lineal\ o\ ramificado\ C_{1-4})O-N(R^\circ)_2$ ; o  $-(alquileo\ lineal\ o\ ramificado\ C_{1-4})C(O)O-N(R^\circ)_2$ , en el que cada  $R^\circ$  puede sustituirse como se define a continuación y es independientemente hidrógeno, alifático  $C_{1-6}$ ,  $-CH_2Ph$ ,  $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ , o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno, o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de  $R^\circ$ , tomadas junto con su átomo o átomos intermedios, forman un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril mono o bicíclico de 3-12 miembros, que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre, que puede sustituirse como se define a continuación.
- 10 Sustituyentes monovalentes adecuados de  $R^\circ$  (o el anillo formado tomando dos apariciones independientes de  $R^\circ$  junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno,  $-(CH_2)_{0-2}R^\circ$ ,  $-(haloR^\circ)$ ,  $-(CH_2)_{0-2}OH$ ,  $-(CH_2)_{0-2}OR^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\circ)_2$ ;  $-O(haloR^\circ)$ ,  $-CN$ ,  $-N_3$ ,  $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$ ,  $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-2}SR^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-2}SH$ ,  $-(CH_2)_{0-2}NH_2$ ,  $-(CH_2)_{0-2}NHR^\circ$ ,  $-(CH_2)_{0-2}NR^\circ_2$ ,  $-NO_2$ ,  $-SiR^\circ_3$ ,  $-OSiR^\circ_3$ ,  $-C(O)SR^\circ$ ,  $-(alquileo\ lineal\ o\ ramificado\ C_{1-4})C(O)OR^\circ$ , o  $-SSR^\circ$  en los que cada  $R^\circ$  no está sustituido o en los que precedido por "halo" está sustituido solo por uno o más halógenos, y se selecciona independientemente entre alifático  $C_{1-4}$ ,  $-CH_2Ph$ ,  $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ , o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de  $R^\circ$  incluyen  $=O$  y  $=S$ .
- 20 Sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes:  $=O$ ,  $=S$ ,  $=NNR^*$ ,  $=NNHC(O)R^*$ ,  $=NNHC(O)OR^*$ ,  $=NNHS(O)_2R^*$ ,  $=NR^*$ ,  $=NOR^*$ ,  $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$  o  $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$ , en las que cada aparición independiente de  $R^*$  se selecciona entre hidrógeno, alifático  $C_{1-6}$  que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que se unen a carbonos sustituibles próximos de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen:  $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$ , en las que cada aparición independiente de  $R^*$  se selecciona entre hidrógeno, alifático  $C_{1-6}$  que puede estar sustituido como se define a continuación, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.
- 30 Sustituyentes adecuados en el grupo alifático de  $R^*$  incluyen halógeno,  $-R^*$ ,  $-(haloR^*)$ ,  $-OH$ ,  $-OR^*$ ,  $-O(haloR^*)$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OR^*$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR^*$ ,  $-NR^*_2$ , o  $-NO_2$ , en los que cada  $R^*$  no está sustituida o en los que precedido por "halo" está sustituida solo por uno o más halógenos, y es independientemente alifático  $C_{1-4}$ ,  $-CH_2Ph$ ,  $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ , o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.
- 40 Sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen  $-R^\dagger$ ,  $-NR^\dagger_2$ ,  $-C(O)R^\dagger$ ,  $-C(O)OR^\dagger$ ,  $-C(O)C(O)R^\dagger$ ,  $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$ ,  $-S(O)_2R^\dagger$ ,  $-S(O)_2NR^\dagger_2$ ,  $-C(S)NR^\dagger_2$ ,  $-C(NH)NR^\dagger_2$ , o  $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$ ; en los que cada  $R^\dagger$  es independientemente hidrógeno, alifático  $C_{1-6}$  que puede estar sustituido como se define a continuación,  $-OPh$  no sustituido, o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno, o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de  $R^\dagger$ , tomadas junto con su átomo o átomos intermedio (s) forman un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril mono o bicíclico de 3-12 miembros, que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre.
- 50 Sustituyentes adecuados en el grupo alifático de  $R^\dagger$  son independientemente halógeno,  $-R^*$ ,  $-(haloR^*)$ ,  $-OH$ ,  $-OR^*$ ,  $-O(haloR^*)$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OR^*$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR^*$ ,  $-NR^*_2$ , o  $-NO_2$ , en los que cada  $R^*$  no está sustituida o en los que precedido por "halo" está sustituida solo por uno o más halógenos, y es independientemente alifático  $C_{1-4}$ ,  $-CH_2Ph$ ,  $-O(CH_2)_{0-1}Ph$ , o un anillo saturado o parcialmente insaturado o aril de 5-6 miembros, que tiene de 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno o azufre.
- Grupo protector adecuado: Tal como se usa en el presente documento, la expresión "grupo protector adecuado", se refiere a grupos protectores de amino o a grupos protectores de hidroxilo dependiendo de su ubicación dentro del compuesto e incluye los descritos en detalle en Grupos protectores en síntesis orgánica, TW Greene. y PGM Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.
- Grupos protectores de amino adecuados incluyen metil carbamato, etil carbamato, 9-fluorenilmetilo carbamato (Fmoc), 9-(2-sulfo)fluorenilmetil carbamato, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetil carbamato, 2,7-di-t-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metil carbamato, 4-metoxifenacil carbamato (Phenoc), 2,2,2-tricloroetil carbamato (Troc), 2-trimetilsililetil carbamato (Teoc), 2-feniletil carbamato (hZ), 1-(1-adamantil)-1-metiletil carbamato (Adpoc), 1,1-dimetil-2-haloetil carbamato, 1,1-dimetil-2,2-dibromoetil carbamato (DB-t-BOC), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetil carbamato (TCBOC), 1-metil-1-(4-bifenilil)etil carbamato (Bpoc), 1-(3,5-di-t-butilfenil)-1-metiletil carbamato (t-Bumeoc), 2-(2'-y 4'-piridil)etil carbamato (Pyoc), 2-(N,N-diciclohexilcarboxamido)etil carbamato, t-butil carbamato (BOC), 1-adamantil carbamato (Adoc), vinil carbamato (Voc), alil carbamato (Alloc), 1-isopropilalil carbamato (Ipaoc), cinnamil carbamato (Coc), 4-nitrocinnamil carbamato (Noc), 8-quinolil carbamato, N-hidroxipiperidinil carbamato, alquilditio carbamato, bencil carbamato (Cbz), p-metoxibencil carbamato (Moz), p-nitobencil carbamato, p-

bromobencil carbamato, *p*-clorobencil carbamato, 2,4-diclorobencil carbamato, 4-metilsulfinilbencil carbamato (Msz), 9-antrilmetil carbamato, difenilmetil carbamato, 2-metiltioetil carbamato, 2-metilsulfoniletil carbamato, 2-(*p*-toluenosulfonil)etil carbamato, [2-(1,3-ditianil)]metil carbamato (Dmoc), 4-metiltiofenil carbamato (Mtpc), 2,4-dimetiltiofenil carbamato (Bmpc), 2-fosfonioetil carbamato (Peoc), 2-trifenilfosfonioisopropil carbamato (Ppoc), 1,1-dimetil-2-cianoetil carbamato, *m*-cloro-*p*-aciloxibencil carbamato, *p*-(dihidroxiboril)bencil carbamato, 5-benzoisoxazolilmetil carbamato, 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetil carbamato (Tcroc), *m*-nitrofenil carbamato, 3,5-dimetoxibencil carbamato, *o*-nitrobencil carbamato, 3,4-dimetoxi-6-nitrobencil carbamato, fenil(*o*-nitrofenil)metil carbamato, derivado de fenotiazinil-(10)-carbonilo, derivado de *N*-*p*-toluenosulfonilaminocarbonilo, derivado de *N*-fenilaminotiocarbonilo, *t*-amil carbamato, *S*-bencil tiocarbamato, *p*-cianobencil carbamato, ciclobutil carbamato, ciclohexil carbamato, ciclopentil carbamato, ciclopropilmetil carbamato, *p*-deciloxibencil carbamato, 2,2-dimetoxicarbonilvinil carbamato, *o*-(*N,N*-dimetilcarboxamido)bencil carbamato, 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propil carbamato, 1,1-dimetilpropinil carbamato, di(2-piridil)metil carbamato, 2-furanilmetil carbamato, 2-yodoetil carbamato, isobornil carbamato, isobutil carbamato, isonicotinil carbamato, *p*-(*p*'-metoxifenilazo)bencil carbamato, 1-metilciclobutil carbamato, 1-metilciclohexil carbamato, 1-metil-1-ciclopropilmetil carbamato, 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etil carbamato, 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etil carbamato, 1-metil-1-feniletil carbamato, 1-metil-1-(4-piridil)etil carbamato, fenil carbamato, *p*-(fenilazo)bencil carbamato, 2,4,6-tri-*t*-butilfenil carbamato, 4-(trimetilamonio)bencil carbamato, 2,4,6-trimetilbencil carbamato, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanil, benzamida, *p*-fenilbenzamida, *o*-nitrofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (*N*'-ditiobenciloxycarbonilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, *o*-nitrocinnamida, derivado de *N*-acetilmetonina, *o*-nitrobenzamida, *o*-(benzoiloximetil)benzamida, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiassuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona de 5 sustituido, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona de 5 sustituido, 3,5-dinitro-4-piridona de 1 sustituido, *N*-metilamina, *N*-alilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[4-metoxifenil]difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenoamina, *N*-ferrocenilmetilamino (Fcm), *N*'-óxido de *N*-2-picolilamino, *N*-1,1-dimetiltiometilenoamina, *N*-bencilidenoamina, *N*-*p*-metoxibencilidenoamina, *N*-difenilmetilenoamina, *N*-[2-(piridil)mesitil]metilenoamina, *N*-(*N*',*N*'-dimetilaminometileno)amina, *N*,*N*'-isopropilidenediamina, *N*-*p*-nitrobencilidenoamina, *N*-salicilideneamina, *N*-5-clorosalicilideneamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenoamina, *N*-ciclohexilidenoamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de *N*-borano, derivado de ácido *N*-difenilborónico, *N*-[fenil(pentacarbonilcromo- o tungsten)carbonil]amina, *N*-cobre quelato, *N*-cinc quelato, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, amina *N*-óxido, difenilfosfinamida (Dpp), dimetilfosfinamida (Mpt), difenilfosfinamida (Ppt), dialquil fosforamidatos, dibencil fosforamidato, difenil fosforamidato, bencenosulfenamida, *o*-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, 3-nitropiridinasulfenamida (Npys), *p*-toluenosulfenamida (Ts), bencenosulfenamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfenamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfenamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfenamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfenamida (Mte), 4-metoxibencenosulfenamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfenamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfenamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfenamida (Pmc), metanosulfenamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfenamida (SES), 9-antracenesulfenamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfenamida (DNMBS), bencil sulfenamida, trifluorometilsulfenamida, y fenacilsulfenamida.

Grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen metilo, metoximetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetil (PMBM), (4-metoxifenoxi)metil (*p*-AOM), guaiacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropirano (THP), 3-bromotetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopirano, *S,S*-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopirano, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxi piperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, *N*-óxido de 3-metil-2-picolilo, difenilmetilo, *p,p*'-dinitrobenzidriilo, 5-dibenzosuberil, trifenilmetilo, α-naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloro-ftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditolan-2-ilo, *S,S*-dióxido de benzoisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), *t*-butilmetoxifenilsililo (TBMPs), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenditio)pentanoato (levulinoilditioacetal),

pivaloato, adamantato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), alquilcarbonato de metilo, 9-fluorenilmetil carbonato (Fmoc), alquilcarbonato de etilo, alquilcarbonato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), 2-(trimetilsilil)etil carbonato (TMSEC), etilcarbonato de 2-(fenilsulfonilo) (Psec), etilcarbonato de 2-(trifenilfosfonio) (Peoc), alquilcarbonato de isobutilo, alquilcarbonato de vinilo alquilcarbonato de alilo, alquil carbonato de *p*-nitrofenilo, alquilcarbonato de bencilo, alquil carbonato de *p*-metoxibencilo, alquilcarbonato de 3,4-dimetoxibencilo, alquilcarbonato de *o*-nitrobencilo, alquilcarbonato de *p*-nitrobencilo, alquilcarbonato de *S*-bencilo, carbonato de 4-etoxi-1-naftilo, ditiocarbonato de metilo, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometo)etilo, 4-(metiltiometo)butirato, 2-(metiltiometo)metilbenzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (*E*)-2-metil-2-butenato, *o*-(metoxicarbonil)benzoato,  $\alpha$ -naftoato, nitrato, *N,N,N',N'*-tetrametilfosforodiamidato de alquilo, *N*-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfinotioilo, 2,4-dinitrofenilsulfonato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato y tosilato (Ts). Para proteger 1,2- o 1,3-dioles, los grupos protectores incluyen metilenacetal, etilidencetal, 1-*t*-butiletildiden cetal, 1-feniletildiden cetal, (4-metoxifenil)etilidencetal, 2,2,2-tricloroetilidencetal, acetona, ciclohexilidencetal, ciclohexilidencetal, cicloheptilidencetal, bencilidencetal, *p*-metoxibencilidencetal, 2,4-dimetoxibencilidencetal, 3,4-dimetoxibencilidencetal, 2-nitrobencilidencetal, metoximetilidencetal, etoximetilidencetal, dimetoximetilidencetal, 1-metoxietilidencetal, 1-etoxietilidencetal, 1,2-dimetoxietilidencetal,  $\alpha$ -metoxibencilidencetal, derivado de 1-(*N,N*-dimetilamino)etilidencetal, derivado de  $\alpha$ -(*N,N'*-dimetilamino)bencilidencetal, 2-oxaciclopentilidencetal, grupo di-*t*-butilsilileno (DTBS), derivado de 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilidencetal) (TIPDS), derivado de tetra-*t*-butoxidisiloxano-1,3-diilidencetal (TBDS), carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos, etil boronato, and fenilo boronato.

En cualquier caso en el que una variable química (*p. ej.*, un grupo R) se muestra unida a un enlace que atraviesa un enlace de anillo, esto significa que una o más de dichas variables están unidas opcionalmente al anillo que tiene el enlace cruzado. Cada grupo R en dicho anillo se puede unir en cualquier posición adecuada, esto generalmente se entiende que significa que el grupo está unido en lugar de un átomo de hidrógeno en el anillo principal. Esto incluye la posibilidad de que dos grupos R puedan unirse al mismo átomo de anillo. Además, cuando más de un grupo R está presente en un anillo, cada uno puede ser el mismo o diferente que otros grupos R unidos a él, y cada grupo se define independientemente de otros grupos que pueden estar unidos en otra parte de la misma molécula, aunque puede estar representado por el mismo identificador.

Información sobre proteínas de la presente invención:

*PRPK*: Número de registro CAS 183450-12-6. Nombres Pubmed (número de acceso, número de versión): quinasa reguladora de TP53 [Homo sapiens] (NP\_291028.3 GI: 41327715); RecName: Completo = quinasa reguladora de TP53; AltName: Completo = proteína quinasa relacionada con p53; AltName: Completo=Nori-2 (Q96S44.2 GI:26398348); proteína TP53RK [Homo sapiens] (AAH10637.1 GI:14714958); proteína TP53RK [Homo sapiens] (AAH10637.1 GI:14714958); quinasa reguladora de TP53 [Homo sapiens] (AAH09727.1 GI:16307277); quinasa reguladora de TP53 [Homo sapiens] (AAH66309.1 GI:42542637). *TPRKB*: Número de registro CAS 562887-50-7. Nombres Pubmed (números de acceso, número de versión): proteína de unión a proteína quinasa relacionada con p53, proteína CGI-121-humana (JC7956 GI:60729596); proteína de unión a TP53RK [Homo sapiens] (NP\_057142.1 GI:7705590); isoforma CGI-121 SI [Homo sapiens] (AAN76357.1 GI:26224772); isoforma CGI-121 L1 [Homo sapiens] (AAN76356.1 GI:26224770); RecName: Completo = proteína de unión a TP53RK; AltName: Completo = proteína de unión a PRPK (Q9Y3C4.1 GI:74735252).

*OSGEP*: Número de registro CAS 129430-53-1. Nombres Pubmed (números de acceso, número de versión): OSGEP [Homo sapiens] (CAG33513.1 GI:48146581); RecName: Completo: O-sialoglicoproteína endopeptidasa probable; Abreviado=hOS-GEP (Q9NPF4.1 GI:47605574); O-sialoglicoproteína endopeptidasa probable [Homo sapiens] (NP\_060277.1 GI:8923380); O-sialoglicoproteína endopeptidasa [Homo sapiens] (BAB33172.1 GI:13358864); O-sialoglicoproteína endopeptidasa [Homo sapiens] (BAB33147.1 GI:13358802); O-sialoglicoproteína endopeptidasa [Homo sapiens] (AAH32310.1 GI:21619574).

*LAGE3*: Nombres Pubmed (números de acceso, número de versión): Miembro 3 de la familia de antígenos L [Homo sapiens] (CAI43195.1 GI:57284198); miembro 3 de la familia de antígenos L [Homo sapiens] (NP\_006005.2 GI:24430137); RecName: Completo = miembro 3 de la familia de antígenos L; AltName: Completo = Proteína ITBA2; AltName: Completo = Proteína ESO-3 (Q14657.2 GI:54041570); familia de antígenos L, miembro 3 de la familia de antígenos L [Homo sapiens] (AAH15744.2 GI:37589922); miembro 3 de la familia de antígenos L [Homo sapiens] (AAH62330.1 GI:38383094); miembro 3 de la familia de antígenos L [Homo sapiens] (CAQ08986.1 GI:168984692). Homólogos de LAGE3: proteína CTAG2 [Homo sapiens] (AAI14934.1 GI:133777817, AAI28046.1 GI:118341658); isoforma LAGE-1b del antígeno 2 de cáncer/testículo [Homo sapiens] (NP\_066274.1 GI: 10337609); isoforma CRA b del antígeno 2 de cáncer/testículo [Homo sapiens] (EAW72669.1 GI:119593075); isoforma CRA a del antígeno 2 de cáncer/testículo [Homo sapiens] (EAW72668.1 GI:119593074); isoforma LAGE-1a del antígeno 2 de cáncer/testículo [Homo sapiens] (NP\_758965.1 GI:50233789); RecName: Completo = antígeno 2 de cáncer/testículo; Abreviado=CT2; AltName: Completo = miembro 1 de la familia de antígenos L; Abreviado=LAGE-1; AltName: Completo=Antígeno autoinmunogénico NY-ESO-2 de cáncer/testículo; AltName: Completo = antígeno 6.2 de cáncer/testículo; Abreviado=CT6.2 (O75638.2 GI:296434470); Variante 1 de transcripción de la proteína LAGE-1a [Homo sapiens] (AAV98585.1 GI:56567192); Variante 2 de transcripción de la proteína LAGE-1a [Homo sapiens] (AAV98584.1 GI:56567190);

Antígeno 2 de cáncer/testículo [Homo sapiens] (AAH02833.1 GI:12803969).

### Descripción detallada de algunas realizaciones

5 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar agentes que interactúan con un complejo PRPK/TPRKB. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar agentes que interactúan con un complejo KEOPS que comprende PRPK, TPRKB, OSGEP, y LAGE3 y sus homólogos. En algunas realizaciones, dichos métodos incluyen métodos de cribado de alto rendimiento. En algunas realizaciones, los métodos incluyen ensayos *in vitro*, *in cito* y/o *in vivo*. En determinadas realizaciones, la presente  
10 invención abarca agentes identificados por métodos de la invención.

También se divulgan métodos para identificar agentes que modulan PRPK.

15 Se divulgan métodos para inhibir la proliferación (*p. ej.*, proliferación de células B). También se divulgan métodos para inducir la producción de IL-2. También se divulgan métodos para inhibir la producción de TNF- $\alpha$ . También se divulgan métodos para inducir la activación de células asesinas naturales. También se divulgan métodos para potenciar la formación de sinapsis inmune.

20 También se divulga un método para tratar la inflamación, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune. También se divulga un método para tratar una afección oncogénica o cancerosa.

### Complejo PRPK-TPRKB y KEOPS

25 Los inventores han descubierto sorprendentemente que PRPK y TPRKB median las actividades inmunomoduladoras e inhibitoras del crecimiento de compuestos tales como lenalidomida y pomalidomida. PRPK y TPRKB fueron capturados por reactivos de afinidad a base de lenalidomida, pomalidomida, y talidomida.

30 RPK y TPRKB se conservan evolutivamente desde arqueas y levaduras hasta seres humanos; sin embargo, se sabe muy poco sobre la función de estas proteínas, particularmente en seres humanos. Hay un número limitado de publicaciones que describen estas proteínas humanas y a continuación hay un resumen de los hallazgos clave de la literatura.

35 En levaduras y arqueas, se ha demostrado previamente que Bud32 y Cgjl21 (PRPK y TPRKB respectivamente) forman un complejo funcional denominado KEOPS con otras dos proteínas llamadas Kael y Peel. El complejo KEOPS de levadura es necesario para el mantenimiento de los telómeros y la regulación transcripcional (Downey y *col.*, Cell 124:1155-1168 (2006); Kisseleva-Romanova y *col.*, EMBO J. 25: 3576-3585 (2006)). La estructura del complejo KEOPS se ha estudiado mediante cristalografía, aunque las proteínas eran de origen mixto (principalmente arqueas) (Mao y *col.*, Mol Cell 32: 259-275 (2008); Hecker y *col.*, EMBO J. 27: 2340- 2351 (2008)). Las alineaciones de secuencia basadas en estructuras indican que Bud32 (PRPK) es una quinasa atípica que posee una arquitectura  
40 característica de proteína quinasa pero carece de un bucle de activación que normalmente es responsable del reconocimiento del sustrato. La formación y función biológica del complejo KEOPS humano no se ha sido previamente divulgada.

45 Los inventores han determinado además que los ortólogos humanos de las otras dos proteínas en el complejo KEOPS, OSGEP y LAGE3 y sus homólogos (Kael y Pcc1, respectivamente), también se capturan mediante un reactivo de afinidad a base de pomalidomida. Este es el primer indicio de que un complejo KEOPS se puede formar en seres humanos. En la literatura, hay muy pocos informes que describen las funciones posibles de PRPK y TPRKB. El PRPK se identificó primero como un transcrito que está regulado positivamente en células T citotóxicas activadas por IL-2 (Abe y *col.*, J. Biol. Chem. 276:44003-44011 (2001)). Se ha sugerido que PRPK podría poseer actividad de quinasa y fosforilar p53 en Ser15 *in vitro* (Facchin y *col.*, (2003) FEBS Letters 549: 63). No se observó actividad quinasa de PRPK recombinante a menos que se preincubara PRPK con lisados celulares, lo que sugiere que PRPK puede estar regulado por otro (s) componente (s) celular (es). La interacción física entre PRPK y TPRKB se ha demostrado *in vitro* (Miyoshi y *col.*, (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 399-405) y hay indicios de que PRPK puede activarse por Akt (Facchin y *col.*, Cell Mol Life Sci 64: 2680-2689 (2007), lo que sugiere que podría  
50 ser parte de una importante vía reguladora relevante para el cáncer. Los homólogos humanos de LAGE3 tales como CTAG2 y CTG1B son conocidos como antígenos de cáncer/testículo que se expresan específicamente en el cáncer y el testículo y son una diana para la inmunoterapia del cáncer (Caballero y *col.*, Cancer Sci (2009) 100, 2014) y también pueden formar un complejo KEOPS.

### 60 Moduladores de los complejos PRPK-TPRKB y KEOPS

La invención proporciona métodos para identificar un agente que modula la actividad de un complejo PRPK/TPRKB, para su uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno asociado a proliferación celular, producción de IL-2, producción de TNF- $\alpha$  o activación de asesinas naturales que comprende proporcionar un complejo  
65 PRPK/TPRKB. Los métodos de la invención comprenden proporcionar un complejo PRPK/TPRKB que comprende PRPK y TPRKB, proporcionar un agente de prueba que tiene una estructura de Fórmula I, poner en contacto el



agente de prueba con el complejo PRPK/TPRKB, y detectar una interacción entre el agente de prueba y al menos uno de PRPK y TPRKB

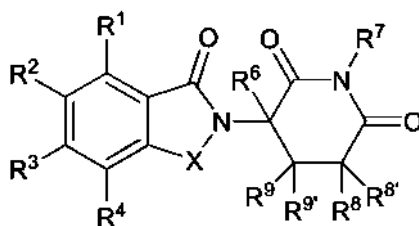
#### Agentes de prueba

5 En general, cualquier agente que tiene una estructura de Fórmula I puede seleccionarse en un método de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, se criba una pluralidad de agentes de prueba de acuerdo con la invención. Ejemplos de agentes de prueba que tienen una estructura de Fórmula I incluyen, pero sin limitación, compuestos químicos, moléculas pequeñas, co-cristales, nano-cristales, o cualquier combinación de los mismos. Los  
10 agentes de prueba que tienen una estructura de Fórmula I también se pueden diseñar usando métodos de diseño de fármacos racionales computarizados. Normalmente, una pluralidad de agentes de prueba que tienen una estructura de Fórmula I (p. ej., bibliotecas de agentes de prueba) se prueban en ensayos de detección para posibles moduladores. Por ejemplo, los agentes de prueba que tienen una estructura de Fórmula I pueden proporcionarse como bibliotecas químicamente sintetizadas. En algunas realizaciones, los agentes de prueba que tienen una  
15 estructura de Fórmula I se proporcionan como bibliotecas combinatorias. En determinadas realizaciones, una biblioteca se diseña *in silico* y se sintetiza para cribado.

En algunas realizaciones, los agentes de prueba de molécula pequeña que tienen una estructura de Fórmula I se criban usando métodos de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, las bibliotecas de  
20 compuestos sintetizadas *de novo* pueden cribarse para identificar compuestos novedosos que tienen funciones moduladoras diana. En algunas realizaciones, las bibliotecas públicas que contienen fármacos (que incluyen fármacos aprobados por la FDA) pueden cribarse para identificar compuestos existentes cuyas actividades de modulación diana son previamente desconocidas. En algunas realizaciones, las bibliotecas modificadas que contienen derivados o análogos de compuestos existentes pueden sintetizarse usando métodos bien conocidos en la  
25 técnica y cribarse para identificar moduladores diana novedosos o mejorados. En algunas realizaciones, las moléculas pequeñas se criban individualmente.

En algunas realizaciones, el diseño racional de fármacos se puede usar para predecir y/o producir análogos estructurales de sustancias candidatas biológicamente activas conocidas. Al crear dichos análogos, es posible  
30 formar fármacos que pueden ser más activos y/o estables que las sustancias naturales, pueden tener diferente susceptibilidad a la alteración y/o pueden afectar la función de diversas otras moléculas. En un enfoque, se generaría una estructura tridimensional para una sustancia candidata conocida y/o una porción característica de la misma. En algunas realizaciones, la generación de una estructura tridimensional se lleva a cabo mediante cristalografía de rayos X, estructura de RMN, modelado informático, y/o mediante una combinación de estos  
35 enfoques.

Un agente de prueba es un compuesto de Fórmula I:



I

40 en la que:

X es -C(=O)- o -CH<sub>2</sub>-;

45 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> o -N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>5</sup> is independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, o dos grupos R<sup>5</sup> se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo;

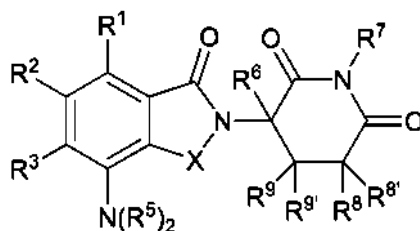
R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>;

R<sup>7</sup> es hidrógeno, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>; y

R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi C<sub>1-6</sub>.

50

En algunas realizaciones, un agente de prueba es un compuesto de Fórmula II:



II

5 en la que:

X es -C(=O)- o -CH<sub>2</sub>-;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>3</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

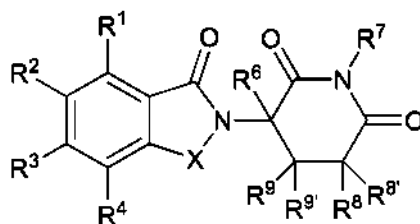
10 cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, o dos grupos R<sup>5</sup> se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo;

R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>;

R<sup>7</sup> es hidrógeno, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>; y

R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi C<sub>1-6</sub>.

15 En algunas realizaciones, la invención usa un compuesto de Fórmula III:



III

en la que:

20

X es -C(=O)- o -CH<sub>2</sub>-;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> o -N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, o dos grupos R<sup>5</sup> se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo;

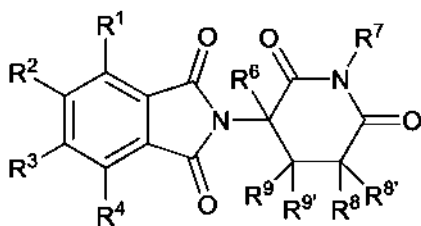
25 R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>;

R<sup>7</sup> es hidrógeno, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>; y

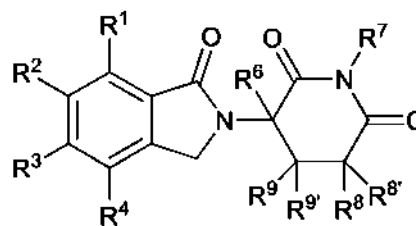
R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi C<sub>1-6</sub>; en la que al menos uno de R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup>, y R<sup>9'</sup> no es hidrógeno.

30 En algunas realizaciones, un agente de prueba es un compuesto de Fórmula III.

En algunas realizaciones, la invención usa un compuesto de Fórmula IIIa o IIIb:



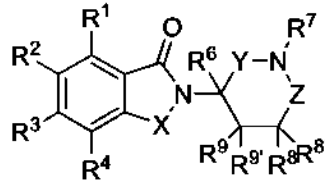
IIIa



IIIb

35

En algunas realizaciones, la invención usa un compuesto de Fórmula IV:



IV

5 en la que:

X es -C(=O)- o -CH<sub>2</sub>-;

Y es -C(=O)- o -C(R<sup>10</sup>)(R<sup>10'</sup>)-;

Z es -C(=O)- o -C(R<sup>11</sup>)(R<sup>11'</sup>)-;

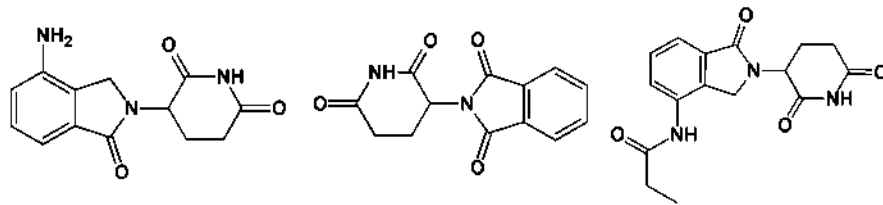
10 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> o -N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>; cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, o dos grupos R<sup>5</sup> se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo;

R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>;

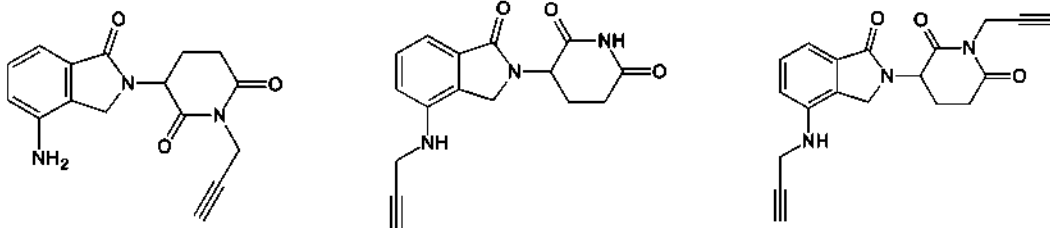
R<sup>7</sup> es hidrógeno, bencilo, o alquilo C<sub>1-8</sub>; y

15 R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>9'</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>10'</sup>, R<sup>11</sup>, y R<sup>11'</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, o alcoxi C<sub>1-6</sub>.

En algunas realizaciones, la invención usa un compuesto de fórmula:



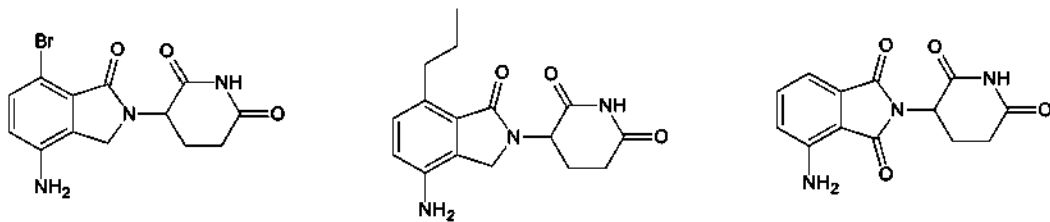
27



32

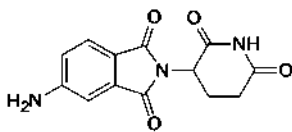
33

34

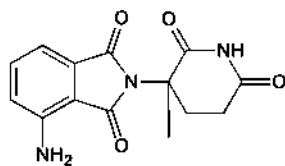


35

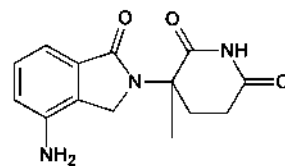
36



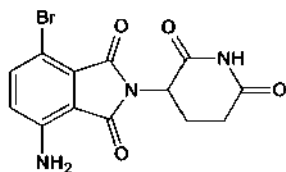
**31**



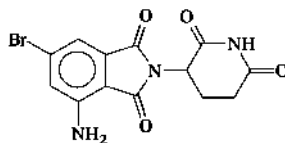
**37**



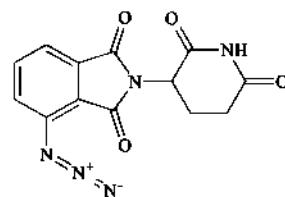
**38**



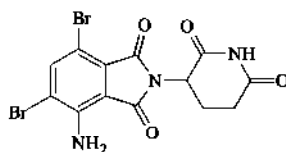
**39**



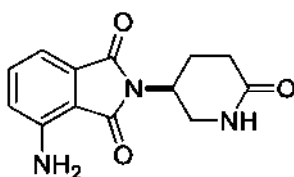
**40**



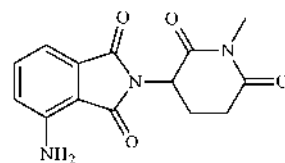
**41**



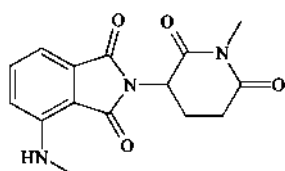
**42**



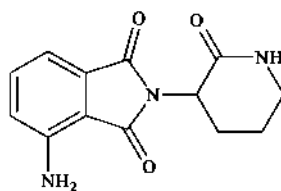
**30**



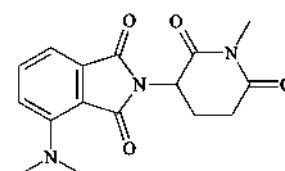
**29**



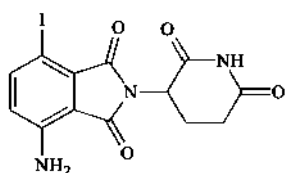
**43**



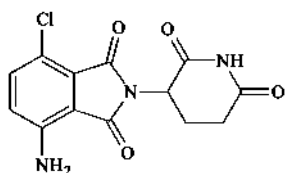
**28**



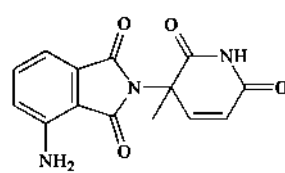
**44**



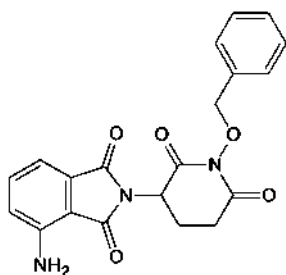
**45**



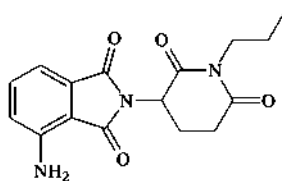
**46**



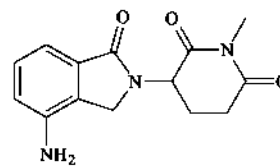
**47**



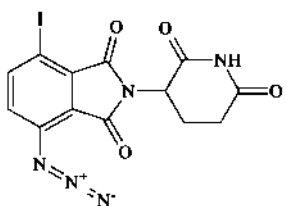
48



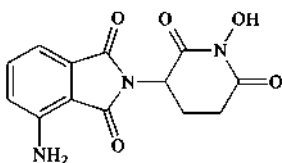
49



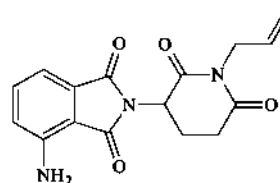
50



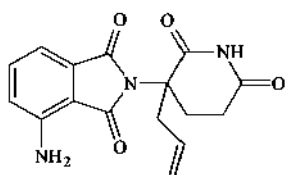
51



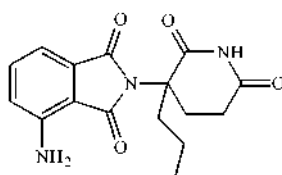
52



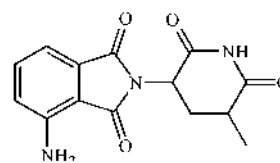
53



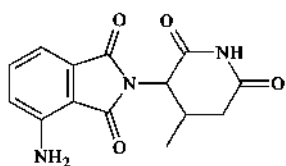
54



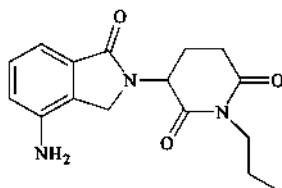
55



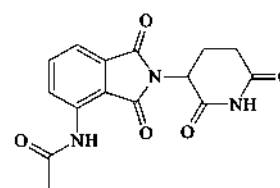
56



57



58



59

En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención se encuentra en una o más de las siguientes patentes: US 5.635.517, US 6.045.501, US 6.281.230, US 6.315.720, US 6.555.554, US 6.561.976, US 6.561.977, US 6.755.784, US 6.908.432, US 7.119.106, US 7.189.740, US 7,465,800.

En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención no se encuentra en una o más de las siguientes patentes: US 5.635.517, US 6.045.501, US 6.281.230, US 6.315.720, US 6.555.554, US 6.561.976, US 6.561.977, US 6.755.784, US 6.908.432, US 7.119.106, US 7.189.740, US 7,465,800.

En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención es 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-6-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-7-aminoisindolina, 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, o 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisindolina. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención no es 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-6-aminoisindolina, 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-7-aminoisindolina, 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisindolina, o 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-5-aminoisindolina. En determinadas

realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención es el compuesto 29, 31, 27, o 23. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención no es el compuesto 29, 31, 27, o 23. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención es el compuesto 18. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención es uno o más de los compuestos 2-21. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención no es uno o más de los compuestos 2-21. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención es uno o más de los compuestos 24-26. En determinadas realizaciones, un agente de prueba y/o modulador de acuerdo con la presente invención no es uno o más de los compuestos 24-26.

#### *Identificación y/o caracterización de moduladores de complejos PRPK-TPRKB y KEOPS*

La presente invención proporciona métodos para identificar agentes que modulan el complejo PRPK/TPRKB y/o el complejo KEOPS. En algunas realizaciones, un método de la invención selecciona moduladores del complejo PRPK-TPRKB y/o el complejo KEOPS mediante la identificación de agentes que se unen a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, un método de la invención identifica moduladores de PRPK, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS mediante la identificación de agentes que modulan la actividad de PRPK quinasa. En otras realizaciones más, el método de la invención identifica moduladores de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS mediante la identificación de agentes que modulan la expresión y/o niveles PRPK, TPRKB, OSGEP, y/o LAGE3 y sus homólogos. En algunas realizaciones, un método de la invención selecciona moduladores de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS mediante la identificación de agentes que activan células asesinas naturales. En algunas realizaciones, un método de la invención selecciona moduladores de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS mediante la identificación de agentes que inducen la formación de sinapsis inmune.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "diana biológica" se refiere a (1) una proteína PRPK, un ácido nucleico que codifica PRPK, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (2) una proteína TPRKB, un ácido nucleico que codifica TPRKB, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (3) una proteína OSGEP, un ácido nucleico que codifica OSGEP, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; (4) un LAGE3 y sus proteínas homólogas, un ácido nucleico que codifica LAGE3 y sus homólogos, y/u homólogo, porción, variante, mutante y/o derivado del mismo; y/o (5) un complejo de cualquiera dos o más de PRPK, TPRKB, OSGEP, y/o LAGE3 y sus homólogos.

La eficacia del agente de prueba puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de los datos obtenidos usando diversas concentraciones del agente de prueba. Además, se puede realizar un ensayo de control para proporcionar un valor inicial para la comparación. En determinadas realizaciones, se realiza un ensayo de control en ausencia de una sustancia candidata. En determinadas realizaciones, se realiza un ensayo de control en presencia de un agente de referencia.

En algunas realizaciones, los agentes identificados de acuerdo con la invención inhiben y/o activan PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS en al menos aproximadamente 10 %, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más en comparación con la actividad observada en condiciones por lo demás idénticas que carecen de un agente de prueba. En algunas realizaciones, los agentes identificados de acuerdo con la invención inhiben y/o activan PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS en al menos aproximadamente 10 %, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más en comparación con la actividad observada en condiciones comparables usando un patrón de referencia.

Se entenderá que todos los métodos de cribado de la presente invención son útiles en sí mismos a pesar de que pueden no encontrarse agentes eficaces. La invención proporciona métodos para seleccionar agentes de prueba, no únicamente métodos para encontrar agentes eficaces.

#### Cribado

Se emplea la selección de moduladores de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, se emplea un cribado de alto rendimiento para moduladores de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, dicho cribado identifica sustancias que se unen a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

En ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible cribar hasta varios miles de agentes de prueba en un solo día. Cada pocillo de una placa de microtitulación se puede usar para realizar un ensayo separado contra un agente de prueba seleccionado, o, si se van a observar los efectos del tiempo de concentración y/o incubación, cada 5-10 pocillos puede analizar un solo agente de prueba. Por tanto, una única placa de microtitulación convencional puede determinar 96 agentes de prueba. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una sola placa puede determinar fácilmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 agentes de prueba diferentes. Es posible determinar

muchas placas por día; Se pueden realizar pantallas de ensayo de hasta 6.000, 20.000, 50.000 o más de 100.000 agentes de prueba diferentes.

5 Para una reacción en estado sólido, la diana biológica de interés se puede unir al componente en estado sólido, directa o indirectamente, mediante enlace covalente y/o no covalente, *p. ej.*, mediante una etiqueta. La etiqueta puede comprender cualquiera de diversos componentes. En general, una sustancia que se une a la etiqueta (un aglutinante de etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula etiquetada de interés se une al soporte sólido por interacción de la etiqueta y/o el aglutinante de etiqueta.

10 Se pueden usar varias etiquetas y/o aglutinantes de etiqueta, basándose en interacciones moleculares conocidas, bien descritas en la literatura. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un aglutinante natural, por ejemplo, biotina, proteína A y/o proteína G, puede usarse conjuntamente con aglutinantes de etiqueta adecuados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, *etc.*). Los anticuerpos para moléculas con aglutinantes naturales tales como biotina y/o aglutinantes de etiqueta adecuados están ampliamente disponibles  
15 (Sigma Immunochemicals, catálogo de 1998, St. Louis, MO).

De forma similar, se puede usar cualquier compuesto hapténico y/o antigénico en combinación con un anticuerpo adecuado para formar un par etiqueta/etiqueta aglutinante. Miles de anticuerpos específicos están disponibles en el mercado y muchos anticuerpos adicionales se describen en la literatura. Por ejemplo, en una configuración común,  
20 la etiqueta es un primer anticuerpo y el aglutinante de etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, las interacciones receptor-ligando son adecuadas como pares de etiqueta y/o etiqueta-aglutinante, que incluyen pero sin limitación, transferrina, c-kit, ligandos de receptores virales, receptores de citoquina, receptores de quimioquina, receptores de interleuquina, receptores de inmunoglobulina y/o anticuerpos, la familia de la cadherina, la familia de la integrina, la familia de la selectina, *etc.*  
25 (véase, *p. ej.*, Pigott y *col.*, The Adhesion Molecule Facts Book I, 1993). De forma similar, toxinas y/o venenos; epítopos virales; hormonas (*p. ej.*, opiáceos, esteroides, *etc.*); receptores intracelulares (*p. ej.*, que median los efectos de diversos ligandos pequeños, incluidos esteroides, hormona tiroidea, retinoides, vitamina D y/o péptidos); fármacos; lectinas; hidratos de carbono; ácidos nucleicos (configuraciones de polímero lineal y/o cíclico); proteínas; fosfolípidos; y/o anticuerpos pueden interaccionar con diversos receptores celulares.

30 Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenoiminas, poliarilén sulfuros, polisiloxanos, poliimididas y/o poliacetatos pueden formar etiquetas adecuadas y/o ligantes aglutinantes de etiquetas. Muchos otros pares de etiqueta/aglutinante de etiqueta son útiles en los sistemas de ensayo descritos en el presente documento, como sería evidente para un experto en la técnica.

35 Los enlazadores comunes tales como péptidos, poliéteres y similares pueden servir como etiquetas y pueden incluir secuencias polipeptídicas, tales como secuencias poli-Gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Dichos enlazadores flexibles son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los enlazadores de poli(etilenglicol) están disponibles de Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, AL). Estos enlazadores tienen opcionalmente enlaces amida, enlaces sulfhidrilo y/o enlaces hetero funcionales.

Los aglutinantes de etiqueta se fijan a sustratos sólidos usando cualquiera de diversos métodos actualmente disponibles. Los sustratos sólidos se derivatizan y/o funcionalizan comúnmente exponiendo toda y/o una porción del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie que es reactiva con una porción del  
45 aglutinante de etiqueta. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para unirse a una porción de cadena más larga incluyen grupos aminas, hidroxilo, tiol, y/o carboxilo. Los aminoalquilsilanos y/o hidroxialquilsilanos pueden usarse para funcionalizar diversas superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de dichas matrices de biopolímeros en fase sólida está bien descrita en la literatura (véase *p. ej.*, Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, que describe la síntesis en fase sólida de, *p. ej.*, péptidos; Geysen y *col.*, 1987, J. Immun. Meth. 102:259, que describe la síntesis de componentes de fase sólida en pasadores; Frank y *col.*, 1988, Tetrahedron 44:6031, que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas en discos de celulosa); Fodor y *col.*, 1991, Science, 251:767; Sheldon y *col.*, 1993, Clinical Chemistry 39 (4): 718; y Kozal y *col.*, 1996, Nature Medicine 2: 753; que describen todos matrices de biopolímeros fijadas a sustratos sólidos). Los enfoques no químicos para fijar aglutinantes de  
50 etiquetas a sustratos incluyen otros métodos comunes, tales como calor, reticulación por radiación UV, y similares.

### 55 Ensayos *in Vitro*

La presente invención proporciona métodos *in vitro* para seleccionar un modulador de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un método  
60 generalmente comprende las etapas de: (1) proporcionar un complejo PRPK/TPRKB que comprende PRPK y TPRKB; (2) proporcionar un agente de prueba que tiene una estructura de Fórmula I; (3) poner en contacto el agente de prueba con el complejo PRPK/TPRKB; y (4) detectar una interacción entre el agente de prueba y al menos uno de PRPK y TPRKB.

65 En general, se proporcionan PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK/TPRKB y/o complejo KEOPSPRK y se ponen directa y/o indirectamente en contacto con un agente de prueba. A continuación, se detecta y/o se mide la

modulación de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS por el agente de prueba. Posteriormente, los agentes adecuados pueden aislarse y/o analizarse. Para el cribado de bibliotecas, el uso de ensayos de alto rendimiento, que son conocidos por los expertos, están disponibles en el mercado y se describen en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, los ensayos *in vitro* comprenden ensayos de unión. La unión de una sustancia candidata a una diana biológica (*p. ej.*, PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS) puede, en y por sí misma, ser inhibidora, debido a la presencia de compuestos estéricos, alostéricos y/o interacciones carga-carga. La diana biológica puede estar libre en solución, fijado a un soporte y/o expresarse en y/o en la superficie de una célula. La diana biológica y/o el agente de prueba pueden marcarse, permitiendo de ese modo la detección de unión. La diana biológica es con frecuencia la especie etiquetada, lo que disminuye la posibilidad de que el marcado interfiera y/o potencie la unión. Se pueden realizar formatos de enlace competitivo en los que uno de los agentes de prueba está marcado, y se puede medir la cantidad de etiqueta libre frente a etiqueta unida para determinar el efecto sobre la unión.

15 En algunas realizaciones, los ensayos de unión implican exponer una diana biológica a un agente de prueba y detectar la unión entre la diana biológica y el agente de prueba. El ensayo de unión puede realizarse *in vitro* (*p. ej.*, en un tubo de ensayo, que comprende sustancialmente solo los componentes mencionados; en extractos exentos de células; y/o en componentes sustancialmente purificados). Como alternativa o además, los ensayos pueden realizarse *in cito* y/o *in vivo* (*p. ej.*, dentro de una célula, tejido, órgano y/u organismo, que se describe con más detalle a continuación).

25 En determinadas realizaciones, un agente de prueba se pone en contacto con el complejo PRPK/TPRKB como una diana biológica y se detecta un efecto. En algunas realizaciones, se usa un ensayo para identificar agentes que se unen a una diana biológica, que está inmovilizado en un soporte sólido, con un agente de prueba no inmovilizado para determinar si la diana biológica y el agente de prueba y en qué medida agente se unen entre sí. Como alternativa, el agente de prueba se puede inmovilizar y la diana biológica no está inmovilizado. Dichos ensayos pueden usarse para identificar agentes que pueden unirse a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

30 En una realización, un anticuerpo que reconoce la diana biológica (*p. ej.*, un anticuerpo PRPK) se une a un soporte sólido (*p. ej.*, perlas de proteína A). El anticuerpo se pone en contacto con la diana biológica, que se une al anticuerpo inmovilizado. El complejo resultante se pone entonces en contacto con el agente de prueba (proteína purificada, extracto celular, biblioteca combinatoria, *etc.*). Si el agente de prueba interactúa con la diana biológica, el agente de prueba se inmovilizará indirectamente al soporte sólido. La presencia del agente de prueba en el soporte sólido se puede determinar mediante cualquier técnica convencional conocida en la técnica (que incluye, pero sin limitación, transferencia western). Este tipo de ensayo es conocido en la técnica como ensayo de "inmunoprecipitación".

40 En una realización, una diana biológica (*p. ej.*, PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS) se inmoviliza en perlas, tales como perlas de agarosa. En determinadas realizaciones, PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, y/o una porción característica del mismo se expresa como una proteína de fusión GST en bacterias, levadura, insecto y/o línea de células eucariotas superiores y/o se purifica de extractos celulares brutos usando perlas de glutatión-agarosa. Como control, se determina la unión del agente de prueba, que no es una proteína de fusión GST, a la diana biológica inmovilizada en ausencia de una diana biológica. La unión del agente de prueba a la diana biológica inmovilizada se determina a continuación. Este tipo de ensayo se conoce en la técnica como un ensayo de "pull-down GST". Como alternativa o además, el agente de prueba se puede inmovilizar y la diana biológica no está inmovilizado.

50 Es posible realizar este tipo de ensayo usando diferentes sistemas de purificación por afinidad para inmovilizar uno de los componentes, por ejemplo componentes etiquetados con Ni-NTA agarosa y/o histidina.

La unión de una diana biológica a un agente de prueba se puede determinar mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un componente no inmovilizado puede estar marcado (con, por ejemplo, un marcador radioactivo, un marcador de epítipo y/o un conjugado de enzima-anticuerpo). Como alternativa, la unión se puede determinar mediante técnicas de detección inmunológica. Por ejemplo, una mezcla de reacción puede ser transferida por Western y la transferencia se prueba con un anticuerpo que detecta el componente no inmovilizado. Como alternativa o además, se puede utilizar el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar la unión.

60 La actividad de los moduladores de PRPK, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS identificados de acuerdo con la presente invención se pueden determinar, por ejemplo, determinando la actividad quinasa de PRPK. En dichos ensayos, PRPK y/o una porción característica del mismo producida por medios recombinantes se ponen en contacto con un sustrato en presencia de un donador de fosfato adecuado (*p. ej.*, ATP) que contiene fosfato radiomarcado y se mide la incorporación de radiomarcador dependiente de PRPK en el sustrato. Por "sustrato", se entiende cualquier sustancia que contenga un resto hidroxilo adecuado que actúa como un aceptor para el grupo  $\gamma$ -



fosfato transferido desde una molécula donadora tal como ATP en una reacción catalizada por PRPK. El sustrato puede ser un sustrato endógeno de PRPK (*p. ej.*, p53). El sustrato puede ser una proteína o péptido, y la reacción de fosforilación puede producirse en un resto de serina y/o treonina del sustrato. Es bien sabido por los expertos en la técnica que los sustratos no naturales pueden actuar como sustratos adecuados en ensayos de quinasas tales como los descritos anteriormente, y los ejemplos de sustratos específicos que se emplean comúnmente en dichos ensayos incluyen, pero sin limitación, proteínas de histonas o cualquier proteína básica de mielina.

Es bien sabido por los expertos en la técnica que la detección de la fosforilación del sustrato dependiente de la quinasa puede efectuarse por varios medios distintos de la medición de la incorporación de fosfato radiomarcado en el sustrato. Por ejemplo, la incorporación de grupos fosfato puede afectar las propiedades fisicoquímicas del sustrato, tales como movilidad electroforética, absorbancia de luz, fluorescencia y fosforescencia, propiedades cromatográficas y similares. Dichas alteraciones de las propiedades fisicoquímicas del sustrato pueden medirse fácilmente por un experto en la técnica y usarse como un indicador de actividad de quinasa.

#### 15 Ensayos *in Cito*

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de selección para moduladores de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS en los que el agente de prueba se pone en contacto con una célula. La célula puede determinarse entonces para determinados parámetros asociados con la actividad de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, la célula sobreexpresa uno o más miembros del complejo PRPK-TPRKB y/o del complejo KEOPS y/o contiene una modificación de una vía biológica en la que opera uno o ambos de estos complejos. También se divulgan las células que sobreexpresan y/o las modificadas; los expertos en la técnica, que lean la presente divulgación, se informarían de los límites de dichas células y tendrían en cuenta la amplia diversidad de las estrategias establecidas y fácilmente disponibles para construir, caracterizar y/o utilizar dichas células.

En determinadas realizaciones, las células pueden determinarse directamente para la unión entre dos o más de PRPK, TPRKB y sus homólogos. Las técnicas inmunohistoquímicas, las técnicas confocales y/u otras técnicas para evaluar la unión son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar diversas líneas celulares para dichos ensayos de cribado, que incluyen células específicamente modificadas por ingeniería para este fin. Ejemplos de células usadas en los ensayos de cribado incluyen Jeko-1, NCI-H929, Jurkat, PBMC (células mononucleares de sangre periférica), HS-Sultan, líneas celulares de mieloma múltiple, HEK-293FT, Raji, Daudi, Ramos, líneas de células B, líneas de células T. La célula puede ser una célula estimulada, tal como una célula estimulada con un factor de crecimiento. Un experto en la técnica entendería que la invención divulgada en el presente documento abarca una amplia diversidad de ensayos *in cito* para medir parámetros que se correlaciona con la actividad de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

Dependiendo del ensayo, puede ser necesario un cultivo celular y/o tisular. La célula puede examinarse usando cualquiera de varios ensayos fisiológicos diferentes, como se trató anteriormente para la unión entre dos o más de PRPK, TPRKB y sus homólogos. Como alternativa, se puede realizar un análisis molecular, que incluye, pero sin limitación, transferencia Western para controlar la expresión de proteínas y/o determinar las interacciones proteína-proteína; transferencia Northern, visualización diferencial de ARN y/o análisis de microarrays para controlar la expresión de ARNm; ensayos de quinasa para controlar la fosforilación; espectrometría de masas para controlar otras modificaciones químicas; *etc.*

La presente invención proporciona métodos para identificar agentes que se unen a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS y, por lo tanto, pueden modular la actividad de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. Uno método *in cito* de identificación de sustancias que se unen a PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS es el ensayo del sistema de dos híbridos (Fields y *col.*, 1994, Trends in Genetics 10: 286; y Colas y *col.*, 1998, TIBTECH 16:355). En este ensayo, las células de levadura expresan una primera proteína de fusión que consiste en la diana biológica de acuerdo con la invención (*p. ej.*, PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS) y un dominio de unión a ADN de un factor de transcripción tal como Gal4 y/o LexA. Las células contienen adicionalmente un gen indicador cuyo promotor contiene sitios de unión para el dominio de unión a ADN correspondiente. Al transformar las células con un vector que expresa una segunda proteína de fusión que consiste en una sustancia candidata fusionada a un dominio de activación (*p. ej.*, de Gal4 y/o virus VP16 de herpes simplex), la expresión del gen indicador puede aumentar enormemente si el agente de prueba interacciona con la diana biológica.

Otro ensayo se basa en la diana biológica unido a la fase sólida y su interacción con los agentes de prueba a cribar. Por tanto, una diana biológica (*p. ej.*, PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS) puede contener un marcador detectable, tal como un marcador radiactivo, fluorescente y/o luminiscente. Además, las sustancias candidatas se pueden acoplar a otras sustancias que permiten la detección indirecta (*p. ej.*, mediante el empleo de una enzima que usa un sustrato cromogénico y/o mediante la unión de un anticuerpo detectable). Los cambios en la conformación de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS como resultado de una interacción con un agente de prueba pueden detectarse, por ejemplo, por

el cambio en la emisión del marcador detectable. Como alternativa o además, los complejos de proteínas unidos a la fase sólida se pueden analizar mediante espectrometría de masas.

5 En algunas realizaciones, los ensayos de cribado pueden determinar la actividad de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS controlando los efectos celulares cadena abajo de la actividad de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. Dichos efectos incluyen, pero sin limitación, fosforilación de p53 y efectos de señalización en la vía PI3K/AKT, y/u otras respuestas celulares, tales como crecimiento, detención del crecimiento, diferenciación, cambios en la glicosilación, cambios en la expresión génica, regulación de la transcripción, efectos sobre la longitud de los telómeros, efectos sobre la producción de citoquinas y/o apoptosis.

15 En otra realización, los niveles PRPK y/o TPRKB y sus homólogos se determinan midiendo el nivel de proteína y/o ARNm. El nivel de proteína y/o las porciones características de la misma se mide usando inmunoensayos tales como transferencia Western y/o ELISA usando anticuerpos que se unen selectivamente a PRPK, TPRKB, OSGEP, y/o LAGE3 y sus homólogos. Para la medición de ARNm, puede usarse amplificación (*p. ej.*, usando PCR, LCR) y/o ensayos de hibridación (*p. ej.*, hibridación Northern, protección de ARNasa, transferencia de mancha). El nivel de proteína y/o ARNm se detecta usando agentes de detección marcados directa y/o indirectamente, *p. ej.*, ácidos nucleicos marcados fluorescentemente y/o radiactivamente, anticuerpos marcados radiactivamente y/o enzimáticamente, *etc.* como se describe en el presente documento.

20 Como alternativa o además, la expresión de PRPK y/o TPRKB y sus homólogos se puede medir usando un sistema de gen indicador. Dicho sistema puede diseñarse usando un PRPK y/o TPRKB y su promotor de proteína homólogo unido operativamente a un gen indicador tal como cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, luciferasa bacteriana, O-galactosidasa y/o fosfatasa alcalina. Además, PRPK y/o TPRKB y sus homólogos se pueden usar como un indicador indirecto mediante unión a un segundo indicador tal como proteína fluorescente roja y/o verde (véase *p. ej.*, Mistili y *col.*, 1997, Nature Biotech.15:961). La construcción indicadora normalmente se transfecta en una célula. Después del tratamiento con una sustancia candidata, la cantidad de transcripción, traducción y/o actividad del gen indicador se mide de acuerdo con técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para determinar si PRPK puede inducir la fosforilación de p53 *in vivo*. En dichos métodos, las células se transfectan con vectores que expresan PRPK y/o p53 de tipo silvestre o mutante. Los extractos celulares o células completas se preparan en puntos de tiempo específicos después de la transfección, y el grado de fosforilación de p53 se analiza mediante transferencia western o espectrometría de masas (lisados) o mediante inmunofluorescencia western, o formación de imágenes de alto contenido (células completas).

#### Ensayos *in vivo*

40 Los ensayos *In vivo* implican el uso de diversos modelos animales, incluyendo animales transgénicos que han sido modificados por ingeniería para tener defectos específicos y/o marcadores de transporte que pueden usarse para medir la capacidad de una sustancia candidata para alcanzar y/o afectar diferentes células dentro del organismo. Debido a su tamaño, facilidad de manejo y/o información sobre su fisiología y/o composición genética, los ratones son una realización, especialmente para los transgénicos. Sin embargo, otros animales también son adecuados, incluyendo ratas, conejos, hámsters, cobayas, jerbos, marmotas, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos y/o monos (incluidos chimpancés, gibones y/o babuínos). Los ensayos para moduladores se pueden realizar usando un modelo animal procedente de cualquiera de estas especies y/u otras especies útiles que no se enumeran en el presente documento.

50 En dichos ensayos, se administran uno o más agentes de prueba a un animal, y la capacidad del agente o agentes de prueba para alterar una o más características, en comparación con un animal similar no tratado con el agente o agentes de prueba, identifica un modulador. Las características pueden ser cualquiera de las tratadas en el presente documento con respecto a los síntomas asociados con la proliferación celular, producción de IL-2, producción de TNF- $\alpha$ , y cualquier otro efecto de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS (*p. ej.*, inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, afecciones oncogénicas o cancerosas, *etc.*).

60 La presente invención proporciona métodos de selección de un agente que puede tratar, estabilizar y/o retrasar el inicio de una enfermedad, afección o trastorno asociado con PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, el agente comprende un modulador de PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. El tratamiento de estos animales con agentes de acuerdo con la invención implicará la administración de la sustancia, de una forma adecuada, al animal. La administración se realizará por cualquier vía que pueda utilizarse con fines clínicos y/o no clínicos, que incluyen pero sin limitación, oral, nasal, bucal y/o tópica. Como alternativa o además, la administración puede ser mediante instilación intratraqueal, instilación bronquial, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, inhalatoria y/o intravenosa (*p. ej.*, inyección intravenosa sistémica), administración regional mediante suministro de sangre y/o linfa, y/o administración directa a un sitio afectado.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención divulga un sistema de cribado, que incluye métodos y/o composiciones, para determinar si un agente es útil para tratar, estabilizar y/o retrasar el inicio de una enfermedad, afección o trastorno asociado con PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS en un mamífero. En algunas realizaciones, la sustancia candidata se determina para tratar, estabilizar y/o retrasar el inicio de una enfermedad, afección o trastorno asociado con PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS si la sustancia mejora, estabiliza y/o retrasa el inicio de los síntomas asociados a dicha enfermedad, trastorno o afección.

La determinación de la eficacia de un compuesto *in vivo* puede implicar diversos criterios diferentes. La medición de la toxicidad y/o la respuesta a la dosis se puede realizar en animales de una forma más significativa que en ensayos *in vitro* y/or *in cito*. Los ensayos *in vivo* pueden incluir modelos de enfermedades animales para mieloma múltiple, inhibición de la angiogénesis, leucemia linfocítica crónica, o leucemia linfoblástica aguda, modelos animales de tumores sólidos, cualquier modelo animal relacionado con oncología, modelos animales de inflamación y modelos animales de enfermedades autoinmunes.

#### Métodos de uso

La presente invención proporciona un método para identificar un agente que modula la actividad de un complejo PRPK/TPRKB para su uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. La presente invención proporciona un método para identificar un agente que modula la actividad de un complejo PRPK/TPRKB para su uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno asociado a la proliferación celular, producción de IL-2, o producción de TNF- $\alpha$ , activación de asesinas naturales. En determinadas realizaciones, dichos métodos implican la modulación de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En determinadas realizaciones, dichos métodos implican la activación de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En determinadas realizaciones, dichos métodos implican la inhibición de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

Se divulgan métodos para inhibir la proliferación celular que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar una disminución en la proliferación celular en comparación con un control. También se divulgan métodos para inhibir la proliferación de células B que comprende poner en contacto una célula B con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar una disminución en la proliferación de células B en comparación con un control. También se divulgan métodos para inducir la producción de IL-2 que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar un aumento en la producción de IL-2 en comparación con un control. También se divulgan métodos para inhibir TNF- $\alpha$  que comprenden poner en contacto una célula con un agente que modula un complejo PRPK/TPRKB y/o un complejo KEOPS y/o cualquier subunidad o componente del mismo, y opcionalmente que comprende además una etapa de detectar una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  en comparación con un control.

La presente invención proporciona métodos para identificar una gente que modula la actividad de un complejo PRPK/TPRKB para su uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En determinadas realizaciones, una enfermedad, trastorno o afección tratada mediante un método de la invención es inflamación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, una afección oncogénico o canceroso, artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino, septicemia, lupus, eritema nudoso leproso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, mieloma múltiple, síndrome de mielodisplasia, esclerosis múltiple, esquizofrenia, enfermedad de huésped frente a injerto, VIH, diabetes, infección bacteriana, emesis, enfermedad cardiovascular, malaria, hipertensión, arteriosclerosis, asma, esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, caquexia, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, fibrosis pulmonar idiopática, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, dolor, o cáncer de próstata. En determinadas realizaciones, un agente usado en los métodos de la invención es un agente hipnótico, sedante, anticoagulante, de terapia de recuperación, inmunestimulante, inmunosupresor, adyuvante, fungicida o del sistema nervioso.

También se divulga la composición farmacéutica que comprende un agente que modula PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En determinados aspectos, la composición farmacéutica que comprende un agente de Fórmula I, II, o III. En otros aspectos, la composición farmacéutica que comprende la sustancia candidata se administra a una célula, tal como una en un paciente que padece una enfermedad, una afección o un trastorno asociados a PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

Se divulgan métodos para tratar una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS que comprende las etapas de (1) proporcionar a un paciente que muestre síntomas de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo

PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS, y (2) administrar un agente que module PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. La presente invención permite la identificación y/o clasificación de individuos que padecen o son susceptibles a una enfermedad, una afección o un trastorno asociados a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS y/o que es probable (o poco probable) que responda al tratamiento con un modulador de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

#### *Composiciones farmacéuticas*

La presente invención proporciona métodos para identificar un agente que modula la actividad del complejo PRPK/TPRKB para su uso en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno asociado a la proliferación celular, producción de IL-2, producción de TNF- $\alpha$ , o activación de asesinas naturales. En el presente documento se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden moduladores. Se divulgan las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más modulador (es) de PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS formulados adecuadamente para la administración a un sujeto. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente una o más sustancias terapéuticamente activas adicionales.

Se divulga un método para tratar una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. El método comprende administrar una composición farmacéutica que comprende al menos un modulador identificado de acuerdo con la presente invención a un paciente que lo necesite. Los moduladores identificados de acuerdo con la presente invención se pueden administrar con otros medicamentos usados para tratar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección particular a tratar. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a seres humanos.

También se divulgan la preparación y/o el uso de las composiciones farmacéuticas que comprenden un modulador identificado de acuerdo con la presente invención como principio activo. Dicha composición farmacéutica puede consistir en el principio activo solo, en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el principio activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, uno o más ingredientes adicionales, y/o una combinación de estos. El principio activo puede estar presente en la composición farmacéutica en forma de un éster y/o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión y/o anión fisiológicamente aceptable, como es bien conocido en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión éster y/o sal "fisiológicamente aceptable" significa una forma de éster y/o sal del principio activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, que no sea nocivo para el sujeto al que la composición se va a administrar.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden preparar mediante cualquier método conocido o posteriormente desarrollado en la técnica de la farmacología. En general, dichos métodos preparatorios incluyen la etapa de poner el principio activo en asociación con un vehículo y/o uno o más de otros ingredientes accesorios, y luego, si es necesario y/o deseable, conformar y/o empaquetar el producto en una unidad de dosis individual o múltiple.

Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se refieren principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para su administración a seres humanos, el experto en la técnica entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para su administración a animales de todo tipo. La modificación de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer las composiciones adecuadas para la administración a diversos animales se comprende bien, y el farmacólogo veterinario experto puede diseñar y/o realizar dicha modificación con experimentación simplemente ordinaria, si la hay. Los sujetos a los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas incluyen, pero sin limitación, seres humanos y/u otros primates; mamíferos, incluyendo mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y/o perros; y/o aves, incluyendo aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, gansos y/o pavos.

Una composición farmacéutica se puede preparar, empaquetar y/o comercializar a granel, como dosis unitaria individual y/o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad pequeña de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo, que se administraría a un sujeto y/o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosificación.

Las cantidades relativas del principio activo, el vehículo farmacéuticamente aceptable, y/o cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica variarán, dependiendo de la identidad, tamaño, y/o estado del sujeto tratado, y adicionalmente dependiendo de la vía por la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0,1 % y 100 % (p/p) de principio activo.

En general, una composición farmacéutica incluirá un agente terapéutico además de uno o más ingredientes adicionales, que incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; gomas de granulación y/o desintegración; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y/o disolventes acuosos; vehículos y/o disolventes aceitosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes y/o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; materiales poliméricos y/o hidrófobos farmacéuticamente aceptables; y/o combinaciones de los mismos, según sea adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005) divulga otros ingredientes adicionales que se pueden usar para formular composiciones farmacéuticamente aceptables y/o técnicas conocidas para la preparación de las mismas.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, empaquetar y/o comercializar en forma de una suspensión y/o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión y/o solución puede formularse de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes y/o agentes de suspensión descritos en el presente documento. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar usando un diluyente y/o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como agua y/o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y/o disolventes aceptables incluyen, pero sin limitación, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica y/o aceites fijados tales como mono y/o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables de forma parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, y/o como un componente de un sistema de polímero biodegradable. Las composiciones para la liberación sostenida y/o implantación pueden comprender materiales poliméricos y/o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble y/o una sal soluble en pequeñas cantidades.

Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto, a menudo es deseable disminuir la absorción del compuesto de la inyección subcutánea y/o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino y/o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y/o de la forma cristalina. Como alternativa o además, la absorción retardada de una forma de compuesto administrada parenteralmente se puede lograr disolviendo y/o suspendiendo el compuesto en un vehículo aceitoso. Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de compuesto a polímero y/o la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del compuesto. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y/o poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito se preparan inmovilizando el compuesto en liposomas y/o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, y/o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse y/o dispersarse en agua estéril y/o otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Una formulación de una composición farmacéutica adecuada para la administración oral se puede preparar, empaquetar y/o comercializar en forma de una unidad de dosis sólida discreta que incluye, pero sin limitación, un comprimido, una cápsula dura o blanda, una oblea, un trocisco, y/o una gragea, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo. Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero sin limitación, una formulación en polvo y/o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una solución acuosa u oleosa, y/o una emulsión. Tal como se usa en el presente documento, un líquido "oleoso" es uno que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que muestra un carácter menos polar que el agua.

Las formulaciones en polvo y/o granulares de una preparación farmacéutica se pueden preparar usando métodos conocidos. Dichas formulaciones pueden administrarse directamente a un aparato, usarse, por ejemplo, para formar comprimidos, para llenar cápsulas, y/o para preparar una suspensión y/o solución acuosa u oleosa mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a las mismas.

Una composición farmacéutica puede prepararse, empaquetarse y/o comercializarse en forma de una emulsión de aceite en agua y/o una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva y/o de cacahuate, un aceite mineral tal como parafina líquida, y/o una combinación de estos. Dichas composiciones pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes tales como gomas de origen natural tales como goma arábiga y/o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural tales como fosfátido de soja y/o lecitina, ésteres y/o ésteres parciales procedentes de combinaciones de ácidos grasos y/o anhídridos de hexitol tales como monooleato de sorbitán, y/o productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno tal como monooleato de polioxietilensorbitán. Estas emulsiones pueden contener ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo, agentes edulcorantes o saborizantes.

Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica que son adecuadas para la administración oral

incluyen, pero sin limitación, acuosas pueden prepararse, empaquetarse y/o comercializarse en forma líquida y/o en forma de un producto seco. producto destinado a la reconstitución con agua y/u otro vehículo adecuado antes de su uso.

- 5 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y/o elixires farmacéuticamente aceptables. Además de cualquier compuesto activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua, solución salina isotónica y/u otros disolventes, agentes solubilizantes y/o emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, 10 sésamo; semilla de soja; albaricoque; palma; cacahuete; cártamo; coco; oliva; manteca de cacao; almendra de palma, manteca de karité, girasol, almendra, aguacate, borraja silvestre; carnauba, avellana, ricino; semilla de algodón, onagra; reloj anaranjado, colza, salvado de arroz, nuez, germen de trigo; grano de melocotón; babasu; semilla de mango; semilla de grosella negra; jojoba; nuez de macademia; espinillo de mar; sasquana; tsubaki; 15 malva; semilla de shambrilla; café; emú; visón; semilla de uva; cardo; árbol de té; semilla de calabaza; nuez de kukui; y/o mezclas de los mismos), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y/o ésteres de ácidos grasos de sorbitán, alcohol etílico, aceites minerales tales como parafina líquida, y/o mezclas de los mismos.

- Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden comprender además uno o más ingredientes 20 adicionales que incluyen, pero sin limitación, agentes de suspensión, agentes dispersantes y/o humectantes, agentes emulsionantes, demulcentes, conservantes, tampones, sales, aromatizantes, agentes colorantes, y/o agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender adicionalmente un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero sin limitación, jarabe de sorbitol, grasas comestibles hidrogenadas, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma arábiga y/o derivados de celulosa tales como 25 carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa.

- Los agentes dispersantes y/o humectantes conocidos incluyen, pero sin limitación, fosfátidos de origen natural tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, con un alcohol alifático de 30 cadena larga, con un éster parcial procedente de un ácido graso y/o un hexitol, y/o con un éster parcial procedente de un ácido graso y/o un anhídrido de hexitol (*p. ej.*, estearato de polioxietileno, heptadecaetilenooxicetanol, monooleato de polioxietileno sorbitol, y/o monooleato de polioxietilensorbitán, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero sin limitación, lecitina y/o acacia. Los conservantes conocidos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, y/o n-propilo para hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y/o ácido sórbico. Los edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y/o sacarina. Los agentes espesantes 35 conocidos para suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura y/o alcohol cetílico.

- Las soluciones líquidas del principio activo en disolventes acuosos u oleosos pueden prepararse sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, siendo la principal diferencia que el principio activo se disuelve, en lugar de suspenderse en el disolvente. Las soluciones líquidas de la composición farmacéutica pueden comprender 40 cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, entendiéndose que los agentes de suspensión no ayudarán necesariamente a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y/o solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, aceite de cacahuete, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, de oliva, de sésamo y/o de coco, aceites vegetales fraccionados y/o aceites minerales tales como 45 parafina líquida.

- Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y/o 50 gránulos. Los excipientes farmacéuticamente aceptables usados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, agentes de granulación y/o desintegración, agentes de unión, y/o agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero sin limitación, almidón de patata y/o glicolato sódico de almidón. Los agentes tensioactivos conocidos incluyen, pero sin limitación, lauril sulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y/o fosfato de sodio. Los agentes de granulación y/o desintegración conocidos incluyen, pero sin limitación, almidón de maíz y/o ácido algínico. Los agentes de unión conocidos incluyen, pero sin 55 limitación, gelatina, goma arábiga, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, y/o hidroxipropil metilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílice y/o talco. Los comprimidos pueden ser no recubiertos y/o pueden recubrirse usando métodos conocidos para lograr una desintegración retardada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando de este modo una liberación sostenida y/o absorción del principio activo. A modo de ejemplo, se puede usar un material tal como monoestearato de glicerilo y/o diestearato de glicerilo para recubrir comprimidos. Además, a modo de ejemplo, 60 los comprimidos se pueden recubrir usando los métodos descritos en las Patentes de los EE.UU. 4.256, 108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación osmóticamente controlada. Los comprimidos pueden comprender adicionalmente un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante y/o alguna combinación de estos con el fin de proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y/o 65 apetitosa.

Los aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, PVP (polivinil pirrolidona), HPC de bajo peso molecular (hidroxipropilcelulosa), celulosa microcristalina, HPMC de bajo peso molecular (hidroxipropil metilcelulosa), carboximetilcelulosa de bajo peso molecular, etilcelulosa, alginatos, gelatina, óxido de polietileno, goma arábica, dextrina, sacarosa, silicato de aluminio y magnesio y/o polimetacrilatos.

5 Las cargas incluyen agentes seleccionados de entre el grupo que consiste en celulosa microcristalina, almidón, lactitol, lactosa, una sal de calcio inorgánica adecuada, sacarosa, glucosa, manitol, ácido silícico y/o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el núcleo comprende un aglutinante y/o una carga.

10 La incorporación de disgregante (s) adecuado (s) en una forma de dosificación sólida puede facilitar la descomposición. La adición de disgregante puede facilitar la liberación del compuesto activo y/o el logro del equilibrio de concentración en el tracto GI. Los desintegrantes adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, agar, carbonato de calcio, patata y/o almidón de tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, carbonato de sodio, crospovidona (PVP reticulado), carboximetil almidón de sodio (glicolato de almidón de sodio),  
15 carboximetilcelulosa de sodio reticulada (croscarmelosa), almidón pregelatinizado (almidón 1500), almidón microcristalino, almidón insoluble en agua, carboximetilcelulosa de calcio, silicato de aluminio y magnesio (Veegum) y/o una combinación de los mismos.

20 Los tensioactivos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., poloxámero, éteres polioxietilenados, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, polioxietileno alquil éter, polisorbato, alcohol cetílico, ésteres de ácido graso de glicerol (p. ej., triacetina, monoestearato de glicerol, etc.), estearato de polioximetileno, lauril sulfato sódico, ésteres de ácidos graso de sorbitano, ésteres de ácido graso de sacarosa, cloruro de benzalconio, aceite de ricino polietoxilado y/o docusato de sodio, etc., y/o combinaciones de los mismos.  
25 En algunas realizaciones, el núcleo puede comprender además un tensioactivo.

Agentes retardadores de la solución tales como parafina, aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol, absorbentes tales como caolín y/o arcilla de bentonita, y/o lubricantes tales como talco, estearato de calcio,  
30 estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y/o mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y/o píldoras, la forma de dosificación puede comprender agentes tamponantes.

Las composiciones sólidas se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras, por ejemplo usando excipientes tales como lactosa y/o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular, etc. Formas de dosificación sólidas tales como comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y/o gránulos se pueden preparar con recubrimientos y/o cubiertas tales como recubrimientos entéricos y/u otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y/o pueden ser de una composición en la que liberan el (los) principio (s) activo (s) solamente, y/o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones de  
40 inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y/o ceras.

Las composiciones sólidas se pueden preparar en una forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Por ejemplo, comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y/o gránulos se pueden preparar con recubrimientos y/o cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y/u otros  
45 recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa y/o almidón. Dichas formas de dosificación pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, p. ej., lubricantes de formación de comprimidos y/u otros adyuvantes de formación de comprimidos, tales como estearato de magnesio y/o celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas,  
50 comprimidos y/o píldoras, las formas de dosificación pueden comprender agentes tamponantes. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y/o pueden ser de una composición en la que liberan el (los) principio (s) activo (s) solo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y/o ceras.

55 Las composiciones para administración rectal y/o vaginal pueden ser supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos con excipientes y/o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol y/o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto y/o en la cavidad vaginal y libera el compuesto activo.

60 Las formas de dosificación para la administración tópica y/o transdérmica de un compuesto de esta invención pueden incluir ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhaladores y/o parches. En general, el componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o cualquier conservante y/o tampón necesarios según se requiera. Además, se contempla el uso de parches transdérmicos, que a menudo tienen la ventaja añadida de proporcionar la entrega controlada de un  
65 compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo y/o dispensando el compuesto en el medio adecuado. Los potenciadores de la absorción se pueden usar para aumentar el flujo del

compuesto a través de la piel. Como alternativa o además, la velocidad se puede controlar proporcionando una membrana controladora de la velocidad y/o dispersando el compuesto en una matriz y/o gel polimérico.

5 Los dispositivos adecuados para su uso en la entrega de composiciones farmacéuticas intradérmicas descritas en el presente documento incluyen dispositivos de aguja cortos tales como los descritos en las Patentes de los EE.UU. 4.886.499; 5.190.521; 5.328.483; 5.527.288; 4.270.537; 5.015.235; 5.141.496; y 5.417.662. Las composiciones intradérmicas se pueden administrar mediante dispositivos que limitan la longitud de penetración eficaz de una aguja en la piel, tales como las descritas en la publicación PCT WO 99/34850 y sus equivalentes funcionales. Son  
10 adecuados los dispositivos de inyección de chorro que entregan vacunas líquidas a la dermis a través de un inyector de chorro líquido y / o a través de una aguja que perfora el estrato córneo y produce un chorro que llega a la dermis. Los dispositivos de inyección de chorro se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE. UU. 5.480.381; 5.599.302; 5.334.144; 5.993.412; 5.649.912; 5.569.189; 5.704.911; 5.383.851; 5.893.397; 5.466.220; 5.339.163; 5.312.335; 5.503.627; 5.064.413; 5.520.639; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 4.940.460; y en la Publicaciones PCT WO 97/37705 y WO 97/13537. Son adecuados los dispositivos de entrega balística de polvo/partículas que usan gas comprimido para acelerar la vacuna en forma de polvo a través de las capas exteriores de la piel hasta alcanzar la  
15 dermis. Como alternativa o además, pueden usarse jeringas convencionales en el método clásico de mantoux de administración intradérmica.

20 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero sin limitación, preparaciones líquidas y/o semilíquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua y/o de agua en aceite tales como cremas, ungentos y/o pastas, y/o soluciones y/o suspensiones. Las formulaciones que se pueden administrar por vía tópica, por ejemplo, comprenden de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % (p/p) de principio activo, aunque la concentración del principio activo puede ser tan alta como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las formulaciones para la administración tópica pueden comprender además uno o más de los  
25 ingredientes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica puede prepararse, empaquetarse, y/o comercializarse en una formulación adecuada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el principio activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 a  
30 aproximadamente 7 nanómetros o de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nanómetros. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para la administración usando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente propulsora para dispersar el polvo y/o usar un depósito autopropulsor dispensador de disolvente/polvo tal como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto y/o suspendido en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Dichos polvos comprenden  
35 partículas en las que al menos el 98 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 0,5 nanómetros y al menos el 95 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 7 nanómetros. Como alternativa, al menos el 95 % de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 1 nanómetro y al menos el 90 % de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 6 nanómetros. Las composiciones de polvo seco pueden incluir un diluyente de polvo fino sólido tal como azúcar y se proporcionan convenientemente en una forma de dosis unitaria.

40 Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición por debajo de 65 grados F (18,3 °C) a la presión atmosférica. Por lo general, el propulsor puede constituir del 50 al 99,9 % (p/p) de la composición, y el principio activo puede constituir del 0,1 al 20 % (p/p) de la composición. El propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un tensioactivo no iónico líquido y/o un  
45 tensioactivo aniónico sólido y/o un diluyente sólido (que puede tener un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas de la invención formuladas para la entrega pulmonar pueden proporcionar el principio activo en forma de gotitas de una solución y/o suspensión. Dichas formulaciones pueden prepararse,  
50 empaquetarse y/o comercializarse como soluciones y/o suspensiones alcohólicas acuosas y/o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el principio activo, y se pueden administrar convenientemente usando cualquier dispositivo de nebulización y/o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero sin limitación, un agente aromatizante tal como sacarina de sodio, un aceite volátil, un agente tamponante, un agente tensioactivo, y/o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotitas proporcionadas por esta vía de administración pueden tener un diámetro medio en el intervalo de  
55 aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros.

Las formulaciones descritas en el presente documento que son útiles para la entrega pulmonar son útiles para la entrega intranasal de una composición farmacéutica. Otra formulación adecuada para la administración intranasal es  
60 un polvo grueso que comprende el principio activo y que tiene un diámetro medio de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra de la manera en que se toma el tabaco, es decir, por inhalación rápida a través del paso nasal desde un recipiente del polvo que se mantiene cerca de las fosas nasales.

Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden, por ejemplo, comprender desde  
65 aproximadamente tan solo un 0,1 % (p/p) y tanto como un 100 % (p/p) del principio activo, y pueden comprender uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Una composición farmacéutica se puede



preparar, empaquetar y/o comercializar en una formulación adecuada para la administración bucal. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos y/o grageas preparadas usando métodos convencionales, y pueden comprender, por ejemplo, de 0,1 a 20 % (p/p) de principio activo, comprendiendo el resto una composición oralmente disoluble y/o degradable y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Como alternativa, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo y/o una solución y/o suspensión aerosolizada y/o atomizada que comprende el principio activo. Dichas formulaciones en polvo aerosolizadas y/o aerosolizadas, cuando se dispersan, pueden tener un tamaño medio de partícula y/o gotitas en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros y pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica puede prepararse, empaquetarse y/o comercializarse en una formulación adecuada para la administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de colirio que incluyen, por ejemplo, una solución al 0,1/1,0 % (p/p) y/o suspensión del principio activo en un vehículo líquido acuoso u oleoso. Dichas gotitas pueden también comprender agentes tamponantes, sales, y/o uno o más de los ingredientes adicionales descritos en el presente documento. Otras formulaciones administrables oftálmicamente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina y/o en una preparación liposomal. Las gotas para los oídos y/o el colirio están contemplados.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante diversas vías, que incluyen oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, subcutánea, intraventricular, transdérmica, intradérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, cremas, y/o gotas), mucosal, bucal, enteral, sublingual, y/o como una pulverización oral, nasal, y/o un aerosol. En general, la vía de administración más adecuada dependerá de diversos factores que incluyen la naturaleza del agente (*p. ej.*, su estabilidad en el entorno del tracto gastrointestinal), el estado del paciente (*p. ej.*, si el paciente puede tolerar la administración oral), *etc.* En la actualidad, la vía de aerosol y/o de pulverización oral y/o nasal se usa más comúnmente para entregar agentes terapéuticos directamente a los pulmones y/o al sistema respiratorio. Sin embargo, la entrega de la composición farmacéutica por cualquier vía adecuada que tenga en cuenta posibles avances en la ciencia está abarcada.

Se pueden encontrar consideraciones generales en la formulación y/o fabricación de agentes farmacéuticos, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21<sup>a</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

#### *Administración*

Normalmente, las dosificaciones de un agente que pueden administrarse a un animal (*p. ej.*, un ser humano) oscilan en una cantidad de entre 1 mg y aproximadamente 100 g por kilogramo de peso corporal del sujeto. Si bien, la dosificación precisa administrada variará dependiendo de cualquier número de factores, incluyendo pero no de forma limitativa, el tipo de animal y/o el tipo de patología que se está tratando, la edad del animal y/o la vía de administración. En algunas realizaciones, la dosificación del compuesto variará de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g por kilogramo de peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación variará de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g por kilogramo de peso corporal del sujeto.

El compuesto puede administrarse a un sujeto con la misma frecuencia varias veces al día, y o puede administrarse con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, y/o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para el experto en la técnica y dependerá de cualquier número de factores, tales como, pero sin limitación, el tipo y/o la gravedad de la enfermedad que se está tratando, el tipo y/o la edad del sujeto, *etc.*

Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención será decidido por el médico tratante y/o veterinario dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente y/o sujeto particular dependerá de diversos factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente y/o sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación y/o coincidentes con el compuesto específico empleado y/o factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. Por "en combinación con", no se pretende implicar que los agentes se deben administrar al mismo tiempo y/o formularse para la entrega conjunta. En general, cada agente se administrará en una dosis y/o en un cronograma determinado para ese agente. Además, se divulga la entrega de las composiciones farmacéuticas de la invención junto con agentes que pueden mejorar su biodisponibilidad, reducir y/o modificar su metabolismo, inhibir su excreción, y/o modificar su distribución dentro del cuerpo. Aunque las composiciones farmacéuticas se pueden usar para el tratamiento de cualquier sujeto (*p. ej.*, cualquier animal) que lo necesite, se usan más preferentemente en el tratamiento de seres humanos.

La combinación particular de terapias (terapéuticas y/o procedimientos) para emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los productos terapéuticos y/o procedimientos deseados y/o el efecto terapéutico deseado a alcanzar. Se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), y/o pueden lograr diferentes efectos (*p. ej.*, control de cualquier efecto adverso).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas y/o en combinación con uno o más agentes diferentes que se usan para tratar los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS. En algunas realizaciones, dichos agentes pueden incluir talidomida, lenalidomida y/o pomalidomida. En alguna realización, dicho agente puede incluir bortezomib o dexametasona. En algunas realizaciones, dicho agente puede incluir cualquier fármaco oncológico aprobado.

Se apreciará además que los agentes terapéuticamente activos utilizados en combinación pueden administrarse juntos en una única composición o administrarse por separado en diferentes composiciones.

En algunas realizaciones, los moduladores identificados de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en combinación con uno o más moduladores diferentes de una enfermedad, afección o trastorno asociado a PRPK, TPRKB, OSGEP, LAGE3 y sus homólogos, complejo PRPK-TPRKB y/o complejo KEOPS.

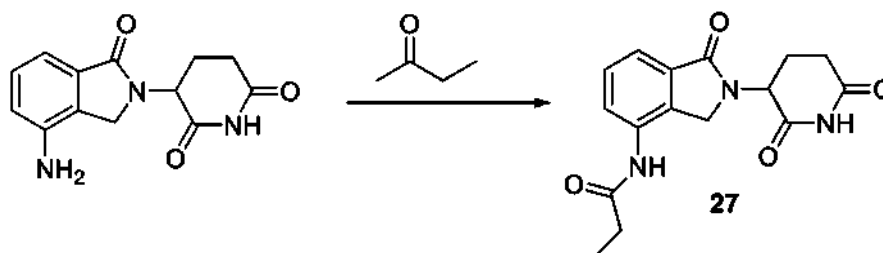
En general, se espera que los agentes usados en combinación con se administren a niveles que no excedan los niveles a los que se usan individualmente. En algunas realizaciones, los niveles usados en combinación serán menores que los administrados individualmente.

### Ejemplificación

**Información general de síntesis.** Todas las reacciones se llevaron a cabo en un horno o en un material de vidrio secado con llama bajo una atmósfera de argón empleando técnicas convencionales en el manejo de materiales sensibles al aire. Todos los reactivos y disolventes obtenidos comercialmente se usaron tal como se suministraron. Se compraron THF anhidro, DMSO, piridina y DCM con tamices moleculares de productos químicos ACROS. Las reacciones se agitaron magnéticamente y se controlaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y mediante métodos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). La TLC se realizó usando placas 60 F<sub>254</sub> previamente recubiertas de gel de sílice E. Merck de 0,25 mm y tinción con vainillina, tinción con molibdato o UV para la visualización. La cromatografía ultrarrápida se realizó con gel de sílice 60 (tamaño de partícula 0,032-0,063 mm) suministrado por Sorben Technologies. El sistema de cuadrupolo simple LC-MSD Agilent serie 1100 con detector de matriz de diodos y fuente de ion de electropulverización se usó para el proceso analítico y para purificaciones HPLC de fase inversa preparativas. La columna preparativa Agilent C-18 (21,2 x 100 mm, 5 μm) se usó para todas las purificaciones HPLC preparativa a un caudal de 15 ml/min usando mezclas de acetonitrilo y agua con ácido fórmico al 0,1 %. Los rendimientos se refieren a compuestos cromatográfica y espectroscópicamente puros. El espectro de <sup>1</sup>H RMN se registró usando un bloqueo de deuterio interno a temperatura ambiente en un espectrómetro Varian de 400 MHz. Se usó una referencia interna de δ<sub>H</sub> 7,26 para CDCl<sub>3</sub>. Los datos de RMN se representan de la siguiente manera: desplazamiento químico (en ppm en la escala δ relativa a δ<sub>TMS</sub> = 0), integración, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, m = multiplete, dd = doblete de dobletes, td = triplete de dobletes, br = ancho) y constante de acoplamiento (J/Hz). Las resonancias que están parcial o totalmente oscurecidas se indican oscurecidas (obsc). Los espectros de masas se obtuvieron usando Agilent 1100 serie LC-MS.

Cultivo celular general. Las líneas celulares Jurkat, NCI-H929, HS-Sultan, HEK-293FT y JeKo-1 se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron por requisitos de medios especificados por el proveedor a 37 °C en incubadoras de 5 % de CO<sub>2</sub>. Las PBMC crioconservadas se obtuvieron de Astarte Biologics y se descongelaron y mantuvieron según los requisitos de los medios especificados por el proveedor.

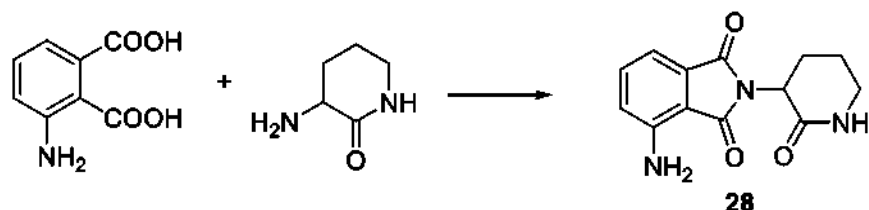
### Ejemplo 1 (Referencia)



**N-(2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-t-oxoisoindolin-4-il)propionamida (27).** Una solución de lenalidomida (0,020 g,

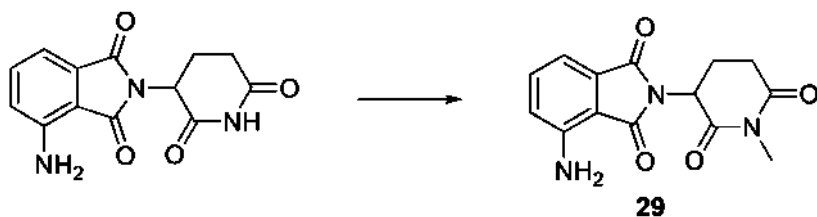
0,077 mmol) en piridina (0,8 ml) se enfrió a 0 °C (baño de hielo). Se añadió cloruro de propionilo (0,009 ml, 0,100 mmol) gota a gota y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante 16 h. Los volátiles se eliminaron a vacío y el residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (MeOH al 0 → 5 % en DCM como eluyente) para proporcionar el producto deseado 27 (0,012 g, 50 %) en forma de un polvo blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 11,04 (s, 1H), 9,79 (s, 1H), 7,80 (dd, *J* = 6,6, 2,3 Hz, 1H), 7,64 - 7,29 (m, 2H), 5,14 (dd, *J* = 13,2, 4,9 Hz, 2H), 4,35 (c, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,00 - 2,79 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 2,05-1,92 (m, 1H), 1,08 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H). MS (ESI) *m/z* calc. para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 316,3, observado: 316,8.

#### Ejemplo 2 (Referencia)



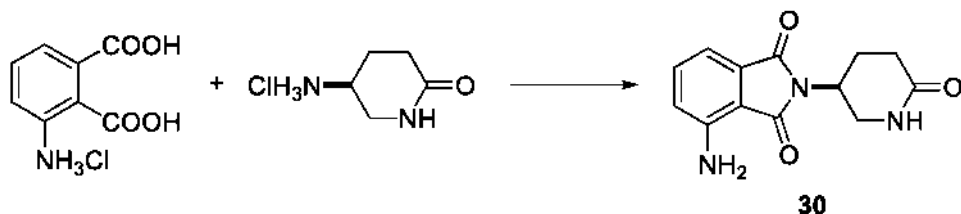
**4-amino-2-(2-oxopiperidin-3-yl)isoindolina-1,3-diona (28).** A una solución de ácido 3-aminoftálico (0,100 g, 0,552 mmol) en DMF (1,1 ml) se añadió 3-aminopiperidina-2-ona (0,063 g, 0,552 mmol) y la reacción se agitó a 90 °C durante 18 h. Los volátiles se eliminaron a vacío y el residuo bruto de color marrón oscuro se purificó por HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar el producto deseado 28 (0,050 g, 35 %) en forma de un polvo blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 7,83 (s, 1H), 7,43 (dd, *J* = 8,3, 7,1 Hz, 1H), 7,07 - 6,87 (m, 2H), 6,47 (s a, 2H), 4,49 (dd, *J* = 11,9, 6,3 Hz, 1H), 3,27-3,10 (m, 2H), 2,19 (dt, *J* = 12,0, 7,7 Hz, 1H), 2,05-1,72 (m, 3H). MS (ESI) *m/z* calc. para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 260,3, observado: 260,9.

#### Ejemplo 3 (Referencia)



**4-amino-2-(1-metil-2,6-dioxopiperidin-3-yl)isoindolina-1,3-diona (29).** A una solución de NaO<sup>t</sup>Bu (0,074 g, 0,769 mmol) en DMSO (0,8 ml) se añadió una solución de pomalidomida (0,100 g, 0,366 mmol) en DMSO (0,5 ml más 0,5 ml de aclarado) gota a gota. La reacción se agitó durante 10 min a temperatura ambiente seguido de la adición de yoduro de metilo (0,025 ml, 0,403 mmol). Después de 18 h, se añadió ácido acético glacial (0,1 ml) a la reacción, los volátiles se retiraron a vacío, y el residuo marrón oscuro bruto se purificó por HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar 29 (0,02 g, 19 %) en forma de un polvo de color amarillo claro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO) δ 7,46 (dd, *J* = 8,4, 7,0 Hz, 1H), 7,00 (dd, *J* = 7,6, 5,6 Hz, 2H), 6,53 (s a, 2H), 5,11 (dd, *J* = 13,2, 5,7 Hz, 1H), 2,97 - 2,83 (m, 1H), 2,76 (s, 1H), 2,57 - 2,51 (m, 1H), 2,06 - 1,91 (m, 1H). MS (ESI) *m/z* calc. para C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 288,3, observado: 288,5.

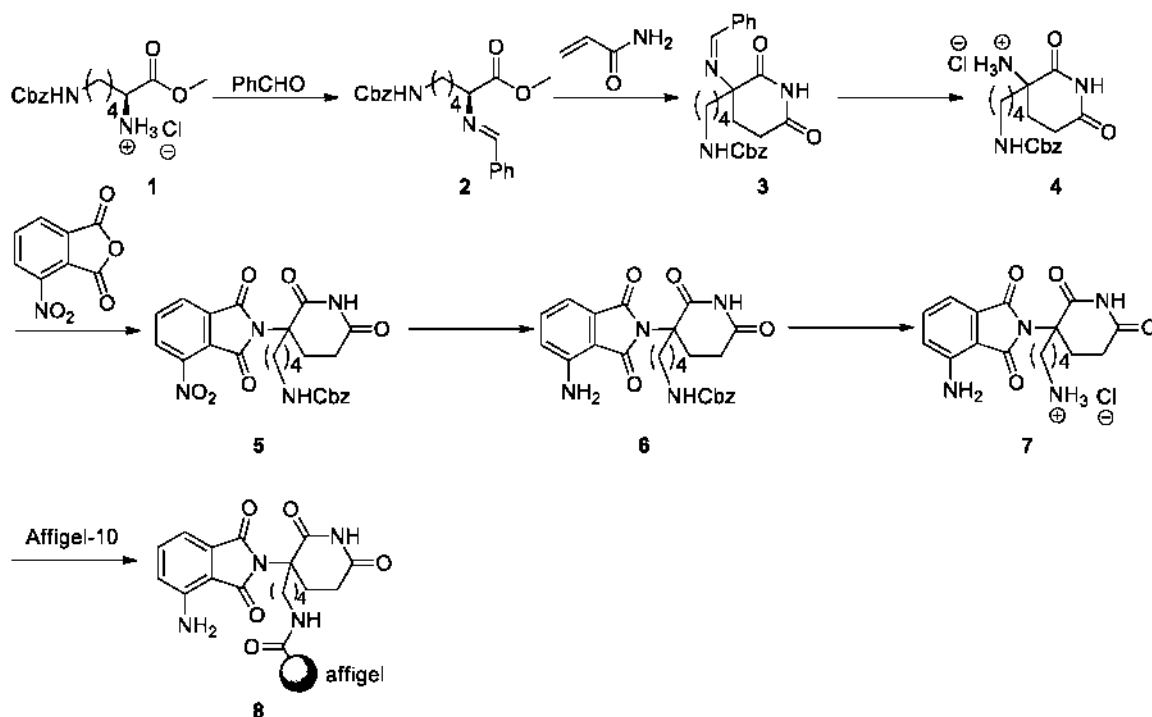
#### Ejemplo 4 (Referencia)



**(S)-4-amino-2-(6-oxopiperidin-3-yl)isoindolina-1,3-diona (30).** A una mezcla de hidrocloreto de ácido 3-aminoftálico (0,144 g, 0,664 mmol) e hidrocloreto de (S)-5-aminopiperidin-2-ona (0,100 g, 0,664 mmol) en DMF seco (2,2 ml) se añadió trietilamina (0,933 ml, 6,64 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 18 h. La mezcla bruta se inactivó mediante la adición de una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) y se extrajo usando DCM (3x20 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El residuo bruto se purificó por HPLC preparativa de fase inversa para proporcionar el producto deseado 30 (0,08 g, 47 %) en forma de un polvo blanquecino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) δ 7,56 (s, 1H), 7,42 (dd, *J* = 7,7, 7,7 Hz, 1H), 6,94 (m, 2H), 6,48 (s a, 2H), 4,32 (m, 1H), 3,60 (app t, *J* = 11,3 Hz, 1H), 3,23 - 3,02 (m, 1H), 2,62 - 2,42 (obsc m, 1H), 2,42 - 2,21 (m,

2H), 1,86 (m, 1H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $C_{13}H_{14}N_3O_3$   $[M+H]^+$  260,3, observado: 260,7.

### Ejemplo 5 (Referencia)



**Síntesis de (S)-metil 2-(bencilidenoamino)-6-((benciloxi)carbonil)amino)hexanoato (2).** A hidrocloreto de N $\epsilon$ -Z-L-lisina metil éster (1 g, 3,022 mmol) y  $MgSO_4$  (0,253 g, 2,1 mmol) en un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación se añadió DCM (4,3 ml). A la suspensión se añadió trietilamina (0,5 ml, 3,63 mmol) seguido de benzaldehído (0,3 ml, 3,022 mmol) durante 10 minutos. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 h y se filtró. Los sólidos se lavaron posteriormente con DCM. La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró para proporcionar 2 en forma de un aceite incoloro (1 g, 87 %) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.  $R_f = 0,68$  (DCM:MeOH 9:1).

**Síntesis de (4-(3-(bencilidenoamino)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (3).** A una solución de 2 (4 g, 10,4 mmol) y acrilamida (1,11 g, 15,7 mmol) en THF (40 ml) se añadió en porciones *tert*-butoxido de potasio (1,23 g, 11,0 mmol) durante un periodo de 15 min a 0 °C. Después de 3,5 h, la mezcla se inactivó con  $NH_4Cl$  acuoso y se extrajo en EtOAc. La capa orgánica se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se concentró para proporcionar 3 (3,6 g, 82 %) sin purificación adicional.  $R_f = 0,33$  (DCM:MeOH 95:5).

**Síntesis de hidrocloreto de bencilo (4-(3-amino-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato (4).** A una solución de 3 (3,6 g, 8,54 mmol) en THF (21 ml) se añadió en porciones HCl acuoso 4 M a 0 °C. La mezcla se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 5 h. Un precipitado blanco que se formó durante la reacción se filtró y se lavó THF. Se proporcionaron dos recristalizaciones 4 (2,88 g, 91,2 %) en forma de un sólido de color blanco.  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO)  $\delta$  11,30 (s, 1H), 8,62 (s, 3H), 7,46 - 7,15 (m, 5H), 4,97 (m, 2H), 3,59 (m, 2H), 2,98 (m, 2H), 2,76 (m, 1H), 2,58 (m, 1H), 2,24 - 1,97 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,74 (m, 1H), 1,21 (m, 1H).

**Síntesis de (4-(3-(4-nitro-1,3-dioxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (5).** A una mezcla de 4 (0,326 g, 0,881 mmol), anhídrido 3-nitro-ftálico (0,211 g, 1,093 mmol) y acetato de sodio (0,097 g, 1,181 mmol) se añadió ácido acético (4,0 ml) y la mezcla resultante se agitó durante una noche a 130 °C. Después de 20 h, la mezcla se neutralizó cuidadosamente con bicarbonato de sodio y se extrajo en DCM. La capa orgánica se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró, y se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 95:5) proporcionó 5 (0,241 g, 54 %) en forma de un sólido de color blanco.

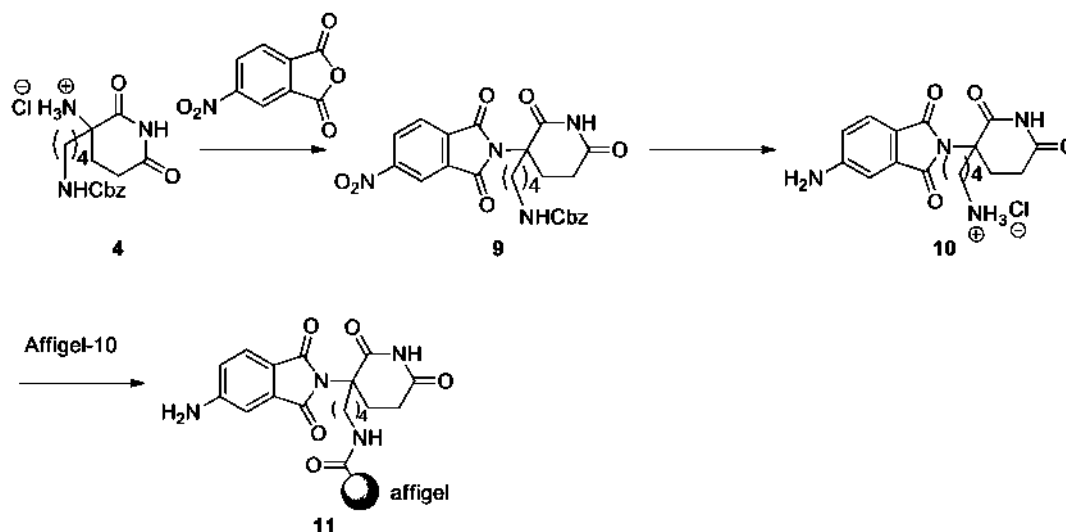
**Síntesis de (4-(3-(4-amino-1,3-dioxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (6).** A una suspensión de 5 (0,24 g, 0,472 mmol) en etanol (15 ml) se añadió níquel Raney (WR. Grace y Co. Raney® 4200, en suspensión, en  $H_2O$ ) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 1,5 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón, se filtró usando EtOH y se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 95:5) proporcionó 6 (0,112 mg, 49 %) en forma de un sólido de color amarillo brillante.  $R_f = 0,38$  (DCM:MeOH 95:5). RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10,97 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 7,71 - 7,52 (m, 2H), 7,49 - 7,18 (m, 5H), 7,10 (m, 1H), 5,07 - 4,85 (m, 2H),

2,96 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,22 (m, 2H), 2,02 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,22 (m, 2H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $C_{25}H_{27}N_4O_6$   $[M+H]^+$  479,5, observado 479,9.

5 **Síntesis de hidrocloreto de 4-amino-2-(3-(4-aminobutil)-2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolina-1,3-diona (7).** A una solución de 6 (0,111 g, 0,232 mmol) en HCl al 2 % en etanol (60 ml) se añadió paladio sobre carbón activado (0,025 g) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 4 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón y se filtró usando etanol y metanol. La HPLC preparativa proporcionó 7 (0,055 g, 69 %) en forma de un sólido de color amarillo brillante. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8,31 (s, 1H), 7,52 - 7,34 (m, 1H), 6,94 (m, 2H), 6,53 (s a, 2H), 2,74 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 2,65 (m, 1H), 2,63 - 10 2,56 (m, 1H), 2,54 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 2,31 (m, 1H), 2,21 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,52 (m, 1H), 1,48 - 1,38 (m, 1H), 1,26 (m, 2H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $C_{17}H_{21}N_4O_4$   $[M+H]^+$  345,4, observado 345,7.

15 **Síntesis de 8 (reactivo de afinidad a base de pomalidomida).** Aproximadamente 2 ml de una suspensión de affigel-10 (15  $\mu$ mol/ml de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a un volumen sedimentado de 1,04 ml. El isopropanol se eliminó y el affigel-10 se lavó con DMSO (3x5 ml). Posteriormente se añadió una solución de DMSO (2,2 ml) de 7 (0,002 g, 0,00525 mmol) y trietilamina (0,007 ml, 0,0525 mmol) y la mezcla resultante se selló y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 16 h, el tubo cónico se centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de 7 mediante LC-MS. 7 no se observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,015 ml, 0,105 mmol) y etanolamina (0,006 ml, 0,10503 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 20 h, se centrifugó SS-0007896, se retiró el disolvente y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en isopropanol a -20  $^{\circ}C$ .

#### 25 Ejemplo 6 (Referencia)



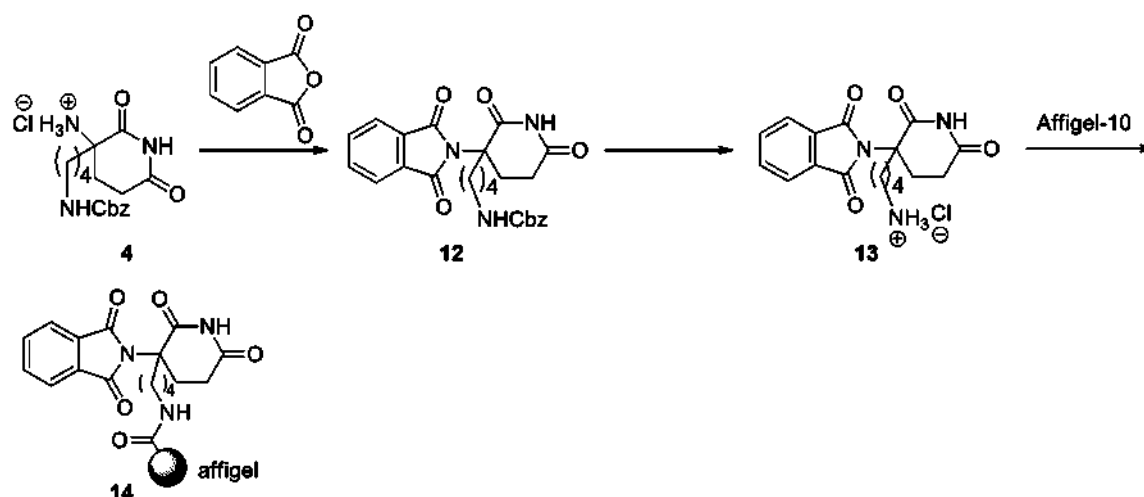
30 **Síntesis de (4-(3-(5-nitro-1,3-dioxoisoindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (9).** A una suspensión de 4 (0,4 g, 1,08 mmol), anhídrido 4-nitro-ftálico (0,259 g, 1,34 mmol) y acetato de sodio (0,125 g, 1,45 mmol) se añadió ácido acético (4 ml) y la mezcla resultante se agitó a 130  $^{\circ}C$ . Después de 6 h, la mezcla se inactivó con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó sobre  $MgSO_4$  y se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 95:5) proporcionó 9 (0,45 g, 87 %).  $R_f = 0,36$  (DCM:MeOH 95:5).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,62 (par obsc s, 1H), 8,60 - 8,51 (par obsc m, 1H), 8,16 - 7,86 (m, 2H), 7,44 - 7,27 (m, 5H), 5,07 (m, 2H), 3,23 (m, 3H), 2,93 - 2,49 (m, 3H), 2,46 - 2,23 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 1,79 - 1,47 (m, 3H), 1,45 - 1,17 (m, 2H), 1,00 - 0,75 (m, 1H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $C_{25}H_{25}N_4O_8$   $[M+H]^+$  509,5, observado 509,3.

40 **Síntesis de hidrocloreto de 5-amino-2-(3-(4-aminobutil)-2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolina-1,3-diona (10).** A una suspensión de 9 en etanol (5 ml) se añadió níquel Raney (WR. Grace y Co. Raney® 4200, en suspensión, en  $H_2O$ ) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 12 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón, se filtró usando MeOH y se concentró. La purificación por HPLC preparativa y posterior evaporación a partir de una solución de HCl 1 M proporcionó 10 (0,0063 mg, 15 %).  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8,22 (s, 2H), 7,31 (dd,  $J = 8,2, 2,1$  Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 6,74 (dd,  $J = 8,2, 2,1$  Hz, 1H), 2,78 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 2,65 - 2,40 (par obsc m, 2H), 2,40 - 2,25 (m, 1H), 2,17 - 1,89 (m, 2H), 1,60 - 1,41 (m, 2H), 1,24 (d,  $J = 44,1$  Hz, 3H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $C_{17}H_{21}N_4O_4$   $[M-Cl]^+$  345,4, observado 345,6.

45

**Síntesis de 11 (reactivo de afinidad a base de CMPD 31)).** Aproximadamente 5 ml de una suspensión de affigel-10 (15  $\mu\text{mol/ml}$  de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a un volumen sedimentado de 2,3 ml. El isopropanol se eliminó y el affigel-10 se lavó con DMSO (3 veces). Una solución de DMSO (5 ml) de **10** (0,0044 g, 0,0115 mmol) y trietilamina (0,016 ml, 0,115 mmol) se añadió posteriormente y la mezcla resultante se cerró herméticamente y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 16 h, el tubo cónico se centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de **10** mediante LC-MS. **10** no se observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,032 ml, 0,23 mmol) y etanolamina (0,014 ml, 0,23 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 16 h, se centrifugó SS-0008803, se retiró el disolvente, y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en isopropanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Ejemplo 7 (Referencia)

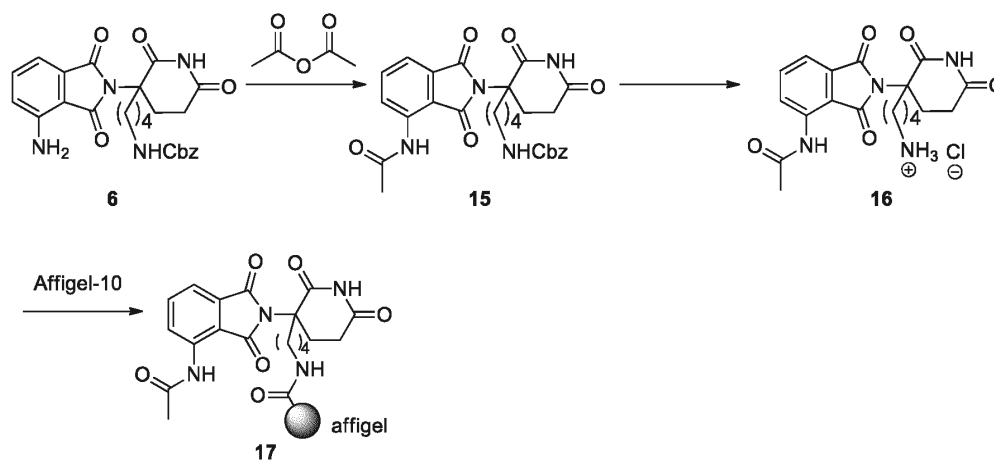


**Síntesis de (4-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (12).** A una suspensión de **4** (0,12 g, 0,324 mmol), anhídrido ftálico (0,060 g, 0,401 mmol) y acetato de sodio (0,037 g, 0,434 mmol) se añadió ácido acético (1,5 ml) y la mezcla resultante se agitó a  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de 7 h, la mezcla se inactivó con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró. La purificación por HPLC preparativa proporcionó **12**.  $R_f = 0,32$  (DCM:MeOH 95:5).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,05 - 7,64 (m, 5H), 7,44 - 7,27 (m, 4H), 5,16 - 5,00 (m, 2H), 4,90 (m, 1H), 3,34 - 3,09 (m, 3H), 2,92 - 2,77 (m, 1H), 2,77 - 2,45 (m, 3H), 2,36 - 2,18 (m, 1H), 2,17 - 1,99 (m, 1H), 1,38 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  464,5, observado 464,3.

**Síntesis de hidrocloreto de 2-(3-(4-aminobutil)-2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolina-1,3-diona (13).** una solución de **13** (0,024 g, 0,052 mmol) en HCl al 2 % en etanol (60 ml) se añadió paladio sobre carbón activado (0,005 g) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 2 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón y se filtró usando etanol y agua. La HPLC preparativa proporcionó **13** (0,018 g, 94 %).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8,38 (s, 2H), 7,92 - 7,64 (m, 4H), 3,10 - 2,87 (m, 2H), 2,85 - 2,46 (m, 4H), 2,40 - 2,07 (m, 2H), 1,68 (dt,  $J = 15,2, 7,7$  Hz, 2H), 1,57 - 1,26 (m, 2H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4$   $[\text{M}-\text{Cl}]^+$  330,4, observado 330,6.

**Síntesis de 14 (reactivo de afinidad a base de talidomida).** Aproximadamente 8 ml de una suspensión de affigel-10 (15  $\mu\text{mol/ml}$  de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugó a un volumen sedimentado de 4,2 ml (3 equiv). El isopropanol se retiró y el affigel-10 se lavó con DMSO (3x5 ml). Posteriormente, se añadió una solución de DMSO (9,0 ml) de **13** (0,0078 g, 0,021 mmol) y trietilamina (0,0293 ml, 0,21 mmol) y la mezcla resultante se selló y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 14 h, el tubo cónico se centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de **14** mediante LC-MS. **14** no se observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,058 ml, 0,42 mmol) y etanolamina (0,025 ml, 0,42 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 9 h, se centrifugó SS-0008820, se retiró el disolvente, y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en isopropanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Ejemplo 8 (Referencia)

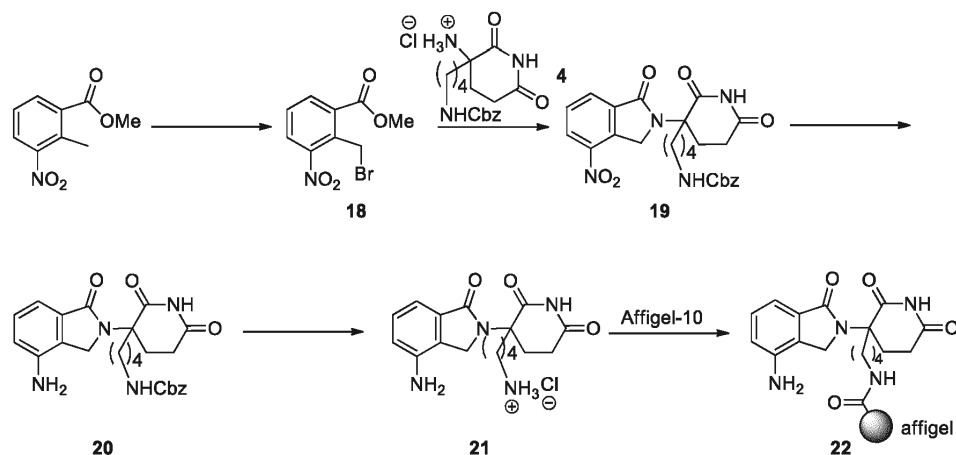


5 **Síntesis de (4-(3-(4-acetamido-1,3-dioxisoindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (15).**  
 A una solución de anhídrido acético (0,098 ml, 1,04 mmol) en piridina (1 ml) se añadió **6** (0,05 g, 0,104 mmol) y la  
 mezcla se agitó a 70 °C. Después de 12 h, la mezcla se inactivó con HCl acuoso al 1 % y se extrajo con DCM. La  
 capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. La cromatografía en capa fina preparatoria (EtOAc:hexanos  
 1:1) proporcionó **15** (0,02 g, 37 %) en forma de un producto impuro que se usó en la reacción posterior. R<sub>f</sub> = 0,16  
 10 (EtOAc:hexanos:1:1).

**Síntesis de hidrocloreto de N-(2-(3-(4-aminobutil)-2,6-dioxopiperidin-3-il)-1,3-dioxisoindolin-4-il)acetamida  
 (16).** A una solución de **15** (0,02 g, 0,038 mmol) en HCl al 2 % en etanol (2,0 ml) se añadió paladio sobre carbón  
 15 activado (0,004 g) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón  
 de hidrógeno. Después de 2 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón y se filtró y se concentró. La HPLC  
 preparativa proporcionó **16** (0,002 g, 12 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 8,37 (s, 2H), 8,16 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,76 (dd,  
 J = 12,9, 5,5 Hz, 1H), 7,60 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 2,95 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,73 (m, 3H), 2,61 - 2,47 (m, 1H), 2,41 - 2,10  
 (m, 4H), 1,80 - 1,59 (m, 2H), 1,43 (d, J = 39,6 Hz, 3H). MS (ESI) m/z calc. para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 387,4, observado  
 387,7.

20 **Síntesis de 17 (reactivo de afinidad acilado).** Aproximadamente 2 ml de una suspensión de affigel-10 (15 μmol/ml  
 de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugó a un volumen  
 sedimentado de 0,95 ml (3 equiv). El isopropanol se retiró y el affigel-10 se lavó con DMSO (3x5 ml). Posteriormente,  
 se añadió una solución de DMSO (2,0 ml) de **16** (0,002 g, 0,00473 mmol) y trietilamina (0,007 ml, 0,0473 mmol) y la  
 25 mezcla resultante se selló y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 20 h, el tubo cónico se  
 centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de **16** mediante LC-MS. **16** no se  
 observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,013 ml, 0,0946 mmol) y etanolamina (0,006 ml,  
 0,0946 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 12 h, se centrifugó  
 30 SS-0008821, se retiró el disolvente, y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en  
 isopropanol a -20 °C.

## Ejemplo 9 (Referencia)



5 **Síntesis de 2-(bromometil)-3-nitrobenzoato de metilo (18).** A una solución de 2-metil-3-nitrobenzoato de metilo (5 g, 25,6 mmol) en DCM seco (20 ml) se añadieron NBS (4,56 g, 25,6 mmol) y AIBN (0,421 g, 2,56 mmol) y la mezcla se agitó a 60 °C. Después de 20 h, se añadió AIBN adicional (0,42 g) y la mezcla continuó agitándose a 60 °C. Después de 72 h, la mezcla se filtró y se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (100 % hexanos a 10 % EtOAc/hexanos) proporcionó **18** (5,2 g, 74 %) en forma de un sólido de color amarillo claro.  $R_f = 0,3$  (hexanos:acetato de etilo 9:1). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,11 (dd,  $J = 7,9, 1,4$  Hz, 1H), 8,03 - 7,91 (m, 1H), 7,54 (dd,  $J = 8,0$  Hz, 8,0 Hz, 1H), 5,24 - 5,03 (s, 2H), 4,08 - 3,88 (s, 3H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrNO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  275,1, observado 275,5.

15 **Síntesis de (4-(3-(4-nitro-1-oxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (19).** A una mezcla agitada de **18** (0,25 g, 0,912 mmol) y **4** (0,337 g, 0,912 mmol) en DMF (3,0 ml) se añadió trietilamina (0,320 ml, 2,28 mmol) y la mezcla resultante se agitó a entre 114 °C y 130 °C. DO. Después de 18 h, la mezcla se enfrió y se concentró. La purificación por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 95:5) proporcionó **19** (0,27 g, 60 %) en forma de un sólido esponjoso de color marrón claro. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  10,99 (s, 1H), 8,45 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 8,08 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 7,94 (s, 1H), 7,80 (dd,  $J = 7,8$  Hz, 7,8 Hz, 1H), 7,44 - 7,19 (m, 5H), 5,17 - 4,84 (m, 4H), 3,05-2,96 (m, 2H), 2,69 - 2,52 (m, 3H), 2,20 - 1,94 (m, 3H), 1,35 (m, 4H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  495,5, observado 495,9.

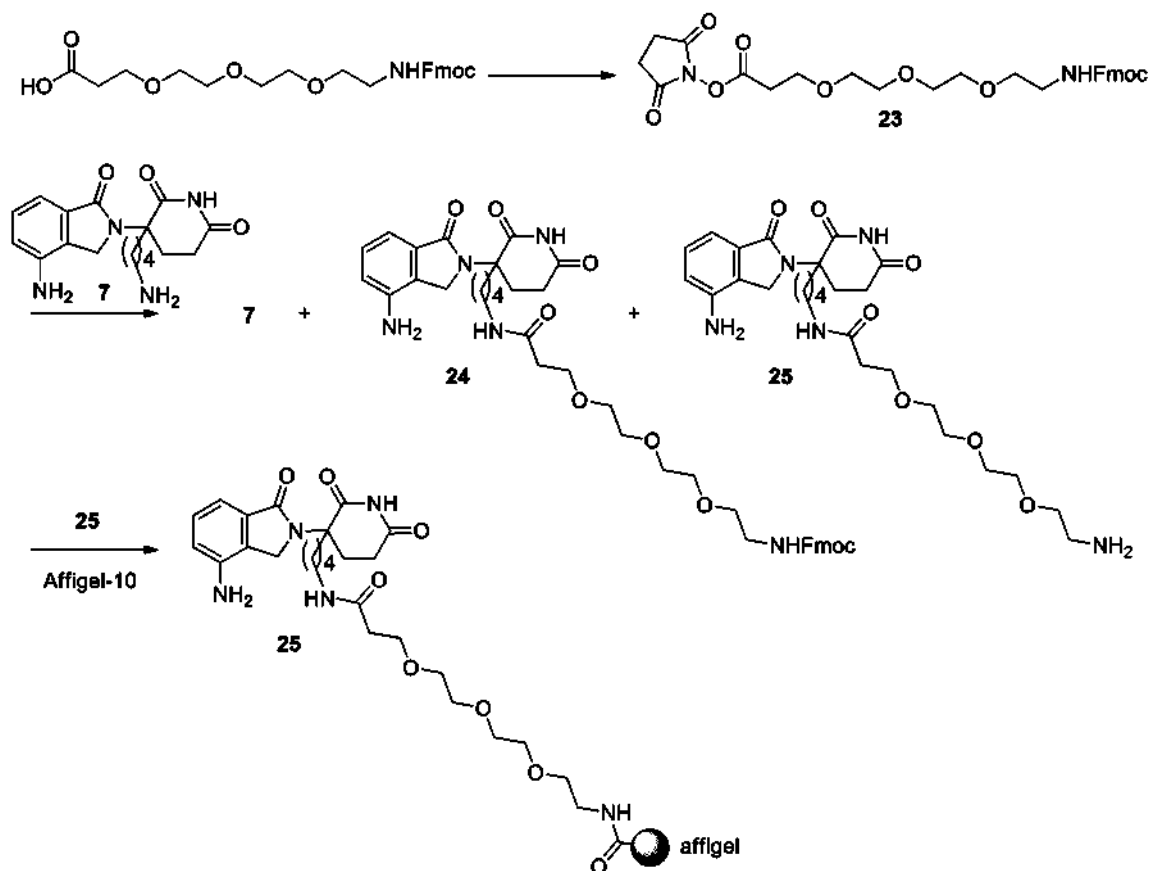
20 **Síntesis de (4-(3-(4-amino-1-oxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)carbamato de bencilo (20).** A una solución de **19** (0,26 g, 0,526 mmol) en EtOH: DMF (2:1, 6 ml) se añadió níquel Raney (WR Grace y Co. Raney® 4200, en suspensión, en  $\text{H}_2\text{O}$ ) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 16 h, la mezcla se filtró para proporcionar una mezcla de **20** y **21**, según se juzgó por LC-MS. La mezcla se usó en una reacción posterior sin purificación adicional.

30 **Síntesis de hidrocloreto de 3-(4-amino-1-oxoisindolin-2-il)-3-(4-aminobutil)piperidina-2,6-diona (21).** A una solución de **20** impuro (0,1 g, 0,215 mmol) en EtOH/DMF (2:1, 3,5 ml) se añadió paladio sobre carbón activado (20 % en peso) bajo una atmósfera de argón. La mezcla se saturó posteriormente con hidrógeno usando un balón de hidrógeno. Después de 5 h, la mezcla se lavó abundantemente con argón y se filtró y se concentró. La HPLC preparatoria proporcionó **21** (0,012 mg, 16 %). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8,43 (s, 1H), 7,14 (dd,  $J = 7,6$  Hz, 7,5 Hz, 1H), 6,87 - 6,65 (m, 2H), 5,56 (s, 2H), 4,35 ((ABC,  $J_{AB} = 17,6$  Hz,  $\Delta\nu_{AB} = 15,4$  Hz, 2H), 2,82-2,71 (m, 2H), 2,67-2,56 (m, 2H), 2,56 - 2,40 (m, 2H), 2,09-1,93 (m, 2H), 1,64-1,53 (m, 2H), 1,52-1,28 (m, 2H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  331,4, observado 331,7.

40 **Síntesis de 22 (reactivo de afinidad a base de lenalidomida).** Aproximadamente 9 ml de una suspensión de affigel-10 (15  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugó a un volumen sedimentado de 6,65 ml (3 equiv). El isopropanol se retiró y el affigel-10 se lavó con DMSO (3x5 ml). Posteriormente, se añadió una solución de DMSO (10,0 ml) de **21** (0,011 g, 0,033 mmol) y trietilamina (0,047 ml, 0,333 mmol) y la mezcla resultante se selló y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 20 h, el tubo cónico se centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de **21** mediante LC-MS. **21** no se observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,093 ml, 0,666 mmol) y etanolamina (0,040 ml, 0,666 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 16 h, se centrifugó SS-0017471, se retiró el disolvente, y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en isopropanol a -20°C.



## Ejemplo 10 (Referencia)



- 5 **Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10,13-tetraoxa-4-azahexadecan-16-oato (23).** A una solución de ácido Fmoc-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (0,2 g, 0,451 mmol) en THF seco (11 ml) se añadieron *N*-hidroxisuccinimida (0,060 g, 0,519 mmol) y *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (0,107 g, 0,5191f mmol) bajo argón a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó luego a lcanzar la temperatura ambiente. Después de 20 h, la mezcla se concentró y se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 95:5) para proporcionar **23** (0,116 g, 48 %) con algunas impurezas. **23** no se purificó más y se usó en la etapa de reacción posterior.  $R_f = 0,47$  (DCM:MeOH 95:5).

10 **Síntesis de N-(4-(3-(4-amino-1,3-dioxoisindolin-2-il)-2,6-dioxopiperidin-3-il)butil)-3-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)propanamida (25).** A una solución de **23** (0,012 g, 0,022 mmol) en DMSO (2 ml) se añadieron **7** (0,011 g, 0,0289 mmol) y trietilamina (0,01 ml, 0,071 mmol) bajo una atmósfera de argón, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 16 h, la mezcla bruta se purificó directamente por HPLC preparativa para proporcionar **25** (0,005 g, 42 %), **24** (0,0014 g, 8,2 %) y **7** sin reaccionar (0,0037 g, 48 %). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8,39 (s, 2H), 7,86 (s, 1H), 7,49 - 7,37 (m, 1H), 7,04 - 6,82 (m, 2H), 6,53 (s, 2H), 3,59 - 3,36 (m, 11H), 3,03-2,93 (m, 2H), 2,84-2,76 (m, 2H), 2,33-2,16 (m, 5H), 2,05-1,96 (m, 2H), 1,44-1,31 (m, 3H), 1,25-1,16 (m, 3H). MS (ESI)  $m/z$  calc. para  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  548,6, observado 548,5.

20 **Síntesis de 26 (Carga del compuesto sobre affigel).** Aproximadamente 1 ml de una suspensión de affigel-10 (15  $\mu\text{mol/ml}$  de gel, suspensión al 50 %) en isopropanol se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a un volumen sedimentado de 0,73 ml (3 equiv). El isopropanol se retiró y el affigel-10 se lavó con DMSO (3x5 ml). Posteriormente se añadió una solución de DMSO (10,0 ml) de **25** (0,002 g, 0,0036523 mmol) y trietilamina (0,005 ml, 0,037 mmol) y la mezcla resultante se selló y se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 16 h, el tubo cónico se centrifugó y el sobrenadante de DMSO se analizó para determinar la presencia de **25** mediante LC-MS. **25** no se observó y, por lo tanto, a la mezcla se añadieron trietilamina (0,0102 ml, 0,073 mmol) y etanolamina (0,004 ml, 0,073 mmol) y la mezcla resultante se volteó en un rotador a temperatura ambiente. Después de 20 h, se centrifugó SS-0017436, se retiró el disolvente, y la resina se lavó con DMSO (3x5 ml) e isopropanol (3x5 ml) y se almacenó en isopropanol a -20 °C.

30

**Ejemplo 11 (Referencia)****Ensayo de producción de IL-2 (véase las Figuras 1 y 8)**

5 Este protocolo describe la técnica para detectar la cantidad de IL-2 producida por Jurkat y PBMC en un formato de 96 pocillos. Este ensayo se usó para calcular los valores EC<sub>50</sub> de producción de IL-2 de lenalidomida, pomalidomida, todos los derivados y la inhibición con CMPD 31.

**Siembra de células y adición de compuestos**

10 Se re-suspendieron células Jurkat de crecimiento logarítmico de ATCC (clon E6-1) o PBMC humanas congeladas y descongeladas de Astarte (células mononucleares de sangre periférica, donador normal 41) a  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-1640 que contenía SFB al 10 % y solución antibiótica/antimicótica al 1 %. Las células se colocaron en placas en cada pocillo de una placa anti-CD3 de 96 pocillos (número de catálogo Becton Dickinson 354725) a  $1 \times 10^5$  células/100 µl por pocillo. Se añadieron controles a las columnas 1 y 12 en las que DMSO al 0,1 % en ocho pocillos replicados representaba el control de producción de IL-2 negativo o 0 % y anticuerpo anti-CD28 0,1 µg/ml (catálogo de Becton Dickinson n.º 555725) en ocho pocillos replicados representaba el control de producción de IL-2 positivo o 100 %.

20 Los compuestos se diluyeron en serie 3 veces en DMSO al 100 % en curvas duplicadas de dosis de 10 puntos usando un manipulador de líquidos Biomek FX en las columnas 2 a 11 de una placa de fondo en U de 96 pocillos. La concentración inicial de compuestos fue de 10 mM. Las placas hijas que contenían 2 µl de las curvas de dosis compuestas se marcaron y almacenaron a -80 °C.

25 Las placas hijas compuestas se re-suspendieron en 200 µl de medio RPMI-1640 como reserva 10X y luego 20 µl de la reserva 10X se añadió a cada placa de ensayo de anticuerpo anti-CD3 con un volumen final de 200 µl mediante la adición de 80µl de medio completo. Para los ensayos de inhibición de CMPD 31 IL-2, se preparó una reserva 10X (100 µM) de CMPD 31 en medio RPMI-1640 y se diluyó en cada pocillo de ensayo a todas las concentraciones de lenalidomida y pomalidomida a una concentración final de 10 µM. Las placas de ensayo se incubaron durante 18 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. La cantidad de IL-2 producida se determinó mediante un ensayo ELISA y se realizó de una de las dos maneras según las instrucciones del fabricante; mediante un método de protocolo convencional de ELISA (Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzimas) (Becton Dickinson) o un protocolo AlphaLISA (Perkin Elmer).

**Detección de IL-2**

35 Brevemente, para el ELISA convencional, se añadieron 100 µl de sobrenadante de la placa de ensayo tratada con compuesto a cada placa de ELISA de detección de IL-2 con 50 µl de diluyente y la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Cada placa se lavó cinco veces con 100 µl de tampón de lavado sacudiendo la placa y dándole golpes suaves para secarla. Se añadieron 100 µl de solución de detector de trabajo preparada a cada pocillo. La placa de ELISA se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de siete lavados, como anteriormente, y luego seguido de la adición de 100 µl de reactivo de sustrato de una etapa de TMB a cada pocillo. La placa de ELISA se incubó después durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añadieron 50 µl de solución de parada a cada pocillo. La detección colorimétrica se realizó a 450 nm a los 10 minutos de añadir la solución de parada en un lector de placas Victor<sup>3</sup>.

45 Brevemente, para el protocolo AlphaLISA, se añadieron 5 µl de sobrenadante de la placa de ensayo tratada con compuesto a una placa de detección de media área de 96 pocillos y posteriormente se añadieron 20 µl de un MIX 2,5X a los pocillos. Se añadieron perlas aceptoras AlphaLISA anti-IL-2 a los pocillos a una concentración final de 10 µl/ml y se añadió anticuerpo anti-IL-2 biotinilado a una concentración final de 1 nM. La placa de detección se incubó durante 60 minutos a 23 °C y se añadieron 25 µl de perlas donadoras SA 2X a una concentración final de 40 µg/ml. La placa de detección se incubó durante 30 minutos a 23 °C en la oscuridad. La detección se llevó a cabo usando el lector de placas Biotek Syn4-alpha con excitación a 680 nm y emisión a 570 nm.

55 Los datos se normalizaron a controles dentro de la placa; Se usó DMSO al 0,1 % para representar 0 % de producción de IL-2 y 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD28 para representar 100% de producción de IL-2. El análisis de la curva de la dosis para los valores de EC<sub>50</sub> se realizó usando una regresión no lineal básica con una respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) en el software ActivityBase version 7.0 (IDBS) o el software GraphPad Prism 5.

**Ejemplo 12 (Referencia)****Ensayos de inhibición del crecimiento (véase las Figuras 1 y 8)**

65 Este protocolo describe la técnica para realizar ensayos de inhibición del crecimiento en un formato de 96 pocillos. Este ensayo se usó para calcular los valores IC<sub>50</sub> de inhibición del crecimiento de lenalidomida, pomalidomida, todos los derivados y la inhibición con CMPD31.

Cultivo de células y siembra de células

Las líneas celulares Jurkat, NCI-H929 y JeKo-1 se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron según los requisitos de los medios especificados por el proveedor. Las células se colocaron en placas de 96 pocillos a 3.750 células por pocillo (Jeko-1, HS-Sultan) o 5.000 células por pocillo (NCI-H929) en 90 µl de medio de crecimiento de ensayo (RPMI-1640, SFB al 10 %, pen-strep al 1 %). Las células en placas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una hora y luego se transfirieron a una incubadora ajustada a 37 °C y de aire humidificado con 5 % de CO<sub>2</sub> durante una noche.

Creación de placas compuestas

Los compuestos se diluyeron en serie 3 veces en DMSO al 100 % en curvas duplicadas de dosis de 10 puntos usando un manipulador de líquidos Biomek FX en las columnas 2 a 11 de una placa de fondo en U de 96 pocillos. Las concentraciones iniciales de los compuestos fueron de 10 mM. Las placas hijas que contenían 2 µl de las curvas de dosis compuestas se marcaron y almacenaron a -80 °C. Las placas de control se prepararon por marca de 2 µl de DMSO al 100 % en una columna y 12 filas A, B, E y F y 2 µl de doxorubicina 10 mM en las filas C, D, G y H. Se usaron DMSO y Doxorubicina como controles de siembra, 100 % y 0 % de crecimiento respectivamente.

Adición de compuestos, detección y análisis de ensayo

Las placas hija compuestas y de control se diluyeron 100 veces en 200 µl de medio de crecimiento de ensayo y luego finalmente se diluyeron 10 veces más en las placas de células de 96 pocillos; una dilución final de 1000 veces en DMSO al 0,1 % para todos los pocillos. Para los ensayos de inhibición del crecimiento CMPD 31, se preparó una reserva 10X (100 µM) de CMPD 31 en medio RPMI-1640 y se diluyó en cada pocillo de ensayo a todas las concentraciones de lenalidomida y pomalidomida a una concentración final de 10 µM. Las placas tratadas con el compuesto se incubaron durante 120 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y luego se añadieron 10 µl de titulación celular azul (Promega Corporation) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y luego se leyeron las placas en un lector de placas Perkin Elmer Victor<sup>3</sup> V con excitación a 560 nm y emisión a 590 nm. Los datos se normalizaron a controles dentro de la placa; Se usó DMSO al 0,1 % para representar el 100 % de crecimiento y se usó Doxorubicina 10 µM para representar un crecimiento del 0 %. El análisis de la curva de la dosis para los valores de EC<sub>50</sub> se realizó usando una regresión no lineal básica con una respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) en el software ActivityBase version 7.0 (IDBS).

**Ejemplo 13****Descubrimiento de la diana mediante cromatografía por afinidad de molécula pequeña convencional (véase las Figuras 2-5 y 7)**

Los lisados celulares se prepararon a partir de 2x10<sup>8</sup> de células Jeko-1, Jurkat, o HS-Sultan o 5x10<sup>7</sup> de células HeLa S3 por muestra pulldown por lisis en 2 ml de tampón B (HEPES 50 mM pH 7,5, glicerol al 5 %, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 25 mM, Nonidet P-40 al 0,4 %, DTT 1 mM, y 1 comprimido completo de inhibidor de miniproteasa sin EDTA por 10-25 ml de Tampón B). Los lisados se incubaron en hielo durante 30 minutos, seguido de 2x congelación-descongelación usando N<sub>2</sub> líquido y un baño de agua de 37 °C en tubos de polipropileno. Las muestras se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 55.000 rpm durante 1 hora a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se aclararon previamente con 10 µl de reactivo affigel de control (affigeletanolamina o enlazador affigel-PEG) por incubación en un rotador durante 30 min a 4 °C. Los lisados previamente clarificados se transfirieron a columnas Mobicol de 1 ml con frita de tamaño de poro de 90 µm sobre hielo y se centrifugaron a 0,1 rcf durante 10 s para separar las perlas de affigel de los lisados. Se realizaron incubaciones con lisados previamente clarificados y exceso de pomalidomida a una concentración de competidor de exceso de 20 veces (concentración final de 500 µM) en un rotador durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 10 µl de reactivos de affigel a base de pomalidomida o control a cada muestra y se realizaron los pulldowns durante 1 h a 4 °C. Los lisados y reactivos affigel se transfirieron a columnas Mobicol de 1 ml con frita de tamaño de poro de 90 µl y las perlas de affigel se lavaron 3x con 800 µl de Tampón B y 2x con 800 µl de Tampón A (Tampón B sin incluir Nonidet P-40 al 0,4 %). Las columnas se centrifugaron durante 30 segundos a 0,1 rcf para eliminar cualquier tampón de lavado restante y luego se cerraron con un tapón inferior. Las columnas se colocaron en tubos Eppendorf de baja unión de 1,5 ml y se calentaron a 50 °C durante 30 minutos en 40 µl de tampón de muestra SDS 2x con DTT 10 mM para eluir las proteínas unidas de los reactivos affigel. A continuación se abrieron las columnas y se recogieron eluyentes en los tubos Eppendorf de baja unión por centrifugación a 15 s a 1600 rpm. Las muestras se aplicaron y resolvieron en geles de SDS-PAGE al 4-12 % seguido de tinción de plata (SilverQuest Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las bandas competidas por un competidor actimido en exceso pero no por DMSO se extirparon e identificaron mediante análisis de LC/MS/MS en el Centro de espectrometría de masas Beth Israel Deaconess Medical Center (Boston, MA).

**Ejemplo 14****Unión de Affigel a PRPK y TPRKB sobreexpresados (véase las Figuras 3-5)**

5 Las proteínas PRPK marcadas con Myc-DDK C-term y las TPRKB con marcadas con Myc-DDK C-term se sobreexpresaron transitoriamente a partir de ADNc (obtenidos de Origene, Rockville, MD) en células HEK-293FT usando reactivo de transfección FuGENE-6 según el protocolo del fabricante (Roche, Indianapolis, IN). Un día antes de la transfección,  $2,5 \times 10^6$  células HEK-293FT se colocaron en placas por cada 100 placas. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección en 1-2 ml de Tampón B por cada 100 placas por muestra. Los pulldowns se  
10 realizaron como se describió anteriormente para la cromatografía por afinidad de molécula pequeña convencional con reactivos de afinidad activos (a base de pomalidomida) o inactivos (a base de CMPD 31, a base de talidomida o acilados). La cantidad de PRPK y TPRKB capturada por cada reactivo de afinidad se determinó mediante tinción con plata y transferencia Western anti-DDK (anticuerpo monoclonal anti-DDK, Origene). Los experimentos de competición también se realizaron usando diversos compuestos y derivados (pomalidomida, lenalidomida,  
15 talidomida, CMPD 31, CMPD 30, CMPD 29).

**Ejemplo 15 (Referencia)****Sobreexpresión de PRPK y TPRKB en células Jurkat (véase la Figura 6)**

20 Las proteínas PRPK marcadas con Myc-DDK C-term y las TPRKB con marcadas con Myc-DDK C-term se sobreexpresaron transitoriamente en células Jurkat usando reactivo de transfección FuGENE-6 (Roche). Los ADNc de PRPK y TPRKB se usaron para transfectar 5 millones de células Jurkat con cada ADNc solo o en combinación (coexpresión de PRPK + TPRKB). Los niveles de expresión se analizaron 48 h después de la transfección seguido de la lisis en 200  $\mu$ l de Tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 %, deoxicolato de sodio al 0,5 %, SDS al 0,1%, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM más 1 inhibidor completo de miniproteasa y 1 comprimido inhibidor de la fosfatasa PhosSTOP por 10 ml de Tampón RIPA). Los niveles de proteína se evaluaron usando el  
25 Ensayo de proteína DC (Bio-Rad, Hercules, CA), y se resolvieron 30  $\mu$ g de lisado en un gel SDS-PAGE al 4-12 % antes de Western blot con anticuerpo anti-Myc Tag (7 ID 10, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) o control de carga anti-vinculina (hVIN-1, Sigma, St. Louis, MO).  
30

**Ejemplo 16 (Referencia)****Cromatografía por Afinidad Cuantitativa Basada en SILAC (véase la Figura 7)**

35 Se marcaron las células y se realizaron experimentos de acuerdo con protocolos previamente publicados (Ong S y Mann M, 2006, Nature Protocols; Ong S y col., 2009, PNAS). Brevemente, las células Jeko-1 se marcaron con un aminoácido "ligero" (L-Lisina, Sigma, St. Louis, MO) o "pesado" (L-Lisina- $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ , Cambridge Isotope, Andover, MA) en medio SILAC RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) complementado con L-Arginina (Sigma, St. Louis, MO), SFB al 10 % dializado (Invitrogen, Carlsbad, CA) y penicilina-estreptomina al 1 % (Invitrogen). Las células Jeko-1 de 80-90 % de confluencia de un matraz T225 se centrifugaron y se lavaron 2 veces con PBS y se sembraron 1:10 en medios SILAC ligeros o pesados. Las células se subcultivaron al menos dos veces y se dejaron crecer en medio SILAC durante al menos cinco duplicaciones celulares. Las células se sembraron en bolsas de cultivo celular de 1 l (Lampire, Pipersville, PA) en la etapa de expansión final para obtener cantidades suficientes de  
45 células para experimentos de pulldown. Para la cromatografía por afinidad, los lisados celulares de prepararon a partir de  $1 \times 10^9$  de células Jeko-1 ligeras o pesadas por muestra pulldown por lisis en 4 ml de Tampón B. Se realizaron pulldowns como se indicó anteriormente para la cromatografía por afinidad de molécula pequeña convencional con las siguientes modificaciones: los lisados se aclararon previamente con 25  $\mu$ l de enlazador affigel-PEG de control por muestra durante 45 min. La competencia se realizó con un exceso de 16 veces de pomalidomida o se añadió CMPD 31 al lisado ligero y se añadió DMSO al lisado pesado. Los pulldowns se realizaron con 25  $\mu$ l de reactivo affigel a base de pomalidomida. Después de los pulldowns, las muestras ligeras y pesadas se lavaron por separado 1x con 800  $\mu$ l de Tampón B, luego se combinaron muestras ligeras y pesadas y se añadieron a columnas Mobicol y se lavaron 3x con 800  $\mu$ l de Tampón B y 3x con 800  $\mu$ l de Tampón A. Las muestras se eluyeron en 30  $\mu$ l de tampón muestra SDS 4x con DTT 10 mM. La espectrometría de masas SILAC y el análisis de datos fueron  
50 realizados por el Dr. Steve Gygi y miembros del Centro de Espectrometría de Masas Taplin (Harvard Medical School, Boston, MA).  
55

**Ejemplo 17 (Referencia)****Ensayo de células asesinas naturales (véase la Figura 9)**

60 **Tratamiento de PBMCs con fármacos inmunomoduladores.** El día del tratamiento inicial, las células mononucleares de sangre periférica criopreservadas de un donante sano (PBMC; starte Biologies) se descongelaron en RPMI-1640 que contenía suero fetal bovino al 10 %, penicilina-estreptomina al 1% y tampón HEPES 25 mM (medio completo) en 37 °C. Las PBMC se centrifugaron dos veces a 1000 rpm para eliminar el DMSO residual y los  
65 residuos, y se contaron en un hemocitómetro. Las células se usaron a una densidad celular final de  $1 \times 10^6$  células

por ml en medio completo. Las PBMC se estimularon con anticuerpos anti-CD3 solubles (BD Pharmingen, clon UCHT1) a una concentración final de 1 µg/ml y se añadió a placas de fondo redondo de 96 pocillos con o sin lenolidomida o pomalidomida a diversas concentraciones durante 72 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> (concentración DMSO final ≤ 0,2 %). Las PBMC de control positivo se estimularon con IL-2 a una concentración final de 120 IU/ml (sistemas I + D) en ausencia de anticuerpo anti-CD3.

**Ensayo DELFIA para la evaluación de la actividad lítica de NK.** Después del tratamiento de 72 horas, se determinaron las células NK para determinar su actividad lítica usando el ensayo de citotoxicidad celular DELFIA de Perkin-Elmer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células K562 se cultivaron en medio completo. En la fase logarítmica, las células se lavaron una vez con PBS que contenía HEPES 20 mM. Las células K562 se re-suspendieron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 %, se contaron en un hemocitómetro y se diluyeron a 1x10<sup>6</sup> células por ml. Se añadió ligando BATDA (5 µl) a 5 ml de células K562 en un tubo cónico de 50 ml. Después de 10 minutos de incubación a 37 °C, las células se lavaron tres veces en PBS que contenía HEPES 20 mM y probenecida 2,5 mM para evitar la salida del ligando BATDA. Las células K562 se re-suspendieron en medio completo que contenía probenecida 2,5 mM y se diluyeron a una densidad final de 5x10<sup>4</sup> células por ml. Antes de mezclar las células efectoras de PBMC y las células diana K562, las placas que contenían las PBMC se centrifugaron y se re-suspendieron en un volumen final de 50 µl de medio completo nuevo. Las PBMC se transfirieron a una placa de fondo redondo de 96 pocillos por separado a la que se añadieron 50 µl de células K562 (2500 células por pocillo) (relación efector a diana de aproximadamente 8:1). La placa de ensayo se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm para potenciar la conjugación de NK-K562 y se dejó incubar a 37 °C. Después de 2 horas de incubación, se retiraron 20 µl del sobrenadante y se transfirieron a una placa de microtitulación Perkin-Elmer. Se añadió una solución de europio (200 µl) a los sobrenadantes y la placa se colocó en un lector de microplacas Wallac Victor. Después de un agitado orbital de 15 minutos a alta velocidad, se leyó la placa usando fluorescencia de resolución temporal (excitación a 340 nm, emisión a 615 nm, retraso de 400 µs; ventana de conteo de 400 µs, ciclo de 1000 µs). Los recuentos brutos se normalizaron como un porcentaje de control de DMSO no tratado (actividad basal de NK, 0 %) e IL-2 (actividad máxima de NK, 100 %). El análisis de la curva de la dosis para los valores de EC<sub>50</sub> se realizó usando una regresión no lineal básica con una respuesta de dosis sigmoidea (pendiente variable) en software GraphPad Prism 5.

### 30 Ejemplo 18 (Referencia)

#### Ensayo de sinapsis inmune

**Tinción y tratamiento de células** Las células Jurkat de crecimiento logarítmico de ATCC (clon E6-1) y las células RAMOS de ATCC se re-suspenden a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI-1640 que contiene solución antibiótica/antimicótica al 1 % sin suero. Además, se re-suspende una alícuota de células a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI-1640 que contiene SFB al 10 % y solución antibiótica/antimicótica al 1 % para usarse como control no teñido. Las células RAMOS se tiñen con el colorante DIO de Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit (Invitrogen) mediante la adición de 5 µl de colorante por ml de células. Las células Jurkat se tiñen con el colorante DIL del kit de etiquetado celular multicolor Vybrant® (Invitrogen). Las células se tiñen durante 10 minutos a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de la tinción, un volumen igual de medio RPMI-1640 que contiene SFB al 10 % y solución antibiótica/antimicótica al 1 % y las células se centrifugan durante 5 min a 1000 rpm. Las células se lavan una vez mediante aspiración y se re-suspende el sedimento a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. El medio se aspira y las células se resuspenden a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml y se usa una pequeña alícuota para volver a contar las células y centrifugarlas una vez más durante 5 min a 1000 rpm. El sedimento se re-suspende a 1 x 10<sup>6</sup> células/ml basándose en el nuevo recuento y se incuba a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> hasta su uso. A continuación 400 µl de cada tipo de célula se retira y se coloca en un tubo de microcentrífuga y se incuba a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> hasta fijación de usar como control teñido.

Para cada muestra, se añaden 400 µl de células RAMOS teñidas a un tubo de microcentrífuga. Las muestras se tratan con los compuestos de interés durante varias horas a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tratamiento, se añaden 400 µl de células Jurkat teñidas al tubo de microcentrífuga. y se centrifugan a 500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, 400 µl de sobrenadante se retiran del tubo de microcentrífuga y se incuban a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Inmediatamente después de la conjugación, las muestras se fijan durante 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 400 µl de solución de paraformaldehído al 4 % en PBS (Boston Bioproducts).

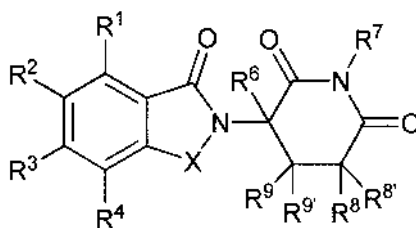
Para un control positivo, las células se tratan con 2 µg/ml de SEE durante 1 hora y luego se conjugan con células Jurkat durante 30 minutos. Para un control negativo, las células RAMOS se incuban solas durante 1 hora y luego se conjugan con células Jurkat durante 30 minutos. Los controles adicionales incluyen RAMOS no teñidas y células Jurkat y células RAMOS y Jurkat teñidas para la optimización del instrumento FACS.

**Análisis de FACS.** Este protocolo de adquisición de datos está optimizado para su uso con el citómetro de flujo BD FACS Calibur. El citómetro de flujo se debe compensar adecuadamente para la transferencia de fluorescencia en los detectores de PMT usando los tubos de control teñidos individualmente. DIO se detecta en el canal FL-1 y DIL se detecta en el canal FL-2. Se adquieren al menos 10.000 eventos para cada muestra en las que la velocidad de flujo no supera los 500 eventos por segundo.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente que modula la actividad de un complejo PRPK/TPRKB para su uso en el tratamiento de una enfermedad, una afección o un trastorno asociados a proliferación celular, producción de IL-2, producción de TNF- $\alpha$  o activación de asesinas naturales, que comprende:

- (i) proporcionar un complejo PRPK/TPRKB que comprende PRPK y TPRKB;  
 (ii) proporcionar un agente de prueba que tiene una estructura de Fórmula I;



(I)

10

en la que:

- X es -C(=O)- o -CH<sub>2</sub>-;  
 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub>, alcoxi C<sub>1-6</sub> o -N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, o dos grupos R<sup>5</sup> se toman junto con el nitrógeno al que están unidos para formar un heterociclo;  
 R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo, bencilo o alquilo C<sub>1-8</sub>;  
 R<sup>7</sup> es hidrógeno, bencilo o alquilo C<sub>1-8</sub>; y  
 R<sup>8</sup>, R<sup>8'</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>9'</sup> son independientemente hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-6</sub> o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

20

- (iii) poner en contacto el agente de prueba con el complejo PRPK/TPRKB; y  
 (iv) detectar una interacción entre el agente de prueba y al menos uno de PRPK y TPRKBp.

25 2. El método de la reivindicación 1, en el que el complejo PRPK/TPRKB es un complejo KEOPS que comprende PRPK, TPRKB, OSGEP y LAGE3 o sus homólogos.

30 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que está en un formato de unión competitiva en el que se marca uno de los agentes de prueba y se mide la cantidad de etiqueta libre frente a etiqueta unida para determinar el efecto sobre la unión.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que PRPK y TPRKB se capturan mediante reactivos de afinidad basados en lenalidomida, pomalidomida y talidomida.

Denominación	Estructura	IC <sub>50</sub> de inhibición del crecimiento de Jeko-1 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> de inhibición del crecimiento de NCI-H929 $\mu$ M	EC <sub>50</sub> de producción de IL-2 $\mu$ M
lenalidomida		0,2	0,2	0,06
pomalidomida		0,1	0,1	0,08
talidomida		Inactiva	Inactiva	Inactiva
CMPD 29		1,5	1,8	0,7
CMPD 30		Inactiva	Inactiva	Inactiva
CMPD 31		Inactiva	Inactiva	Inactiva

Figura 1

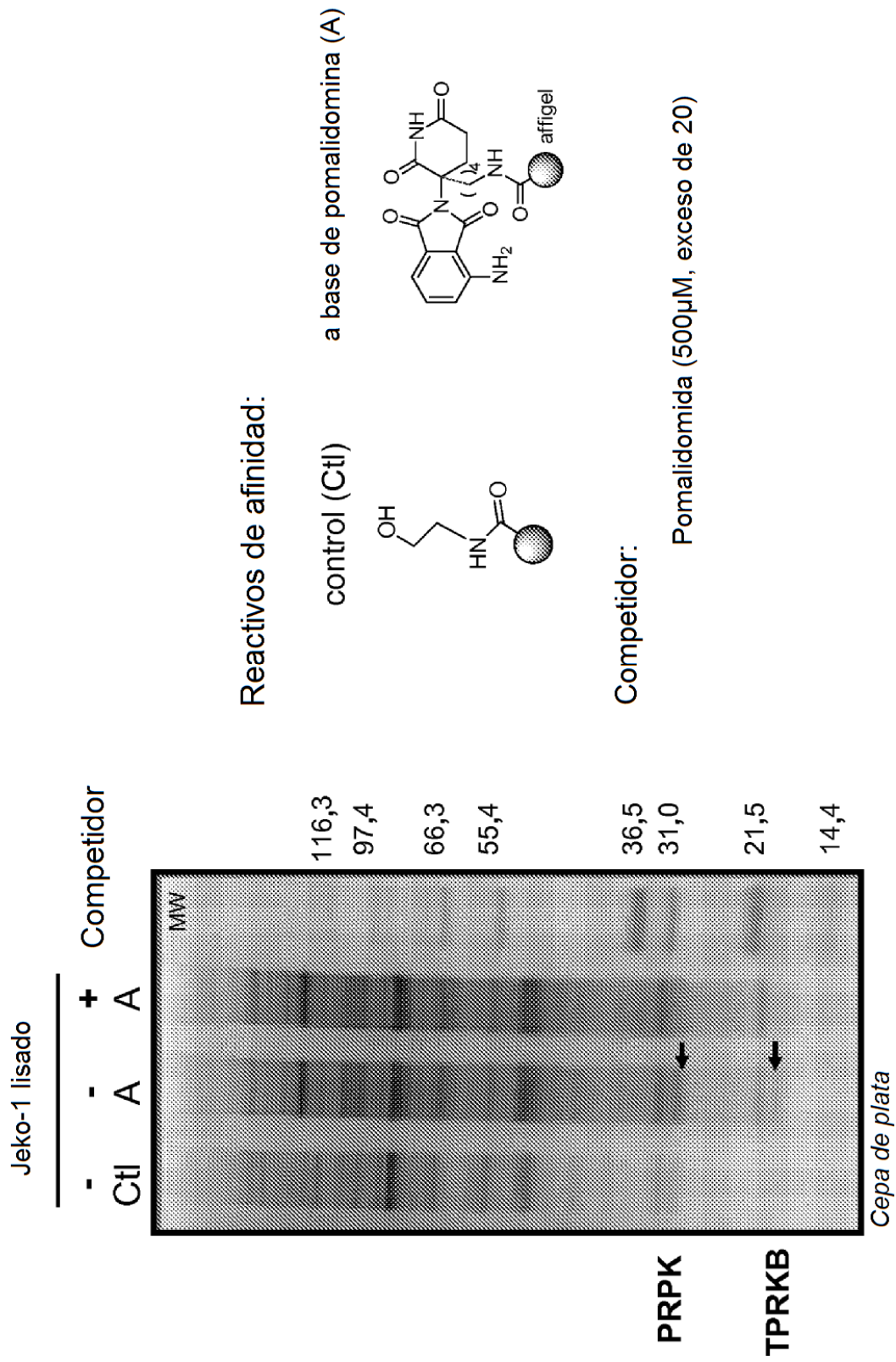


Figura 2





Sobreexpresión transitoria (o/e) en reactivos de afinidad a base de pomalidomida de HEK-293FT lisados

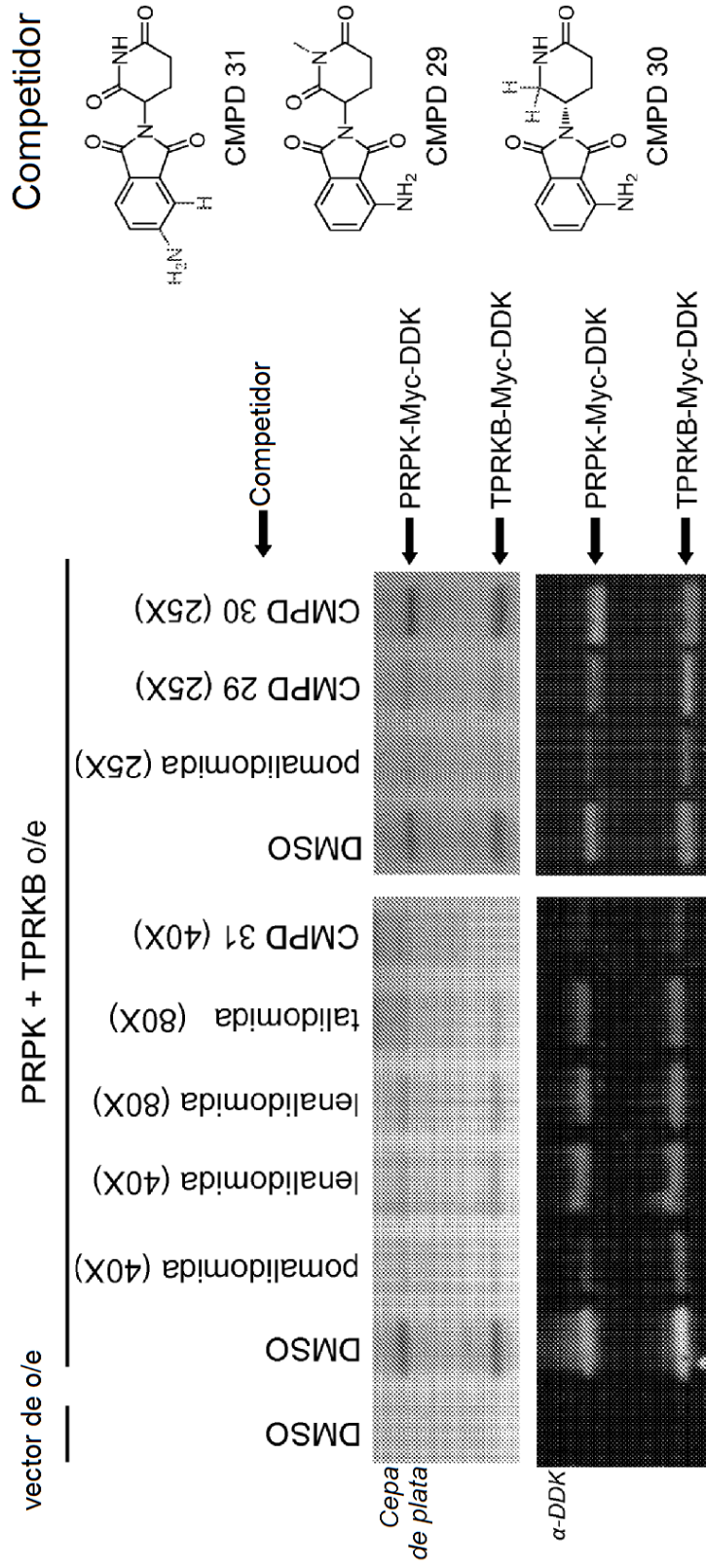


Figura 4

Sobreexpresión transitoria (o/e) en HEK-293FT lisados

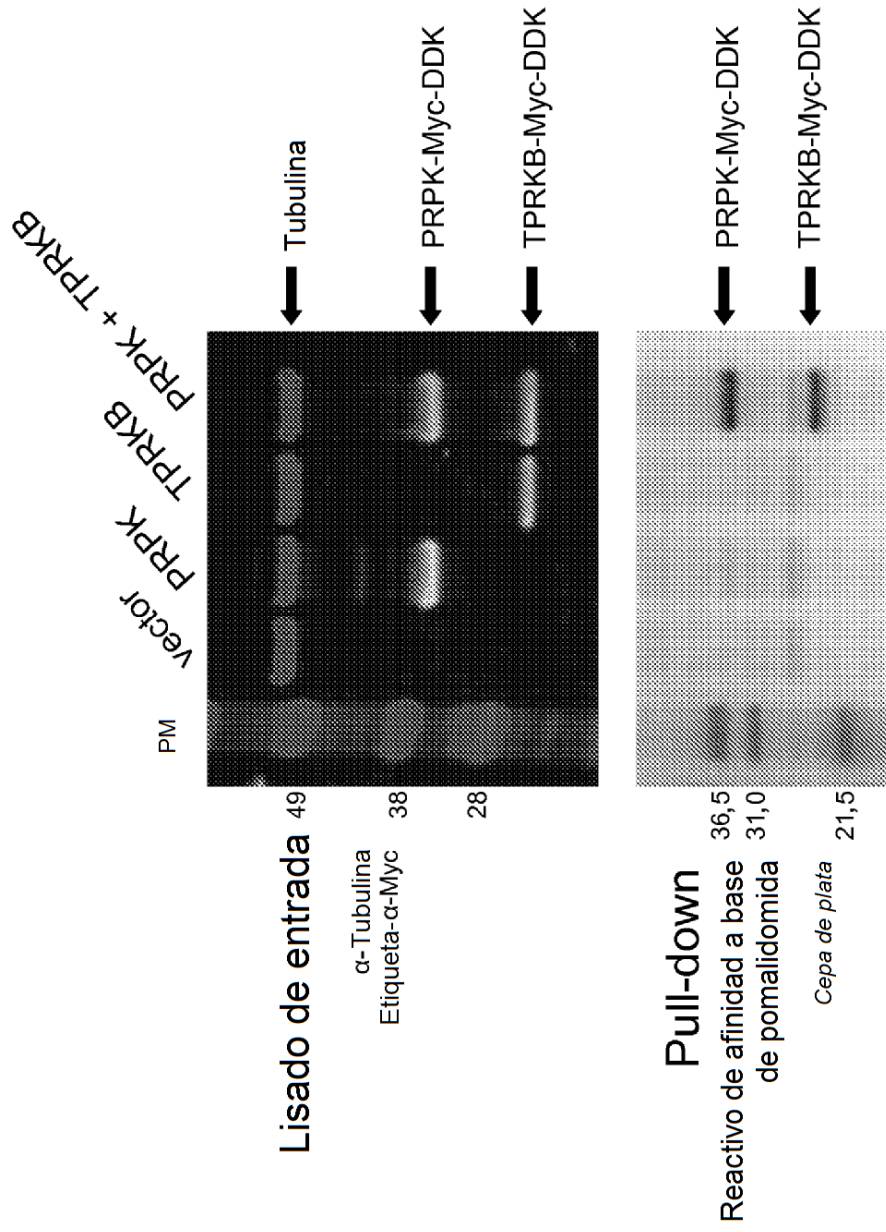


Figura 5

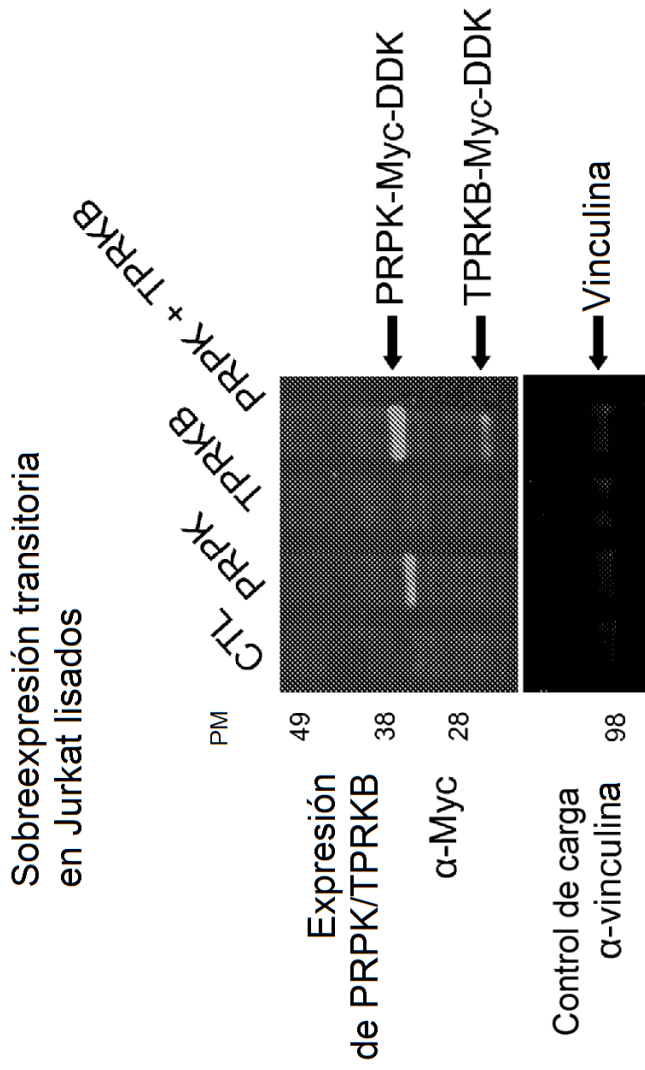


Figura 6

Cromatografía por afinidad cuantitativa

Jeko-1 lisados, reactivo de afinidad a base de pomalidomida, DMSO frente a competidor de pomalidomida

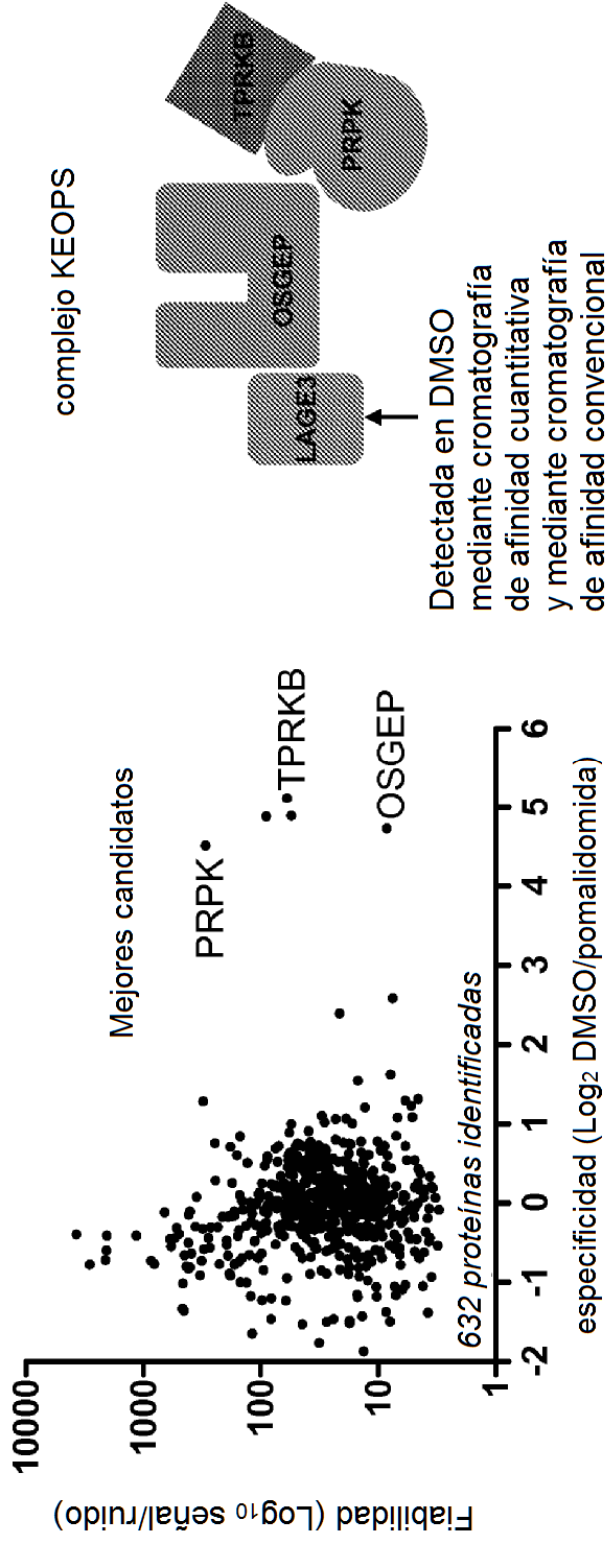
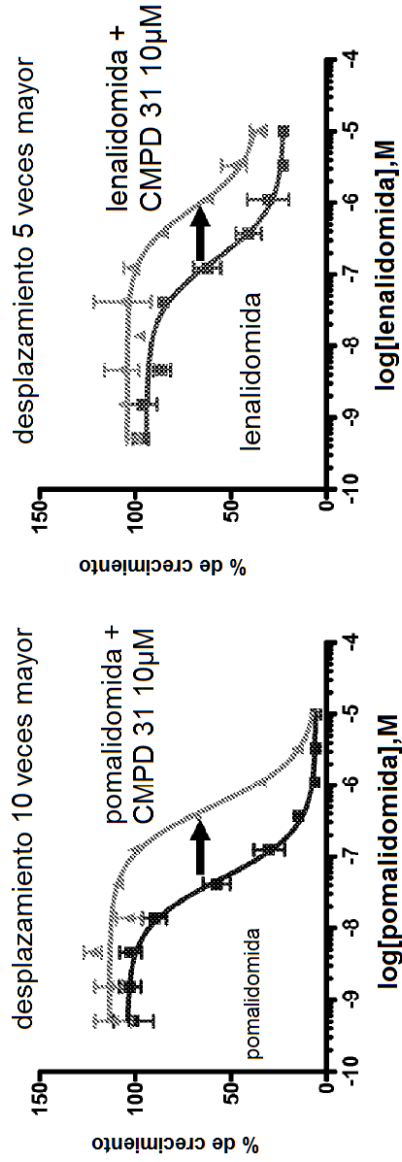
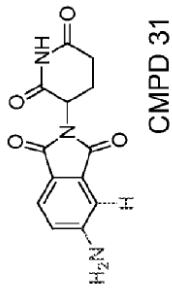


Figura 7

**Inhibición del crecimiento, NCI-H929 (resultados similares con Jeko-1)**



**Producción de IL-2, Jurkat**

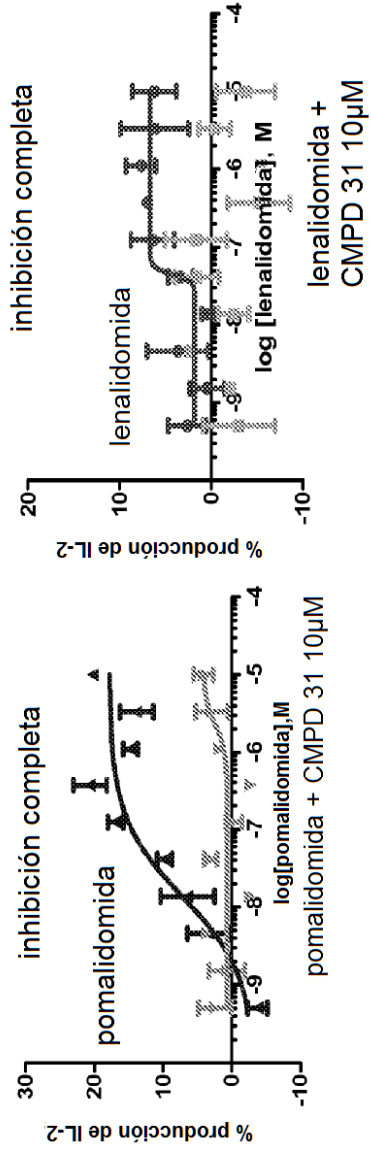
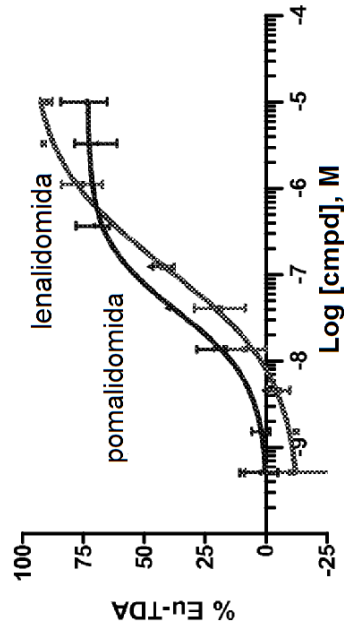


Figura 8

PBMC,  $\alpha$ CD3, 72h,  
E:T 80:1, co-cultivo de 2 h



Denominación	Estructura	EC <sub>50</sub> de lisis NK-K562 $\mu$ M	Unión PRPK/TPRKB <i>in vitro</i>
lenalidomida	<chem>Nc1ccc2c(c1)c3c(c2)C(=O)Nc4ccc(N)cc43</chem>	0,08 $\pm$ 0,13	sí
pomalidomida	<chem>Nc1ccc2c(c1)c3c(c2)C(=O)Nc4ccc(N)cc43</chem>	0,02 $\pm$ 0,01	sí

Figura 9