

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 810**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2013 PCT/US2013/048510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2013 E 13736723 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2867671**

54 Título: **Métodos para determinar la eficacia de fármacos usando proteínas asociadas a cereblon**

30 Prioridad:

29.06.2012 US 201261666703 P
04.09.2012 US 201261696752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2019

73 Titular/es:

CELGENE CORPORATION (100.0%)
86 Morris Avenue
Summit, NJ 07901, US

72 Inventor/es:

SCHAFFER, PETER, H.;
CHOPRA, RAJESH;
CORRAL, LAURA;
WANG, MARIA, YINGLIN;
JACKSON, PILGRIM y
LOPEZ-GIRONA, ANTONIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 699 810 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar la eficacia de fármacos usando proteínas asociadas a cereblon

2. Campo

- 5 La invención se refiere en general a métodos para determinar la eficacia de un compuesto inmunomodulador. También se proporcionan en la presente memoria métodos para usar la proteína con dedos de zinc 1 Ikaros (IKZF1, Ikros), una proteína asociada a cereblon como biomarcador para la sensibilidad clínica al cáncer y enfermedades inflamatorias, y la respuesta del paciente a fármacos. Se proporcionan además, kits para llevar a cabo los métodos.

3. Antecedentes

3.1 Patobiología del cáncer

- 10 El cáncer se caracteriza principalmente por un aumento del número de células anormales derivadas de un tejido normal dado, invasión de tejidos adyacentes por estas células anormales, o extensión linfática o por la sangre de células malignas a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis). Los datos clínicos y estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso de múltiples etapas que empieza con cambios preneoplásicos menores, que en determinadas condiciones pueden avanzar a neoplasia. La lesión neoplásica puede evolucionar de forma clonal y desarrollar una capacidad creciente de invasión, crecimiento, metástasis y heterogeneidad, en especial en condiciones en las que las células neoplásicas escapan de la vigilancia inmunitaria del hospedante. Roitt, I., Brostoff, J y Kale, D., *Immunology*, 17.1-17.12 (3ª ed., Mosby, St. Louis, Mo., 1993).

- 20 Hay una enorme variedad de cánceres que se describen en detalle en la bibliografía médica. Los ejemplos incluyen cánceres de pulmón, colon, recto, próstata, mama, cerebro, sangre e intestino. La incidencia del cáncer continúa aumentando a medida que la población general envejece, se desarrollan nuevos cánceres y crecen las poblaciones susceptibles (p. ej., personas infectadas por SIDA o expuestas en exceso a la luz solar). Sin embargo, las opciones para el tratamiento del cáncer son limitadas. Por ejemplo, en el caso de los cánceres de la sangre (p. ej., mieloma múltiple), están disponibles pocas opciones de tratamiento, en especial cuando falla la quimioterapia convencional y el trasplante de médula ósea no es una opción. Por lo tanto, existe una enorme demanda de nuevos métodos y composiciones que se puedan usar para tratar pacientes con cáncer.

- 30 Muchos tipos de cáncer están asociados con la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso conocido como angiogénesis. Se han elucidado varios de los mecanismos implicados en la angiogénesis inducida por tumores. El más directo de estos mecanismos es la secreción por las células tumorales de citoquinas con propiedades angiogénicas. Los ejemplos de estas citoquinas incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (a,b-FGF), angiogenina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y TNF- α . Alternativamente, las células tumorales pueden liberar péptidos angiogénicos a través de la producción de proteasas y la posterior rotura de la matriz extracelular donde se almacenan algunas citoquinas (p. ej., b-FGF). La angiogénesis también puede ser inducida indirectamente a través del reclutamiento de células inflamatorias (en particular macrófagos) y su posterior liberación de citoquinas angiogénicas (p. ej., TNF- α , b-FGF).

- 35 Linfoma se refiere a cánceres que se originan en el sistema linfático. El linfoma se caracteriza por neoplasmas malignos de linfocitos - linfocitos B y linfocitos T (es decir, células B y células T). El linfoma en general empieza en los ganglios linfáticos o colecciones de tejido linfático en órganos que incluyen, pero no se limitan al estómago o intestinos. El linfoma puede implicar a la médula ósea y la sangre en algunos casos. El linfoma se puede extender de un sitio a otras partes del cuerpo.

- 40 El tratamiento de diferentes formas de linfomas se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.468.363. Dichos linfomas incluyen, pero no se limitan a linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de células B, linfoma de células B activadas, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma del centro folicular, linfoma transformado, linfoma linfocítico de diferenciación intermedia, linfoma linfocítico intermedio (ILL), linfoma linfocítico difuso poco diferenciado (PDL), linfoma centrocítico, linfoma difuso de células de pequeñas hendidas (DSCL), linfomas periféricos de células T (PTCL), linfoma cutáneo de células T y linfoma de la zona del manto y linfoma folicular de bajo grado.

- 50 El linfoma no Hodgkin (NHL) es el quinto cáncer más común tanto para hombres como mujeres en Estados Unidos, con una estimación de 63.190 nuevos casos y 18.660 muertes en 2007. Jemal A, et al., *CA Cancer J Clin* 2007; 57(1):43-66. La probabilidad de desarrollar NHL aumenta con la edad y la incidencia de NHL en las personas mayores ha aumentado de forma constante en la última década, lo que ha generado preocupación con la tendencia al envejecimiento de la población de EEUU. *Ibidem* Clarke C A, et al., *Cancer* 2002; 94(7):2015-2023.

- 55 El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) da cuenta de aproximadamente un tercio de los linfomas no Hodgkin. Aunque algunos pacientes con DLBCL se curan con la quimioterapia tradicional, el resto mueren de la enfermedad. Los fármacos antineoplásicos causan una reducción rápida y persistente de los linfocitos, posiblemente por inducción de apoptosis directa en células T y B maduras. Véase, K. Stahnke. et al., *Blood* 2001, 98:3066-3073. Se ha mostrado que el recuento absoluto de linfocitos (RAL) es un factor de pronóstico en el linfoma folicular no

Hodgkin y resultados recientes han sugerido que el RAL en el diagnóstico es un factor de pronóstico importante en el linfoma difuso de células B grandes.

Los linfomas difusos de células B grandes (DLBCL) se pueden dividir en distintos subtipos moleculares de acuerdo con sus patrones de perfiles genéticos: DLBCL de células B similares a las del centro germinal (GCB-DLBCL), DLBCL similar a células B activadas (ABC-DLBCL), y linfoma primario mediastínico de células B (PMBL) o de tipo no clasificado. Estos subtipos se caracterizan por diferencias claras en la supervivencia, quimiosensibilidad, y dependencia de la ruta de señalización, en particular la ruta de NF- κ B. Véase, D. Kim et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (20 de Junio Suplemento), 2007: 8082. Véase, Bea S, et al., *Blood* 2005; 106: 3183-90; Ngo V.N. et al., *Nature* 2011; 470: 115-9. Dichas diferencias han impulsado la búsqueda de estrategias de tratamiento más eficaces y específicas de subtipo en el DLBCL.

Leucemia se refiere a neoplasmas malignos de tejidos que forman la sangre. Se describen diferentes formas de leucemias, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 7.393.862 y solicitud de patente provisional de EE.UU. n° 60/380.842, presentada el 17 de mayo de 2002. Aunque los virus supuestamente causan varias formas de leucemia en animales, las causas de la leucemia en seres humanos son en gran medida desconocidas. *The Merck Manual*, 944-952 (17ª ed. 1999). La transformación a neoplasia maligna se produce típicamente en una sola célula a través de dos o más etapas con posterior proliferación y expansión clonal. En algunas leucemias, se han identificado translocaciones cromosómicas específicas con consecuente morfología de células leucémicas y características clínicas especiales (p. ej., translocaciones de 9 y 22 en la leucemia mielocítica crónica, y de 15 y 17 en la leucemia promielocítica aguda). Las leucemias agudas son poblaciones de células predominantemente no diferenciadas y las leucemias crónicas formas de células más maduras.

Las leucemias agudas se dividen en tipo linfoblástico (ALL) y no linfoblástico (ANLL). *The Merck Manual*, 946-949 (17ª ed. 1999). Se pueden subdividir además por su aspecto morfológico y citoquímico de acuerdo con la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) o de acuerdo con su tipo y grado de diferenciación. El uso de anticuerpos monoclonales específicos para antígeno mielóide y células B y T, es más útil para la clasificación. La ALL es predominantemente una enfermedad de la infancia que se establece por resultados de laboratorio y examen de la médula ósea. La ANLL, conocida también como leucemia mielógena aguda o leucemia mielóide aguda (AML), ocurre en todas las edades y es la leucemia aguda más común entre adultos; es la forma asociada normalmente con radiación como agente causante.

Las leucemias crónicas se describen como que son linfocíticas (CLL) o mielocíticas (CML). *The Merck Manual*, 949-952 (17ª ed. 1999). La CLL se caracteriza por la aparición de linfocitos maduros en la sangre, médula ósea y órganos linfoides. El distintivo de la CLL es la linfocitosis absoluta sostenida ($> 5.000/\mu\text{l}$) y un aumento de linfocitos en la médula ósea. La mayoría de los pacientes de CLL también tienen expansión clonal de linfocitos con características de células B. La CLL es una enfermedad de la edad mediana o avanzada. En la CML, el rasgo característico es el predominio de células granulocíticas de todas las etapas de diferenciación en la sangre, médula ósea, hígado, bazo y otros órganos. En los pacientes sintomáticos en el diagnóstico, el recuento de glóbulos blancos totales (WBC) normalmente es aproximadamente $200.000/\mu\text{l}$, pero pueden alcanzar $1.000.000/\mu\text{l}$. La CML es relativamente fácil de diagnosticar debido a la presencia del cromosoma Filadelfia.

Es bien conocido que las células estromales de la médula ósea sostienen el avance de la enfermedad en la CLL y la resistencia a la quimioterapia. La alteración de las interacciones entre células de CLL y células estromales es un objetivo adicional de la quimioterapia de la CLL.

Además de la clasificación en agudos y crónicos, los neoplasmas también se clasifican, basándose en las células que dan lugar a dicho trastorno, en precursores o periféricos. Véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n° 2008/0051379. Los neoplasmas precursores incluyen ALL y linfomas linfoblásticos y ocurren en linfocitos antes de que se han diferenciado en células T o B. Los neoplasmas periféricos son aquellos que ocurren en linfocitos que se han diferenciado en células T o B. Dichos neoplasmas periféricos incluyen, pero no se limitan a CLL de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma extragranglionar de zona marginal de células B de tejido linfático asociado con la mucosa, linfoma de la zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma, linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt. En aproximadamente 95 por ciento de los casos de CLL, la expansión clonal es de un linaje de células B. Véase, *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (3ª edición) (1989) (pág. 1843-1847). En menos de 5 por ciento de los casos de CLL, las células tumorales tienen un fenotipo de célula T. A pesar de estas clasificaciones, no obstante, el deterioro patológico de la hematopoyesis normal es el distintivo de todas las leucemias.

El mieloma múltiple (MM) es un cáncer de células plasmáticas en la médula ósea. Normalmente, las células plasmáticas producen anticuerpos y tienen un papel importante en la función inmunitaria. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de estas células conduce a dolor óseo y fracturas, anemia, infecciones y otras complicaciones. El mieloma múltiple es la segunda neoplasia hematológica más común, aunque las causas exactas del mieloma múltiple siguen siendo desconocidas. El mieloma múltiple causa niveles altos de proteínas en la sangre, orina y órganos, incluyendo, pero no limitado a proteína M y otras inmunoglobulinas (anticuerpos), albúmina, y beta-2-microglobulina. La proteína M, abreviatura para proteína monoclonal, también conocida como paraproteína, es una

proteína particularmente anómala producida por las células plasmáticas del mieloma y se puede encontrar en la sangre o la orina de prácticamente todos los pacientes con mieloma múltiple.

5 Los síntomas óseos, que incluyen el dolor óseo, están entre los síntomas clínicamente más significativos del mieloma múltiple. Las células plasmáticas malignas liberan factores estimuladores de osteoclastos (incluyendo IL-1, IL-6 y TNF) que hacen que el calcio sea lixiviado de los huesos causando lesiones líticas; la hipercalcemia es otro síntoma. Los factores estimuladores de osteoclastos, denominados también citoquinas, pueden prevenir la apoptosis, o muerte de las células del mieloma. El cincuenta por ciento de los pacientes tienen lesiones óseas asociadas con el mieloma detectables por radiología en el diagnóstico. Otros síntomas clínicos comunes para el mieloma múltiple incluyen la polineuropatía, anemia, hiperviscosidad, infecciones e insuficiencia renal.

10 Es bien conocido que las células estromales de la médula ósea sostienen el avance de la enfermedad del mieloma múltiple y la resistencia a la quimioterapia. La alteración de las interacciones entre células del mieloma múltiple y células estromales es un objetivo adicional de la quimioterapia del mieloma múltiple.

15 Síndrome mielodisplásico (MDS) se refiere a un grupo diverso de trastornos de citoblastos hematopoyéticos. El MDS se caracteriza por una médula celular con morfología y maduración (dismielopoyesis) alteradas, citopenias de la sangre periférica y un riesgo variable de avance a leucemia aguda, que es resultado de una producción ineficaz de células sanguíneas. Véase, *The Merck Manual* 953 (17^a ed. 1999) y List et al., 1990, *J Clin. Oncol.* 8:1424. El tratamiento del MDS usando compuestos inmunomoduladores se describe en la publicación de patente de EE.UU. n° 2004/0220144.

20 Los tumores sólidos son masas anormales de tejido que pueden contener, pero normalmente no contienen quistes o zonas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cáncer) o malignos (cáncer). Los diferentes tipos de tumores sólidos se denominan por el tipo de células que los forman. Los ejemplos de tipos de tumores sólidos incluyen, pero no se limitan a melanoma maligno, carcinoma suprarrenal, carcinoma de mama, cáncer de células renales, carcinoma de páncreas, carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) y carcinoma de origen primario desconocido. Los fármacos comúnmente administrados a pacientes con diferentes tipos o fases de tumores sólidos incluyen, pero no se limitan a celebrex, etopósido, ciclofosfamida, docetaxel, apécitabina, IFN, tamoxifeno, IL-2, GM-CSF o una de sus combinaciones.

Aunque los pacientes que logran una remisión completa después de la terapia inicial tienen una buena posibilidad de cura, menos de 10% de los que no responden o recaen, logran una cura o una respuesta que dure más de 3 años. Véase, Cerny T, et al., *Ann Oncol* 2002; 13 Suppl 4:211-216.

30 Se sabe que rituximab reduce las células B hospedantes normales. Véase, M. Aklilu et al., *Annals of Oncology* 15:1109-1114, 2004. Los efectos inmunológicos a largo plazo de la reducción de células B con rituximab y las características del conjunto de células B que se reconstituyen en los pacientes con linfoma no están bien definidos, a pesar el amplio uso de esta terapia. Véase, Jennifer H. Anolik et al., *Clinical Immunology*, vol. 122, número 2, febrero 2007, páginas 139-145.

35 El procedimiento para pacientes que recaen o con enfermedad refractaria se basa principalmente en tratamientos experimentales seguido de trasplante de citoblastos, lo cual puede no ser adecuado para pacientes con un estado general malo o de edad avanzada. Por lo tanto, existe una enorme demanda de nuevos métodos que se puedan usar para tratar pacientes con NHL.

40 La conexión entre el cáncer y el metabolismo celular alterado está bien establecido. Véase, Cairns, R.A., et al. *Nature Rev.*, 2011, 11:85-95. La comprensión del metabolismo de las células tumorales y los cambios genéticos asociados al mismo pueden conducir a la identificación de métodos mejorados de tratamiento del cáncer. Ibidem. Por ejemplo, la supervivencia y proliferación de células tumorales a través del metabolismo de la glucosa aumentado se ha relacionado con la ruta del PIK3, de modo que mutaciones en genes supresores tumorales tales como PTEN activan el metabolismo de las células tumorales. Ibidem. AKT1 (también llamado PKB) estimula el metabolismo de la glucosa asociado con el crecimiento de células tumorales por diferentes interacciones con PFKFB3, ENTPD5, mTOR y TSC2 (también llamado tuberina). Ibidem.

50 Los factores de transcripción HIF1 y HIF2 son en gran medida responsables de la respuesta celular a las condiciones bajas en oxígeno asociadas a menudo con tumores. Ibidem. Una vez activado, HIF1 promueve la capacidad de la célula tumoral para llevar a cabo la glucólisis. Ibidem. Por lo tanto, la inhibición de HIF1 puede ralentizar o invertir el metabolismo de las células tumorales. La activación de HIF1 se ha asociado con PI3K, proteínas supresoras tumorales tales como VHL, succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa. Ibidem. El factor de transcripción oncogénico MYC también se ha asociado con el metabolismo de células tumorales, específicamente con la glucólisis. Ibidem. El MYC promueve la proliferación celular por rutas metabólicas de la glutamina. Ibidem.

55 La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) funciona como un punto de comprobación metabólico que deben superar las células tumorales con el fin de proliferar. Ibidem. Se han identificado varias mutaciones que suprimen la señalización de la AMPK en las células tumorales. Véase, Shackelford, D.B. y Shaw, R.J., *Nature Rev. Cancer*, 2009, 9: 563-575. STK11 se ha identificado como un gen supresor tumoral relacionado con la función de la AMPK.

Véase, Cairns, R.A., et al. *Nature Rev.*, 2011, 11:85-95.

5 El factor de transcripción p53, un supresor tumoral, también tiene una función importante en la regulación del metabolismo celular. Ibidem. La pérdida de p53 en células tumorales puede ser una contribución significativa a cambios en el metabolismo de células tumorales a la ruta glucolítica. Ibidem. El factor de transcripción OCT1, otro potencial objetivo para los compuestos quimioterapéuticos, puede cooperar con p53 en la regulación del metabolismo de las células tumorales. Ibidem.

10 La piruvato quinasa M2 (PKM2) promueve cambios en el metabolismo celular que confieren ventajas metabólicas a las células de cáncer sosteniendo la proliferación celular. Ibidem. Por ejemplo, se ha encontrado que las células de cáncer de pulmón que expresan PKM2 frente a PKM1 tienen dicha ventaja. Ibidem. En clínica, se ha identificado que PKM2 es sobreexpresada en una serie de tipos de cáncer. Ibidem. Por lo tanto, PKM2 puede ser un biomarcador útil para la detección temprana de tumores.

Las mutaciones en las isocitrato deshidrogenasas IDH1 y IDH2 se han asociado con oncogénesis, específicamente en glioblastoma y leucemia mieloide aguda. Véase, Mardis, E.R. et al., *N. Engl. J. Med.*, 2009, 361: 1058-1066; Parsons, D.W. et al., *Science*, 2008, 321: 1807-1812.

15 La incidencia del cáncer continúa aumentando a medida que la población envejece, se desarrollan nuevos cánceres y crecen las poblaciones susceptibles (p. ej., personas infectadas por SIDA, las personas mayores o expuestas en exceso a la luz solar). Por lo tanto, existe una enorme demanda de nuevos métodos, tratamientos y composiciones que se puedan usar para tratar pacientes con cáncer que incluyen, pero no se limitan a aquellos con linfoma, NHL, mieloma múltiple, AML, leucemias y tumores sólidos.

20 Una variedad de otras enfermedades y trastornos también están asociados con, o se caracterizan por angiogénesis no deseada. Por ejemplo, la angiogénesis potenciada o no regulada se ha implicado en una serie de enfermedades y afecciones médicas que incluyen, pero no se limitan a enfermedades neovasculares oculares, enfermedades neovasculares coroides, enfermedades neovasculares de la retina, rubeosis (neovascularización del ángulo), enfermedades víricas, enfermedades genéticas, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, fibrosis, artritis y enfermedades autoinmunitarias. Los ejemplos de dichas enfermedades y afecciones incluyen, pero no se limitan a: retinopatía diabética; retinopatía del prematuro; rechazo de injerto de córnea; glaucoma neovascular; fibroplasia retrolental; y vitreorretinopatía proliferativa.

30 Por consiguiente, los compuestos que pueden controlar y/o inhibir la angiogénesis no deseada o inhibir la producción de determinadas citoquinas, incluyendo el TNF- α , pueden ser útiles en el tratamiento y prevención de diferentes enfermedades y afecciones.

3.2. Enfermedades inflamatorias

35 La inflamación tiene una función fundamental en las defensas del hospedante y el avance de enfermedades inmunomediadas. La respuesta inflamatoria es iniciada en respuesta a la lesión (p. ej., traumatismo, isquemia y partículas extrañas) y la infección (p. ej., infección bacteriana o vírica) por una cascada compleja de sucesos, que incluyen mediadores químicos (p. ej., citoquinas y prostaglandinas) y células inflamatorias (p. ej., leucocitos). La respuesta inflamatoria se caracteriza por el mayor flujo sanguíneo, mayor permeabilidad capilar y el influjo de células fagocíticas. Estos sucesos dan como resultado hinchamiento, enrojecimiento, calor (patrones de calor alterados) y formación de pus en el sitio de la lesión o infección.

40 Las citoquinas y prostaglandinas controlan la respuesta inflamatoria y son liberadas en una cascada ordenada y autolimitante en la sangre o los tejidos afectados. Esta liberación de citoquinas y prostaglandinas aumenta el flujo sanguíneo a la zona de la lesión o infección, y puede dar como resultado enrojecimiento y calor. Algunos de estos compuestos químicos causan una pérdida de fluido a los tejidos, dando como resultado hinchamiento. Este proceso protector puede estimular nervios y causar dolor. Estos cambios, cuando se producen durante un periodo limitado en la zona relevante, trabajan para el beneficio del cuerpo.

45 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina que es liberada principalmente por fagocitos mononucleares en respuesta a inmunoestimuladores. El TNF- α es capaz de potenciar la mayoría de los procesos celulares, tales como diferenciación, reclutamiento, proliferación y degradación proteolítica. En niveles bajos, el TNF- α confiere protección contra agentes infecciosos, tumores y daño de tejidos. Pero el TNF- α también tiene una función en muchas enfermedades. Cuando se administra a mamíferos o seres humanos, el TNF- α causa o agrava la inflamación, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuestas de fase aguda similares a las vistas durante las infecciones agudas o estados de choque. La producción de TNF- α potenciada o no regulada se ha implicado en una serie de enfermedades y afecciones médicas, por ejemplo, cánceres, tales como tumores sólidos y tumores transportados por la sangre; enfermedades cardíacas, tales como insuficiencia cardíaca congestiva; y enfermedades víricas, genéticas, inflamatorias, alérgicas y autoinmunitarias.

55 La adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) también tiene una función en muchas enfermedades y afecciones, tales como, pero no limitado a asma e inflamación, y otras afecciones (Lowe y Cheng, *Drugs of the Future*, 17(9), 799-807, 1992). Se ha mostrado que el aumento de cAMP en leucocitos inflamatorios inhibe su activación y la

posterior liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo el TNF- α y NF- κ B. Los niveles aumentados de cAMP también conducen a la relajación del músculo liso de las vías respiratorias.

Una delicada interacción bien equilibrada entre los elementos inmunitarios humorales y celulares en la respuesta inflamatoria, permite la eliminación de agentes dañinos y el inicio de la reparación del tejido dañado. Cuando esta interacción delicadamente equilibrada se altera, la respuesta inflamatoria puede dar como resultado un daño considerable en el tejido normal y puede ser más dañina que la lesión original que inició la reacción. En los casos de respuestas inflamatorias no controladas, es necesaria la intervención clínica para prevenir el daño tisular y la disfunción de órganos. Enfermedades tales como la psoriasis, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, asma, alergias o enfermedad inflamatoria intestinal, se caracterizan por una inflamación crónica. Enfermedades inflamatorias tales como la artritis, afecciones artríticas relacionadas (p. ej., osteoartritis, artritis reumatoide y artritis psoriásica), enfermedad intestinal inflamatoria (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), septicemia, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades inflamatorias pulmonares crónicas, también son dolencias prevalentes y problemáticas. La producción de TNF- α potenciada o no regulada tiene una función central en la respuesta inflamatoria y la administración de sus antagonistas bloquea las respuestas crónicas y agudas en modelos animales de enfermedad inflamatoria.

La artritis es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que se puede referir a un grupo de afecciones que implican daño en las articulaciones del cuerpo. Hay aproximadamente 100 formas diferentes de artritis. La forma más común es la osteoartritis (enfermedad articular degenerativa) y otras formas de artritis son la artritis reumatoide, artritis psoriásica y enfermedades autoinmunitarias relacionadas tales como lupus y gota. La artritis reumatoide se caracteriza por una inflamación crónica de las articulaciones. Tanto el tejido como el líquido sinovial son invadidos por células inflamatorias, lo que conduce a la producción de citoquinas. Las células T y los monocitos que infiltran las articulaciones presentan una mayor activación de los marcadores de respuesta inmunitaria de tipo 1 y 2.

La artritis psoriásica es una afección artrítica inflamatoria crónica que afecta a la piel, las articulaciones, los sitios de inserción de tendones, ligamentos y fascia. Gladman, *Current Opinion in Rheumatology*, "Current concepts in psoriatic arthritis," 2002, 14:361-366, y Ruddy et al., *Rheumatology*, vol. 2., capítulo 71, página 1071, 6ª ed., 2001. La artritis psoriásica se asocia normalmente con la psoriasis. Ibidem. Aproximadamente 7% de los pacientes con psoriasis desarrollan artritis psoriásica. *The Merck Manual*, 448 (17ª ed. 1999). La artritis psoriásica puede aparecer en una variedad de patrones clínicos. Hay cinco patrones generales de artritis psoriásica: artritis de las articulaciones interfalángicas distales, artritis destructiva, poliartritis simétrica indistinguible de la artritis reumatoide, oligoartritis asimétrica y espondiloartropatía. Ruddy et al., página 1073. La psoriasis parece que precede al inicio de la artritis psoriásica en 60-80% de los pacientes. Ocasionalmente, la artritis y la psoriasis aparecen simultáneamente. Las erupciones cutáneas pueden estar precedidas por la artropatía.

La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria sistémica crónica que aparece en la piel. Existen cinco tipos de psoriasis: en placas, guttata, inversa, pustulosa y eritrodérmica. La forma más común, la psoriasis en placas, se ve normalmente como tonos rojos y blancos de parches escamosos que aparecen en la primera capa superior de la epidermis. Algunos pacientes, no obstante, no tienen síntomas dermatológicos. En la psoriasis en placas, la piel se acumula rápidamente en estos sitios, lo que le da un aspecto blanco plateado. Las placas se encuentran con frecuencia en la piel de los codos y rodillas, pero pueden afectar a cualquier zona, incluyendo el cuero cabelludo, palmas de las manos y plantas de los pies, y genitales. A diferencia del eczema, la psoriasis se encuentra con más probabilidad en el lado exterior de la articulación. El trastorno es una afección recurrente crónica que varía de gravedad desde parches menores localizados a cubrimiento completo del cuerpo. Las uñas de los dedos de las manos y las uñas de los pies están afectadas con frecuencia (distrofia ungueal psoriásica) y pueden verse como un síntoma aislado. La psoriasis también puede producir inflamación de las articulaciones, que se conoce como artritis psoriásica. En la psoriasis, una hipótesis es que las células T se vuelven activas, migran a la dermis y producen la liberación de citoquinas, en particular TNF- α , lo que produce inflamación y la rápida proliferación de queratinocitos.

3.3 Cereblon

Cereblon (CRBN) es una proteína de 442 aminoácidos conservada de planta a ser humano. En seres humanos, el gen del CRBN se ha identificado como un gen candidato de un retraso mental de origen autosómico recesivo no sindrómico (ARNSMR). Véase, Higgins, J.J. et al., *Neurology*, 2004, 63:1927-1931. El CRBN se caracterizó inicialmente como una proteína nueva que contenía RGS que interactuaba con una proteína del canal de potasio activado por calcio (SLO1) en el cerebro de rata, y más tarde se mostró que interactuaba con un canal de cloruro regulado por voltaje (CIC-2) en la retina con AMPK7 y DDB1. Véase, Jo, S. et al., *J. Neurochem*, 2005, 94:1212-1224; Hohberger B. et al., *FEBS Lett*, 2009, 583:633-637; Angers S. et al., *Nature*, 2006, 443:590-593. DDB1 se identificó originalmente como una proteína de reparación de la escisión de nucleótidos que se asocia con la proteína 2 de unión al ADN dañado (DDB2). Su actividad defectuosa causa la deficiencia de la reparación en pacientes con xeroderma pigmentoso grupo de complementación E (XPE). DDB1 también parece funcionar como un componente de numerosos complejos de ubiquitina-proteína ligasa E3 DCX (DDB 1-CUL4-X-box) que median la ubiquitinación y posterior degradación proteasómica de proteínas diana. El CRBN también se ha identificado como diana para el desarrollo de agentes terapéuticos para enfermedades de la corteza cerebral. Véase, el documento WO 2010/137547 A1.

Recientemente el cereblon se ha identificado como una diana molecular clave que se une a la talidomida para producir defectos de nacimiento. Véase, Ito, T. et al., *Science*, 2010, 327:1345-1350. Se encontró que DDB1 interaccionaba con CRBN y, por lo tanto, estaba indirectamente asociado con la talidomida. Además, la talidomida podía inhibir la autoubiquitinación del CRBN in vitro, sugiriendo que la talidomida es un inhibidor de la ubiquitin-ligasa E3. Ibidem. Es importante que esta actividad era inhibida por la talidomida en células de tipo natural, pero no en células con sitios de unión de CRBN mutados que previenen la unión de la talidomida. Ibidem. El sitio de unión de la talidomida se cartografió en una región de 104 aminoácidos C-terminal altamente conservada en el CRBN. Ibidem. Los mutantes puntuales individuales en CRBN, Y384A y W386A eran tanto defectuosos para la unión de la talidomida, teniendo el mutante puntual doble la actividad de unión a la talidomida más baja. Ibidem. Se confirmó una conexión entre el CRBN y el efecto teratogénico de la talidomida en modelos animales de pez cebra y embriones de pollo. Ibidem.

Si la unión al CRBN, el complejo de ubiquitina-ligasa E3 CRBN, o uno o más sustratos de CRBN, es necesaria para los efectos beneficiosos de la talidomida y otros fármacos, todavía está por establecer. La comprensión de estas interacciones con la talidomida y otros fármacos objetivos, permitirán la definición de los mecanismos moleculares de eficacia y/o toxicidad y puede conducir a fármacos con mejores perfiles de eficacia y toxicidad.

3.4 Compuestos

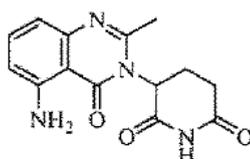
Se han llevado a cabo una serie de estudios con el objetivo de proporcionar compuestos que se puedan usar de forma segura y eficaz para tratar enfermedades asociadas con la producción anormal de TNF- α . Véase, p. ej., Marriott, J.B., et al., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2001,1(4): 1-8; G.W. Muller, et al., *J Med Chem.*, 1996,39(17): 3238-3240; y G.W. Muller, et al., *Bioorg & Med Chem Lett.*, 1998, 8: 2669-2674. Algunos estudios se han centrado en un grupo de compuestos seleccionados por su capacidad para inhibir de forma potente la producción de TNF- α por PBMC estimuladas por LPS. L.G. Corral, et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 1999, 58:(Suppl I) 1107-1113. Estos compuestos no solo muestran una potente inhibición del TNF- α sino también una notable inhibición de la producción por monocitos de IL1 β e IL12 inducida por LPS. La IL6 inducida por LPS también es inhibida por dichos compuestos, aunque parcialmente. Estos compuestos son potentes estimuladores de la IL10 inducida por LPS. Ibidem.

Los compuestos para los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)ftalimidias sustituidas y 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisindoles sustituidos, descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.281.230 y 6.316.471, ambas de G.W. Muller, et al. Otros compuestos específicos más descritos en la presente memoria pertenecen a la clase de las isoindol-imidas descritas en las patentes de EE.UU. nº 6.395.754, 6.555.554, 7.091.353, publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0029832, y publicación internacional nº WO 98/54170.

La talidomida, lenalidomida y pomalidomida han mostrado respuestas notables en pacientes con mieloma múltiple, linfoma y otras enfermedades hematológicas, tales como el síndrome mielodisplásico. Véase, Galustian C, et al., *Expert Opin Pharmacother.*, 2009, 10:125-133. Estos fármacos presentan un amplio espectro de actividad, que incluye propiedades antiangiogénicas, modulación de citoquinas proinflamatorias, coestimulación de células T, mayor toxicidad de células NK, efectos antitumorales directos y modulación de la diferenciación de citoblastos.

Por ejemplo, la talidomida y lenalidomida han surgido como opciones importantes para el tratamiento del mieloma múltiple en pacientes recién diagnosticados, en pacientes con la enfermedad avanzada en los que ha fallado la quimioterapia o trasplante, y en paciente con mieloma múltiple en recaída o refractario. La lenalidomida en combinación con la dexametasona ha sido aprobada para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple que han recibido al menos una terapia previa. La pomalidomida también se puede administrar en combinación con la dexametasona. La publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0029832 A1 describe el tratamiento del mieloma múltiple.

Otro compuesto proporcionado en la presente memoria es la 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona ("Compuesto A"), que tiene la siguiente estructura:



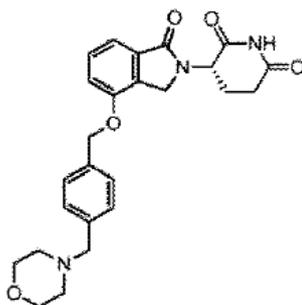
A

o un enantiómero o una mezcla de sus enantiómeros; o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocrystalos, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables.

El compuesto A se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos proporcionados en la presente memoria o como se describe en la patente de EE.UU. nº 7.635.700. El compuesto también se puede sintetizar de acuerdo con otros métodos evidentes para los expertos en la técnica, basándose en la enseñanza de la

presente memoria. En algunas realizaciones, el compuesto A está en una forma cristalina descrita en la solicitud de patente provisional de EE.UU. n° 61/451.806, presentada el 11 de marzo de 2011. En algunas realizaciones, se usa la sal de hidrocloreto del compuesto A en los métodos proporcionados en la presente memoria. Los métodos de tratamiento, prevención y/o atención integral del cáncer y otras enfermedades usando el compuesto A se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU. n° 61/451.995, presentada el 11 de marzo de 2011.

En algunas realizaciones, se proporciona en la presente memoria la 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona. En una realización, se proporciona en la presente memoria el estereoisómero (S) de la 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona ("compuesto B"). La 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona racémica, otros compuestos de 4'-arilmetoxiisoidolina y métodos para prepararlos, se han descrito en la publicación de patente de EE.UU. n° 2011/0196150. El compuesto B tiene la siguiente estructura:



B

Los métodos convencionales de evaluación de los efectos de compuestos inmunomoduladores requieren ensayos con células vivas o criterios de valoración clínicos largos. Estos ensayos celulares son difíciles y a menudo requieren el uso de diferentes estimulantes (p. ej., lipopolisacárido o anticuerpo anti-CD3). Se evalúan los criterios de valoración indirectos tales como la producción de citoquinas, en los que se puede influir por múltiples rutas. Además, la eficacia clínica de estos compuestos no se podía predecir correctamente, ya que solo se podía medir en términos de respuesta del paciente, que normalmente requiere un mínimo de varios meses de tratamiento. En vista de las deficiencias de los métodos convencionales, existe una necesidad de desarrollar un método eficaz, sensible y preciso para detectar, cuantificar y caracterizar la actividad farmacodinámica de compuestos inmunomoduladores.

4. Resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para determinar si un compuesto es capaz de alterar la respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula de un sujeto con el compuesto *in vitro*; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (c) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto para alterar la respuesta inmunitaria en el sujeto.

En una realización, la primera célula es una célula mononuclear de sangre periférica, célula B, célula T, monocito o granulocito. En otra realización, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

La presente invención también proporciona métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad inflamatoria, que comprenden: (a) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en una primera muestra de un sujeto que tiene el cáncer o la enfermedad inflamatoria al que se le ha administrado un compuesto; y (b) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (a) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento del cáncer o la enfermedad inflamatoria.

En una realización, la primera muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama. En otra realización, la referencia se prepara usando: (i) una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra; o (ii) una segunda muestra obtenida de un sujeto sano que no tiene el cáncer o la enfermedad inflamatoria; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.

En algunas realizaciones, el cáncer o la enfermedad inflamatoria es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica.

En una realización, la determinación del nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a

IKZF1 (Ikaros); (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a dicha IKZF1 (Ikaros), y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente de dicha IKZF1 (Ikaros) que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar el nivel de IFKZ1 (Ikaros) basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En otra realización, la determinación del nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica dicha IKZF1 (Ikaros); y (iii) determinar el nivel de ARN de dicha IKZF1 (Ikaros) basado en la cantidad del ADN amplificado.

En una realización, el compuesto disminuye el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) en comparación con la referencia. En una realización particular, el compuesto es la talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables.

En otra realización, los métodos comprenden además determinar el nivel de IKZF3 (Aiolos).

En vista de la invención como se ha descrito antes y se define en las reivindicaciones, y para los fines de determinación de los límites de la invención en la siguiente descripción, la referencia a proteína asociada a cereblon o CRBN, debe entenderse que se refiere a la proteína 1 con dedos de zinc Ikaros o IKZF1 (Ikaros).

En una realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para determinar si un compuesto es inmunomodulador, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula con el compuesto in vitro; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de la proteína asociada a CRBN en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de la proteína asociada a CRBN de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto como un inmunomodulador. En algunas realizaciones, el contacto en la etapa (a) se lleva a cabo in vitro. En una realización, las células se ponen en contacto con el compuesto durante un periodo de tiempo, p. ej., de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días. En algunas realizaciones, las células son células mononucleares de sangre periférica, células B, células T, monocitos o granulocitos. En otras realizaciones, las células son células tumorales o de cáncer, p. ej., linfoma, mieloma o leucemia. En una realización, las células tumorales o de cáncer se obtienen de una línea celular.

En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente en la proteína asociada a CRBN que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de proteína asociada a CRBN basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica la proteína asociada a CRBN; y (iii) determinar el nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad del ADN amplificado.

En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

En otra realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de cáncer o una enfermedad inflamatoria, que comprenden: (a) administrar un compuesto a un sujeto que tiene cáncer o enfermedad inflamatoria; (b) obtener una primera muestra del sujeto; (c) determinar el nivel de la proteína asociada a CRBN en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de la proteína asociada a CRBN de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, el cáncer es, p. ej., un tumor sólido o cáncer de la sangre como se describe en la sección 5.2.3 más adelante, y la enfermedad inflamatoria es, p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica, otras enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, o una enfermedad inflamatoria como se describe en la sección 2.2 anterior. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es el

mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama.

5 En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente en la proteína asociada a CRBN que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de proteína asociada a CRBN basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

10 En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica la proteína asociada a CRBN; y (iii) determinar el nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad del ADN amplificado.

15 En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra. En otra realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida de un sujeto sano que no tiene el cáncer o una enfermedad inflamatoria; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.

20 En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto es un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante. En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto inmunomodulador es talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables. En una realización, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En otra realización, el compuesto aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia.

25 De acuerdo con los métodos de la invención proporcionados en la presente memoria, la proteína asociada a CRBN es la proteína 1 con dedos de zinc Ikaros (IKZF1, Ikaros). Otras proteínas asociadas a CRBN son la proteína 1 de unión a ADN dañado (DDB1); proteína 1 de unión a poliadenilato (PABPC1); ribonucleoproteína nuclear heterogénea R (HNRNPR); proteína ribosomal L19 (RPL19); proteína que interacciona con el ARN citoplasmático, de unión a sinaptotagmina, (SYNCRIP); familia de histonas H2A, miembro X (H2AFX); proteína de choque térmico de 70 kDa 8 (HSPA8); aldolasa A, fructosa-bisfosfato (ALDOA); grupo de histonas 1, H2aa (HIST1H2AA); proteína de choque térmico 1A de 70kDa (HSPA1A); proteína complementaria cruzada de reparación de rayos X 6 (XRCC6);
 30 proteína ribosomal L12 (RPL12); proteína ribosomal 18A (RPL18A); proteína ribosomal L4 (RPL4); ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1 (HNRNPA2B1); ribonucleoproteína heterogénea nuclear C (HNRNPC); proteína ribosomal S2 (RPS2); miembro C de la familia SEC24 (SEC24C); proteína ribosomal L9 (RPL9); peptidasa específica de ubiquitina 15 (USP15); familia SEC24, miembro A (SEC24A); CTP sintasa (CTPS); casete de unión a ATP, miembro 1 de la subfamilia E (OABP) (ABCE1); factor 1 de elongación de la traducción eucariota alfa 1 (EEF1A1); importina 5 (IPO5); factor 6 específico de escisión y poliadenilación (CPSF6); miembro beta 2 del canal de potasio regulado por voltaje (KCNAB2); marco de lectura abierto 42 del cromosoma 7 (C7ORF42); mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (SMC4); proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), polipéptido beta 3 (GNB3); familia de histonas H2A, miembro Z (H2AFZ); grupo de histonas 1, H1c (HIST1H1C); grupo de histonas 1, H1d (HIST1H1D); grupo de histonas 1, H1e (HIST1H1E); actina, beta (ACTB);
 40 caseína quinasa 2, polipéptido alfa 1 (CSNK2A1); cereblon (CRBN); polipéptido 21 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) (SEQ ID NO: 1) (DDX21); polipéptido 9 de caja DEAH (Asp-Glu-Ala-His) (SEQ ID NO: 2) (DHX9); homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 1 (DNAJC1); proteína 1 de unión a la proteína activadora de GTPasa (dominio SH3) (G3BP1); proteína de choque térmico 1B de 70kDa (HSPA1B); proteína 2 de unión a ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2BP2); proteína ribosomal L10a (RPL10A); proteína ribosomal L13a (RPL13A); proteína ribosomal L14 (RPL14); proteína ribosomal L15 (RPL15); proteína ribosomal L21 (RPL21); RPL3; proteína ribosomal L30 (RPL30); proteína ribosomal L7 (RPL7); proteína ribosomal L7a (RPL7A); proteína ribosomal, grande, P1 (RPLP1); proteína ribosomal, grande, P2 (RPLP2); miosina, cadena pesada 10, no muscular (MYH10); factor 3 de unión al potenciador de interleuquina, 90 kDa (ILF3); nucleolina (NCL); proteína ribosomal S13 (RPS13); proteína ribosomal S16 (RPS16); proteína ribosomal S19 (RPS19); proteína ribosomal S6 (RPS6);
 45 nucleasa estafilocócica y 1 que contiene dominio tudor (SND1); factor de iniciación de la traducción eucariota 2, subunidad 2 beta, 38 kDa (EIF2S2); ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2 (H') (HNRNPH2); ubiquitina B (UBB); factor de alargamiento de la traducción eucariota 1 gamma (EEF1G); receptor 1 ligado a X similar a

transducina (beta) 1 (TBL1XR1); subunidad alfa del complejo asociado al polipéptido naciente (NACA); factor de inicio de la traducción eucariota 4A, isoforma 1 (EIF4A1); ácido graso sintasa (FASN); fosforribosil pirofosfato amidotransferasa (PPAT); proteína 2 de unión a la proteína activadora de GTPasa (dominio SH3) (G3BP2); tubulina, alfa 1a (TUBA1A); proteína 2 similar asociada a ubiquitina (UBAP2L); componente 2 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM2); UDP-N-acteilglucosamina pirofosforilasa 1 (UAP1); tubulina, alfa 1c (TUBA1C); factor 2 de inicio de la traducción eucariota, subunidad 1 alfa, 35 kDa (EIF2S1); factor 3 de inicio de la traducción eucariota, subunidad J (EIF3J); proteína quinasa, polipéptido catalítico activado por ADN (PRKDC); componente 7 del complejo de mantenimiento de minicromosomas (MCM7); proteína ribosomal L11 (RPL11); tubulina, alfa 1b (TUBA1B); transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3); peptidil-ARNt hidrolasa 2 (PTRH2); proteína de unión a poli(A), citoplasmática 4 (PABPC4); proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, C (PTPRC); factor de reticulación de actina de microtúbulos 1 (MACF1); enzima E2O de conjugación con la ubiquitina (UBE2O); desoxiuridina trifosfatasa (DUT); proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), beta polipéptido 2-similar a 1 (GNB2L1); nucleoporina 88kDa (NUP88); familia de histonas H2A, miembro J (H2AFJ); homólogo B de Sec23 (*S. cerevisiae*) (SEC23B); piridoxal (piridoxina, vitamina B6) quinasa (PDXK); ATP citrato liasa (ACLY); dominio 1A interactivo rico en AT (similar a SWI) (ARID1A); glucano (1,4-alfa), enzima ramificadora 1 (GBE1); proteína de choque térmico 9 de 70kDa (mortalina) (HSPA9); polipéptido 17 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) (SEQ ID NO: 1) (DDX17); proteína 1 de unión al elemento en la dirección aguas arriba far (FUZE) (FUBP1); proteína 21 de caja F (FBXO21); región 1 del punto de rotura del sarcoma de Ewing (EWSR1); proteína 16 inducible por interferón, gamma (IFI16); proteína de activación de tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido épsilon (YWHAE); producto de fusión de proteína ribosomal 1 con resto de ubiquitina A-52 (UBA52); subunidad 6 homóloga fotomorfogénica constitutiva COP9 (arabidopsis) (COPS6); locus de complejo GNAS (GNAS); miembro 1 de la familia E2Q de enzima de conjugación con ubiquitina (UBE2Q1); miembro 3 de la familia de fermitina (FERMT3); proteína de ensamblaje de nucleosoma 1-similar a 2 (NAP1L2); proteína tumoral D52 (TPD52); VAMP proteína A asociada a (proteína de membrana asociada a vesícula), 33 kDa (VAPA); factor de alargamiento de la traducción eucariota 1 alfa similar a 3 (EEF1AL3); transcrito inducible por daño de ADN 4 (DDIT4); proteína 8 reguladora por disminución del desarrollo, expresada en célula neuronal precursora (NEDD8); grupo de histonas 1, H1a (HIST1H1A); grupo de histonas 1, H1b (HIST1H1B); material pericentriolar 1 (PCM1) o proteína 3 con dedos de zinc ikaros (IKZF3, Aiolos).

En un aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3 (también conocida como "Aiolos"). En otro aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3 que tiene un peso molecular de 58 kDa. En otro aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3 que tiene un peso molecular de 42 kDa. En otro aspecto de la descripción, los compuestos proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica). En otro aspecto de la descripción, el compuesto es pomalidomida y la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otro aspecto de la descripción, el compuesto es lenalidomida y la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otro aspecto de la descripción, el compuesto es la 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona y la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otro aspecto de la descripción, el compuesto es la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otro aspecto de la descripción, el compuesto es el enantiómero (S) de la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución.

De acuerdo con el método de la presente invención, la proteína asociada a CRBN es IKZF1 (también conocida como "Ikaros"). En otra realización, los compuestos proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica). En otra realización, el compuesto es pomalidomida y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es lenalidomida y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es la 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es el estereoisómero (S) de la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución.

En otra realización, se proporcionan en la presente memoria kits para llevar a cabo los métodos proporcionados en la presente memoria.

5. Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el efecto del compuesto B en la inhibición de la expresión de Aiolos en poblaciones de linfocitos (panel izquierdo) granulocitos (panel superior) y monocitos (panel derecho) presentado como un porcentaje del control de DMSO, n= 3.

La figura 2 muestra el compuesto B que inhibe significativamente la expresión de Aiolos en células B CD20+ como un porcentaje del control de DMSO, n=3.

- La figura 3 muestra el compuesto B que inhibe significativamente la expresión de Aiolos en células T CD3+ como un porcentaje del control de DMSO, n=3.
- La figura 4 muestra el estudio de la pauta posológica del compuesto B en primates no humanos.
- 5 La figura 5 muestra el compuesto B en el estudio de la pauta posológica en la respuesta al anticuerpo dependiente de T (TDAR) en monos. El panel superior muestra la valoración de diferentes tratamientos, vehículo, QD (cada día), EoD (cada 2 días), 2x/semana y 4 d si/3 d no. El esquema inferior representa la pauta posológica.
- La figura 6 muestra los grupos de tratamiento 1-4 en el estudio de macacos cangrejeros.
- La figura 7 muestra la transferencia Western de Aiolos en sangre entera humana. Las muestras de sangre entera se trataron con compuestos o DMSO 250 nM durante 18 h y después se sometieron a preparación de PBMC e IB.
- 10 La figura 8 muestra la transferencia Western de Aiolos en PBMC de mono. Se trataron PBMC de mono de la Isla de Mauricio con DMSO o compuesto B 2 nM y 200 nM. El panel izquierdo es el tratamiento a las 0 horas y el panel derecho es el tratamiento a las 18 horas.
- La figura 9 muestra la transferencia Western de Aiolos en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 1, control de vehículo.
- 15 La figura 10 muestra representaciones gráficas de la expresión de Aiolos de 58 kDa (paneles izquierda) y 42 kDa (paneles derecha) en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 1, control de vehículo.
- La figura 11 muestra la transferencia Western de Aiolos en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 2, dosis QD de compuesto B. El compuesto B reducía Aiolos de 58 kDa y aumentaba Aiolos de 42 kDa en varios monos.
- 20 La figura 12 muestra representaciones gráficas de la expresión de Aiolos de 58 kDa (paneles izquierda) y 42 kDa (paneles derecha) en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 2, dosis 1 vez al día de compuesto B.
- La figura 13 muestra la transferencia Western de Aiolos en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 3, dosis cada 2 días de compuesto B. El compuesto B reducía Aiolos de 58 kDa y aumentaba Aiolos de 42 kDa en varios monos.
- La figura 14 muestra representaciones gráficas de la expresión de Aiolos de 58 kDa (paneles izquierda) y 42 kDa (paneles derecha) en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 3, dosis cada 2 días de compuesto B.
- 25 La figura 15 muestra la transferencia Western de Aiolos en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 4, dosis 4 días/semana de compuesto B. El compuesto B reducía Aiolos de 58 kDa y aumentaba Aiolos de 42 kDa en varios monos.
- La figura 16 muestra representaciones gráficas de la expresión de Aiolos de 58 kDa (paneles izquierda) y 42 kDa (paneles derecha) en el estudio de macacos cangrejeros, grupo 4, dosis 4 días/semana de compuesto B.
- 30 La figura 17 muestra que los derivados inmunomoduladores de la talidomida (compuestos IMiD) regulan el factor de transcripción Aiolos por degradación en células T. El compuesto A inhibe la expresión de la proteína Aiolos de una forma dependiente de la concentración en concentraciones clínicamente relevantes.
- La figura 18 muestra el efecto diferencial de IMiD en la proteína Aiolos. Parece que el efecto se correlaciona con la actividad antiproliferativa del compuesto en células de mieloma. Pom, el compuesto A y compuesto B tienen mayor potencia que Len en la inhibición de la proteína Aiolos en células de mieloma.
- 35 La figura 19 muestra la regulación de Aiolos por IMiD. La regulación se anula en líneas celulares con expresión baja de CRBN. El panel izquierdo muestra la respuesta a la dosis con pomalidomida a las 4 horas. El panel de la derecha muestra la proliferación celular después de 5 días (n=3-7).
- La figura 20 muestra que la pérdida de proteína CRBN previene la regulación por disminución de Aiolos por la lenalidomida y pomalidomida. La disminución de la expresión de Aiolos por la lenalidomida o pomalidomida requiere la proteína CRBN.
- 40 La figura 21 muestra que la reducción de la expresión de Aiolos es similar al tratamiento con IMiD donde la reducción de la expresión induce la expresión de p21, disminuye IRF4 y disminuye el número de células en fase S. Aiolos es necesaria para la expresión de IRF4 y el avance del ciclo celular en células U266.
- 45 La figura 22 muestra que los IMiD afectan al nivel de la proteína Aiolos en células B de donantes sanos y de CLL. La expresión de Aiolos es mayor en células B de CLL que en células B de donantes sanos. El tratamiento con IMiD inhibe Aiolos en células B de pacientes con CLL.
- La figura 23 muestra que los IMiD inhiben la expresión de la proteína Aiolos en líneas celulares de MCL (Rec-1) y linfoma DLBCL (U2932, OCI-LY19).

- La figura 24 muestra que la reducción de la expresión de Aiolos induce la expresión de p21.
- La figura 25 muestra el efecto del compuesto A en los niveles de Aiolos endógeno en la línea de cáncer de mama inflamatoria AU565 y la línea celular de carcinoma humano ZR 75-1.
- 5 La figura 26 muestra el efecto del compuesto A en los niveles de Aiolos en células AU565 y los patrones de detección usando anticuerpos anti-flag y anti-myc.
- La figura 27 muestra el transcurso del tiempo de la inhibición de Aiolos por el compuesto A y rescate de dicha inhibición por MF-132.
- La figura 28 muestra el efecto del compuesto A en los niveles de Aiolos en células Her2⁺ en comparación con células triple negativo ("TN"; EP⁻/PR⁻/Her2⁻).
- 10 La figura 29 muestra la inhibición de la expresión de Aiolos por la lenalidomida en linfoma de xenoinjerto de OCI-Ly10.
- La figura 30 muestra la inhibición de la expresión de Aiolos por el compuesto A en linfoma de xenoinjerto de OCI-Ly10.
- 15 La figura 31 muestra la inhibición de la expresión de Aiolos por el isómero R del compuesto A en linfoma de xenoinjerto de OCI-Ly10.
- La figura 32 muestra la inhibición de la expresión de Aiolos por el isómero S del compuesto A en linfoma de xenoinjerto de OCI-Ly10.
- La figura 33A muestra los resultados del análisis de FACS en relación con la inhibición de la expresión de Aiolos en linfocitos 1,5 horas después del tratamiento de sangre entera con el compuesto A o compuesto B.
- 20 La figura 33B muestra la inhibición de la expresión de Aiolos en células T y células B 1,5 horas después del tratamiento de sangre entera con el compuesto A o compuesto B.
- La figura 34A muestra los resultados del análisis de FACS en relación con la inhibición de la expresión de Aiolos en linfocitos 5 horas después del tratamiento de sangre entera con el compuesto A o compuesto B.
- 25 La figura 34 B muestra la inhibición de la expresión de Aiolos en células T y células B 5 horas después del tratamiento de sangre entera con el compuesto A o compuesto B.
- La figura 35A muestra los resultados del análisis de FACS en relación con la inhibición de la expresión de Aiolos en PMBC congeladas de forma viable preparadas a partir de sangre entera 1,5 horas después del tratamiento con el compuesto A o compuesto B.
- 30 La figura 35B muestra la inhibición de la expresión de Aiolos en células T y células B congeladas de forma viable preparadas a partir de sangre entera 1,5 horas después del tratamiento con el compuesto A o compuesto B.
- La figura 36 A muestra los resultados del análisis de FACS en relación con la inhibición de la expresión de Aiolos en PMBC congeladas de forma viable preparadas a partir de sangre entera 5 horas después del tratamiento con el compuesto A o compuesto B.
- 35 La figura 36B muestra la inhibición de la expresión de Aiolos en células T y células B congeladas de forma viable preparadas a partir de sangre entera 5 horas después del tratamiento con el compuesto A o compuesto B.
- La figura 37 muestra la inhibición de la expresión de Aiolos e Ikaros 6 horas después de tratamiento con pomalidomida, lenalidomida, compuesto A y compuesto B.
- La figura 38 muestra la mejora de la detección del péptido Aiolos que contiene lisina 203 por la lenalidomida y pomalidomida en células de mieloma múltiple.
- 40 La figura 39 A muestra la degradación de Aiolos e Ikaros por la lenalidomida y pomalidomida en células de mieloma múltiple, células T y células B de una manera dependiente de la concentración y proteasoma.
- La figura 39 B muestra la degradación de Aiolos por la lenalidomida y pomalidomida en células de mieloma múltiple de una manera dependiente de la concentración.
- 45 La figura 39 C muestra la degradación de Ikaros por la lenalidomida y pomalidomida en células de mieloma múltiple de una manera dependiente de la concentración y proteasoma.
- La figura 40 muestra que la lenalidomida y pomalidomida destruyen Aiolos e Ikaros en el espacio de horas de tratamiento con fármaco en célula de MM, células T y células B de una manera dependiente del tiempo.

- La figura 41 muestra que la lenalidomida y pomalidomida inducen la destrucción de Aiolos en presencia de cicloheximida, e inhibidor de la síntesis de proteínas.
- La figura 42 A muestra que la degradación de Aiolos e Ikaros por la lenalidomida y pomalidomida depende de CRBN.
- 5 La figura 42 B muestra que siCRBN reduce la expresión génica de CRBN.
- La figura 43 A muestra que Aiolos es un regulador negativo de la IL-2 en células T.
- La figura 43 B muestra que el silenciamiento de Aiolos imita el tratamiento con lenalidomida.
- La figura 43 C muestra que siAiolos reduce los niveles de Aiolos.
- La figura 43 D muestra que el silenciamiento de Aiolos imita el tratamiento con pomalidomida.
- 10 La figura 44A muestra la actividad antitumoral de la lenalidomida contra células de MM H929 en ratones.
- La figura 44B muestra que la lenalidomida induce la degradación de Aiolos e Ikaros en células de MM H929 en ratones, medido por inmunohistoquímica.
- La figura 44C muestra que la actividad antitumoral in vivo por la lenalidomida se correlaciona con la degradación de Aiolos e Ikaros.
- 15 La figura 45 muestra que la degradación de Aiolos e Ikaros en células de mieloma múltiple es única para los compuestos proporcionados en la presente memoria.
- La figura 46 muestra los efectos in vivo del compuesto A en Ikaros y Aiolos en tumores de linfoma OCI-Ly10 en ratones.
- 20 La figura 47 A muestra que la inhibición de Aiolos se correlaciona con la exposición al compuesto A en células T por tiempo y dosis en pacientes de cáncer.
- La figura 47 B muestra que la inhibición de Aiolos se correlaciona con la exposición al compuesto A en células B por tiempo y dosis en pacientes de cáncer.
- La figura 48 A muestra que los compuestos inmunomoduladores afectan a la expresión de Ikaros en células T.
- La figura 48 B muestra que el compuesto A afecta a la expresión de Aiolos en células T.
- 25 La figura 49 muestra que el compuesto A degrada Aiolos tanto endógeno como sobreexpresado en células Jurkat; es necesaria la ubiquitinación de múltiples lisinas para que el compuesto A medie la degradación de Aiolos, prueba de que la degradación de Aiolos inducida por IMiD se debe a la ubiquitinación de Aiolos; y la degradación de la proteína Ikaros por el compuesto A es independiente de Aiolos en células Jurkat.
- 30 La figura 50 A muestra la transferencia Western de Aiolos de células T humanas primarias. El gel muestra una comparación de compuestos IMiD en la degradación de Aiolos en células T primarias a las 6 horas.
- La figura 50 B muestra la comparación de la cuantificación de compuestos proporcionados en la presente memoria en la degradación de Aiolos en células T primarias a las 6 horas.
- 35 La figura 50 C muestra la transferencia Western de Aiolos de células T humanas primarias. El gel muestra una comparación de compuestos proporcionados en la presente memoria en la degradación de Aiolos en células T primarias a las 24 horas.
- La figura 50 D muestra la comparación de la cuantificación de compuestos proporcionados en la presente memoria en la degradación de Aiolos en células T primarias a las 24 horas.
- La figura 51 A muestra reducciones de Aiolos en células B en respuesta a diferentes dosis de compuesto B en voluntarios sanos.
- 40 La figura 51 B muestra reducciones de Aiolos en células T en respuesta a diferentes dosis de compuesto B en voluntarios sanos.
- La figura 52 muestra que el compuesto B reduce los niveles de proteínas Ikaros y Aiolos en células B.
- La figura 53 A muestra la sobreexpresión de cereblon en SSc y SLE.
- Las figuras 53 B-E muestran la sobreexpresión de Ikaros en SSc y SLE.
- 45 La figura 53F muestra la sobreexpresión de Helios en SSc y SLE.

La figura 53G muestra la sobreexpresión de Aiolos en SSc y SLE.

La figura 54 muestra los niveles de Ikaros en muestras de PBMC de 32 monos tratados con diferentes dosis de compuesto B.

La figura 55 A muestra el efecto del compuesto B en los niveles de Ikaros en PBMC de monos machos y hembras.

5 La figura 55 B muestra el efecto del compuesto B en los niveles de Ikaros en PBMC de monos hembras.

La figura 55 C muestra el efecto del compuesto B en los niveles de Ikaros en PBMC de monos machos.

La figura 56 A muestra los efectos del tratamiento con compuestos proporcionados en la presente memoria usando transferencia Western de proteínas de proliferación y supervivencia claves en células de CLL.

10 La figura 56 B muestra los efectos del tratamiento con compuestos proporcionados en la presente memoria mediante la cuantificación de proteínas de proliferación y supervivencia claves en células de CLL.

La figura 56 C muestra la inhibición dependiente de la dosis de Aiolos por la pomalidomida, lenalidomida, compuesto A y compuesto B en tres muestras de cocultivo B de pacientes con CLL.

La figura 57 A muestra la cuantificación de Aiolos en células de control y B de CLL con reducción de la expresión de CRBN, tratadas con DMSO, pomalidomida, lenalidomida, compuesto A o compuesto B.

15 La figura 57 B muestra la cuantificación de la medición por citometría de flujo de proteína Aiolos en células de control y B de CLL con reducción de la expresión de CRBN, tratadas con DMSO, pomalidomida, lenalidomida, compuesto A o compuesto B.

La figura 57 C muestra la cuantificación de isoformas de Ikaros detectadas en células de control y B de CLL con reducción de la expresión de CRBN, tratadas con DMSO, pomalidomida, lenalidomida, compuesto A o compuesto B.

20 Descripción detallada de la invención

6.1 Definiciones

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

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

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto inmunomodulador" o "fármaco inmunomodulador" se refiere a una molécula o agente capaz de alterar la respuesta inmunitaria de alguna forma. Los ejemplos no limitantes de compuestos inmunomoduladores incluyen los descritos en la sección 5.3 más adelante.

35 Como se usa en la presente memoria, y salvo que se especifique de otra forma, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o atención integral de un cáncer, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la presencia del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto significa una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o atención integral del cáncer. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" puede abarcar una cantidad que mejora la terapia en general, reduce o evita síntomas o causas del cáncer, o aumenta la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

40 Como se usa en la presente memoria, una "respuesta tumoral eficaz del paciente" se refiere a cualquier aumento del beneficio terapéutico para el paciente. Una "respuesta tumoral eficaz del paciente" puede ser, por ejemplo, una disminución de 5%, 10%, 25%, 50% o 100% en la tasa de avance del tumor. Una "respuesta tumoral eficaz del paciente" puede ser, por ejemplo, una disminución de 5%, 10%, 25%, 50% o 100% en los síntomas físicos de un cáncer. Una "respuesta tumoral eficaz del paciente" puede ser también, por ejemplo, un aumento de 5%, 10%, 25%,
45 50%, 100%, 200% o más en la respuesta del paciente, medido por cualquier medio adecuado, tal como expresión de genes, recuentos de células, resultados de ensayos, etc.

El término "verosimilitud" se refiere en general a un aumento en la probabilidad de un suceso. El término "verosimilitud" cuando se usa en referencia a la eficacia de una respuesta tumoral del paciente en general contempla una mayor probabilidad de que la tasa de avance del tumor o el crecimiento celular del tumor disminuyan.

50 El término "verosimilitud" cuando se usa en referencia a la eficacia de una respuesta tumoral del paciente en general también significa el aumento de indicadores, tales como ARNm o expresión de proteína, que pueden probar un

aumento en el avance en el tratamiento del tumor.

El término "predecir" en general significa determinar o decir con antelación. Cuando se usa para "predecir" la eficacia de un tratamiento del cáncer, por ejemplo, el término "predecir" puede significar la verosimilitud de que el resultado del tratamiento del cáncer se pueda determinar al comienzo, antes de que haya empezado el tratamiento, o antes de que el periodo de tratamiento haya avanzado sustancialmente.

El término "vigilar", como se usa en la presente memoria, en general se refiere a la inspección, supervisión, regulación, observación, seguimiento o vigilancia de una actividad. Por ejemplo, la expresión "vigilar la eficacia de un compuesto" se refiere a seguir la eficacia del tratamiento de un cáncer en un paciente o en un cultivo de células tumorales. De forma similar, la "vigilancia", cuando se usa en relación con la observancia de un paciente, sea de forma individual, o en un ensayo clínico, se refiere al seguimiento o confirmación de que el paciente está realmente tomando un fármaco que se está ensayando como se ha prescrito. La vigilancia se puede llevar a cabo, por ejemplo, siguiendo la expresión del ARNm o biomarcadores de proteínas.

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

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

Como se usa en la presente memoria, la expresión "proteína asociada a cereblon" o "proteína asociada a CRBN" se refiere a una proteína que interacciona con o se une a CRBN directa o indirectamente. En algunas realizaciones, una "proteína asociada a cereblon" o "proteína asociada a CRBN" es un sustrato de CRBN, por ejemplo, un sustrato proteína del complejo de ubiquitina ligasa E3 que implica al CRBN, o los sustratos corriente abajo del mismo. En el contexto de la invención, la proteína asociada a CRBN proporcionada en la presente memoria es un sustrato de CRBN IKZF1, también conocida como "Ikaros". En algunas realizaciones, una "proteína asociada a cereblon" o "proteína asociada a CRBN" es una proteína de unión a CRBN.

El término "regula" como se usa en la presente memoria se refiere a controlar la actividad de una molécula o función biológica, tal como potenciar o disminuir la actividad o función.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a tumores transportados por la sangre (p. ej., mieloma múltiple, linfoma y leucemia) y tumores sólidos.

El término "refractario o resistente" se refiere a una circunstancia donde los pacientes, incluso después de tratamiento intensivo, tienen células de cáncer residuales (p. ej., células de leucemia o linfoma) en su sistema linfático, sangre y/o tejidos formadores de sangre (p. ej., médula ósea).

Como se usa en la presente memoria, los términos "polipéptido" y "proteína" como se usan de forma intercambiable en la presente memoria, se refieren a un polímero de aminoácidos de tres o más aminoácidos en un orden consecutivo, unidos por enlaces peptídicos. El término "polipéptido" incluye proteínas, fragmentos de proteínas, análogos de proteínas, oligopéptidos y similares. El término polipéptido como se usa en la presente memoria también se puede referir a un péptido. Los aminoácidos que componen el polipéptido se pueden obtener de forma natural, o pueden ser sintéticos. El polipéptido se puede purificar de una muestra biológica.

El término "anticuerpo" se usa en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre anticuerpos ensamblados completamente, fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad para unirse específicamente al antígeno (p. ej., Fab, F(ab')₂, Fv, y otros fragmentos), anticuerpos de cadena sencilla, dímeros, quimeras de anticuerpos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados, y similares. El término "anticuerpo" cubre tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. El término "anticuerpo" e "inmunoglobulina" o "Ig" se pueden usar de forma intercambiable en la presente memoria. Las expresiones "anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno de CRBN", "anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un epítipo de CRBN", "anticuerpos contra CRBN", "anticuerpos anti-CRBN" y expresiones análogas también se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a anticuerpos y sus fragmentos, que se unen específicamente a un polipéptido de CRBN, tal como un antígeno o epítipo de CRBN (p. ej., péptido 65-76 de CRBN humano). Los anticuerpos incluyen tanto anticuerpos modificados (es decir, anticuerpos que comprenden un dominio constante de IgG modificado (p. ej., IgG1) como anticuerpos no modificados (es decir, anticuerpos que no comprenden un

dominio constante de IgG modificado (p. ej., 1gG1) que se unen específicamente a un polipéptido de CRBN. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de CRBN puede tener reacción cruzada con antígenos relacionados. En algunas realizaciones, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de CRBN no tiene reacción cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de CRBN se puede identificar, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Un anticuerpo o un fragmento del mismo se une específicamente a un antígeno de CRBN cuando se une a un antígeno de CRBN con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reactividad cruzada, determinado usando técnicas experimentales tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble que la señal de fondo o ruido y más típicamente será más de 10 veces la señal de fondo. Véase, p. ej., Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York en las páginas 332-336 para una descripción en relación con la especificidad del anticuerpo.

Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fv monocatenario (scFv) (p. ej., incluyendo monoespecíficos, biespecíficos, etc.), anticuerpos camelizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab²), Fv unidos por disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiopáticos (anti-Id), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria incluyen moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios de unión al antígeno o moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno de CRBN (p. ej., una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-CRBN). Los anticuerpos proporcionados en la presente memoria pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), cualquier clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o cualquier subclase (p. ej., IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CRBN son completamente humanos, tal como anticuerpos contra CRBN monoclonales completamente humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria son anticuerpos de IgG, o una clase (p. ej., IgG1 o IgG4 humana) o subclase de la misma.

La expresión "dominio de unión al antígeno", "región de unión al antígeno", "fragmento de unión al antígeno", y expresiones similares, se refieren a aquella parte de un anticuerpo que comprende los restos de aminoácidos que interaccionan con un antígeno y confiere al agente de unión su especificidad y afinidad para el antígeno (p. ej., la CDR). La región de unión al antígeno puede derivar de cualquier especie animal, tal como roedores (p. ej., conejo, rata o hámster) y seres humanos. En algunas realizaciones, la región de unión al antígeno será de origen humano.

La expresión "región constante" o "dominio constante" de un anticuerpo se refiere a una parte carboxi terminal de la cadena ligera y pesada que no está directamente implicada en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presenta varias funciones efectoras, tales como interacción con el receptor Fc. Las expresiones se refieren a la parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con la otra parte de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CL de la cadena ligera.

El término "epítipo" como se usa en la presente memoria se refiere a una región localizada en la superficie de un antígeno, tal como polipéptido de CRBN o fragmento de polipéptido de CRBN, que es capaz de unirse a una o más regiones de unión al antígeno de un anticuerpo, y que tiene la actividad antigénica o inmunógena en un animal, tal como un mamífero (p. ej., un ser humano), que es capaz de producir una respuesta inmunitaria. Un epítipo que tiene actividad inmunógena es una parte de un polipéptido que produce una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una parte de un polipéptido a la que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente como se determina por cualquier método bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en la presente memoria. Los epítopos antígenos no tienen que ser necesariamente inmunógenos. Los epítopos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede venir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no una característica de superficie tridimensional del antígeno.

Las expresiones "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, en algunas realizaciones, una región constante humana. En realizaciones específicas, las expresiones se refieren a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. Anticuerpos anti-CRBN "completamente humanos", en algunas realizaciones, también puede abarcar anticuerpos que se unen a polipéptidos de CRBN y son codificados por secuencias de ácido nucleico que son variantes somáticas que se encuentran en forma natural de la secuencia de ácido nucleico de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización específica, los anticuerpos anti-CRBN proporcionados en la presente memoria son anticuerpos completamente humanos. La expresión "anticuerpo completamente humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana

como describen Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242, 1991. Se proporcionan métodos de ejemplo para producir anticuerpos completamente humanos, p. ej., en los ejemplos de la presente memoria, pero se puede usar cualquier método conocido en la técnica.

5 La frase "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedante, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón o vaca) que es transgénico y/o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Taylor, L. D. et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana distintas de las secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes humanos pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Véase, Kabat, E. A. et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242. Sin embargo, en algunas realizaciones, dichos anticuerpos recombinantes humanos se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan y están relacionadas con las secuencias de VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

La expresión "cadena pesada" cuando se usa en relación con un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, llamados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basado en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. Estos tipos de cadenas pesadas son bien conocidas y dan lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, en particular IgG1, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

La expresión "numeración de Kabat", y términos similares se reconocen en la técnica y se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que los otros restos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte del mismo de unión al antígeno. Kabat et al. (1971) *Ann. any Acad. Sci.* 190:382-391, y Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242. Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable típicamente va de las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para la CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 65 para la CDR2 y posiciones de aminoácidos 95 a 102 para la CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable típicamente va de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para la CDR1, posiciones de aminoácidos 50 a 56 para la CDR2 y posiciones de aminoácidos 89 a 97 para la CDR3. Los expertos en la técnica entenderán fácilmente otros esquemas de numeración.

La expresión "cadena ligera" cuando se usa en referencia a un anticuerpo se refiere a dos tipos distintos, llamadas kappa (κ) de lambda (λ) basados en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera son bien conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos homogéneos o sustancialmente homogéneos, y cada anticuerpo monoclonal típicamente reconocerá un solo epítipo del antígeno. En algunas realizaciones, un "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, es un anticuerpo producido por un solo hibridoma u otra célula, en donde el anticuerpo se une inmunoespecíficamente a solo un epítipo de CRBN como se determina, p. ej., por ELISA u otro ensayo de unión a antígeno o competitivo conocido en la técnica o de los ejemplos proporcionados en la presente memoria. El término "monoclonal" no está limitado a ningún método particular para hacer el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales proporcionados en la presente memoria se pueden hacer por el método del hibridoma como describen Kohler et al.; *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden aislar de bibliotecas de fagos usando las técnicas descritas en la presente memoria, por ejemplo. Otros métodos para preparar líneas celulares clonales y anticuerpos monoclonales expresados por las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., el capítulo 11 en: "Short Protocols in Molecular Biology", (2002) 5ª Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York. Se proporcionan otros métodos de ejemplo de producción de otros anticuerpos monoclonales en los ejemplos en la presente memoria.

"Anticuerpos policlonales" como se usa en la presente memoria se refiere a una población de anticuerpos generada en una respuesta inmunógena contra una proteína que tiene muchos epítopos y por lo tanto incluye una variedad de anticuerpos diferentes dirigidos contra el mismo y contra diferentes epítopos dentro de la proteína. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos policlonales. Véase, p. ej., el capítulo 11 en: "Short Protocols in Molecular Biology", (2002) 5ª Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York.

Los términos "cereblon" o "CRBN" y términos similares, se refiere a los polipéptidos ("polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" se usan de forma intercambiable en la presente memoria) que comprenden cualquier secuencia de

- aminoácidos de CRBN, tal como una proteína CRBN humana (p. ej., isoforma 1 de CRBN humano, nº de acceso de GenBank NP_057386; o isoformas 2 de CRBN humano, nº de acceso en GenBank NP_001166953), y polipéptidos relacionados, que incluyen sus variantes de SNP. Los polipéptidos de CRBN relacionados incluyen variantes alélicas (p. ej., variantes de SNP); variantes de corte y empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, eliminación e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos interespecie, que en algunas realizaciones retienen la actividad del CRBN y/o es suficiente para generar una respuesta inmunitaria anti-CRBN.
- La expresión "antígeno de CRBN" se refiere a la parte de un polipéptido de CRBN al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo. Un antígeno de CRBN también se refiere a un análogo o derivado de un polipéptido de CRBN o fragmento del mismo al que se une inmunoespecíficamente un anticuerpo. Una región localizada sobre la superficie de un antígeno de CRBN que es capaz de producir una respuesta inmunitaria es un "epítipo" de CRBN. Una región de un polipéptido CRBN que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede venir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no una característica de superficie tridimensional del antígeno.
- La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere a una parte de las cadenas ligera y pesada, típicamente aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino terminales en la cadena pesada y aproximadamente 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en aquellas regiones llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se llaman regiones armazón (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son responsables principalmente de la interacción del anticuerpo con el antígeno. La numeración de las posiciones de aminoácidos usada en la presente memoria está de acuerdo con el índice EU, como en, véase, Kabat, E. A. et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH Nº 91-3242. En algunas realizaciones, la región variable es una región variable humana.
- El término "expresado" o "expresión" como se usa en la presente memoria se refiere a la transcripción de un gen para dar una molécula de ácido nucleico ARN al menos complementaria en parte de una región de una de las dos cadenas de ácido nucleico del gen. El término "expresado" o "expresión" como se usa en la presente memoria también se refiere a la traducción de la molécula de ARN para dar una proteína, un polipéptido o una parte del mismo.
- Un ARNm que es "regulado por aumento" en general aumenta tras un tratamiento o afección dados. Un ARNm que es "regulado por disminución" en general se refiere a una disminución en el nivel de expresión del ARNm en respuesta a un tratamiento o afección dados. En algunas situaciones, el nivel de ARNm puede permanecer sin cambiar tras un tratamiento o afección dados.
- Un ARNm de una muestra de un paciente puede ser "regulado por aumento" cuando se trata con un fármaco, en comparación con un control no tratado. Esta regulación por aumento puede ser, por ejemplo, un aumento de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de ARNm de control comparativo.
- Alternativamente, un ARNm puede ser "regulado por disminución", o ser expresado en un nivel menor, en respuesta a la administración de determinados compuestos u otros agentes. Un ARNm regulado por disminución puede estar presente, por ejemplo, en un nivel de aproximadamente 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 1% o menos del nivel de ARNm de control comparativo.
- De forma similar, el nivel de un biomarcador polipéptido o proteína de una muestra de paciente se puede aumentar cuando se trata con un fármaco, en comparación con un control no tratado. Este aumento puede ser de aproximadamente 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1.000%, 5.000% o más del nivel de proteína de control comparativo.
- Alternativamente, el nivel de un biomarcador proteína puede disminuir en respuesta a la administración de determinados compuestos u otros agentes. Esta disminución puede estar presente, por ejemplo, en un nivel de aproximadamente 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 1% o menos del nivel de proteína de control comparativo.
- Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar" y "ensayar" como se usan en la presente memoria se refieren en general a cualquier forma de medición e incluyen determinar si un elemento está o no presente. Estos términos incluyen tanto determinaciones cuantitativas como/o cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluar la presencia de" puede incluir determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.
- Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para describir un polímero de cualquier longitud compuesto de nucleótidos, p. ej., desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos de forma sintética, que pueden hibridar con ácidos nucleicos que se encuentran de forma natural de una forma específica de secuencia análoga a la de dos ácidos nucleicos que se

encuentran de forma natural, p. ej., pueden participar en interacciones de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Como se usa en la presente memoria, en el contexto de una secuencia de polinucleótido, el término "bases" (o "base") es sinónimo de "nucleótidos" (o "nucleótido"), es decir, la subunidad de monómero de un polinucleótido. Los términos "nucleósido" y "nucleótido" se pretende que incluyan aquellos restos que contienen no solo bases de purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas que se han modificado. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, ribosas alquiladas y otros heterociclos. Además, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluyen aquellos restos que contienen no solo azúcares de ribosa y desoxirribosa convencionales, sino también otros azúcares. Los nucleósidos o nucleótidos modificados también incluyen modificaciones en el resto de azúcar, p. ej., en donde uno o más grupos hidroxilo se sustituyen por átomos de halógeno o grupos alifáticos, o son funcionalizados como éteres, aminas, o similares. "Análogos" se refiere a moléculas que tienen características estructurales que se reconocen en la bibliografía como que son miméticas, derivadas, que tienen estructuras análogas, u otros términos similares, e incluyen, por ejemplo, polinucleótidos que incorporan nucleótidos no naturales, miméticos de nucleótidos tales como nucleósidos 2'-modificados, ácidos nucleicos peptídicos, fosfonatos de nucleósidos oligómeros, y cualquier polinucleótido que tenga grupos sustituyentes añadidos, tales como grupos protectores o restos de conexión.

El término "complementario" se refiere a la unión específica entre polinucleótidos basada en las secuencias de los polinucleótidos. Como se usa en la presente memoria, un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido son complementarios si se unen entre sí en un ensayo de hibridación en condiciones restrictivas, p. ej., si producen un nivel dado o detectable de señal en un ensayo de hibridación. Partes de los polinucleótidos son complementarias entre sí, si siguen las reglas convencionales de emparejamiento de bases, p. ej., A se empareja con T (o U) y G se empareja con C, aunque pueden estar presentes regiones pequeñas (p. ej., menos de aproximadamente 3 bases) de secuencia de mal emparejamiento, inserción o eliminación.

"Identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico, se refiere a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, y pueden tener en cuenta adiciones, eliminaciones y sustituciones.

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

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

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

"Muestra biológica" como se usa en la presente memoria se refiere a una muestra obtenida de un sujeto biológico, que incluye muestra de tejido biológico o de origen fluido, obtenida, conseguida o recogida in vivo o en el sitio. Una muestra biológica también incluye muestras de una región de un sujeto biológico que contiene células o tejidos precancerosos o de cáncer. Dichas muestras pueden ser, pero no se limitan a órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de un mamífero. Las muestras biológicas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de piel, y similares. Las muestras biológicas preferidas incluyen, pero no se limitan a sangre entera, sangre parcialmente purificada, PBMC, biopsias de tejidos, y similares.

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

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

La expresión "ácido nucleico" o "sonda de oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de unirse a un ácido nucleico objetivo de secuencia complementaria, tal como los biomarcadores de ARNm proporcionados en

la presente memoria, mediante uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente mediante emparejamiento de bases complementarias, normalmente por formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (p. ej., A, G, C o T) o bases modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante una unión distinta de un enlace fosfodiéster, con la condición de que no interfiera con la hibridación. Un experto en la técnica entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias objetivo que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Las sondas preferiblemente se marcan directamente con isótopos, por ejemplo, cromóforos, luminóforos, cromógenos o se marcan indirectamente con biotina a la que se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Evaluando la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de un biomarcador de ARNm objetivo de interés.

La expresión "condiciones de ensayo restrictivas" se refiere a condiciones que son compatibles con producir parejas de unión de ácidos nucleicos, p. ej., sondas y ARNm objetivo, de suficiente complementariedad para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo, mientras que es en general incompatible con la formación de parejas de unión entre miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. La expresión condiciones de ensayo restrictivas en general se refiere a la combinación de hibridación y condiciones de lavado.

Un "marcador" o un "resto detectable" en referencia a un ácido nucleico, se refiere a una composición que, cuando está unida a un ácido nucleico, hace al ácido nucleico detectable, por ejemplo, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, enzimas, biotina, digoxigenina, haptenos, y similares. Una "sonda de oligonucleótido o ácido nucleico marcada" en general es una que está unida, sea de forma covalente, por un conector o un enlace químico, o de forma con covalente, por enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals, atracciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, o enlaces de hidrógeno, a un marcador de modo que la presencia del ácido nucleico o sonda se puede detectar detectando la presencia del marcador unido al ácido nucleico o sonda.

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR", como se usa en la presente memoria en general se refiere a un procedimiento en donde se amplifican pequeñas cantidades de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.683.195 de Mullis. En general, la información de secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá debe estar disponible, de modo que se puedan diseñar cebadores oligonucleótidos; estos cebadores serán de secuencia idéntica o similar a las cadenas opuestas del molde que se va a amplificar. Los nucleótidos 5' terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, etc. Véase, en general Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989).

La expresión "número de ciclo" o "CT" cuando se usa en la presente memoria en referencia a métodos de PCR, se refiere al número de ciclo de la PCR al cual el nivel de fluorescencia pasa un nivel umbral fijado dado. La medición del CT se puede usar, por ejemplo, para aproximar niveles de ARNm en una muestra original. La medición del CT se usa a menudo en términos de "dCT" o la puntuación de "diferencia en el CT", cuando se resta el CT de un ácido nucleico del CT de otro ácido nucleico.

Como se usa en la presente memoria, y salvo que se indique de otra forma, la expresión "ópticamente puro" significa una composición que comprende un isómero óptico de un compuesto y está sustancialmente exenta de otros isómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral estará sustancialmente exenta del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición ópticamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales estará sustancialmente exenta del otro diastereoisómero del compuesto. Un compuesto ópticamente puro típico comprende más de aproximadamente 80% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 20% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 90% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 10% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 95% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 5% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 97% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 3% en peso de los otros enantiómeros del compuesto, y lo más preferiblemente más de aproximadamente 99% en peso de un enantiómero del compuesto y menos de aproximadamente 1% en peso de los otros enantiómeros del compuesto.

Como se usa en la presente memoria, y salvo que se indique otra cosa, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" abarca sales de adición de ácido y base no tóxicas del compuesto al que se refiere la expresión. Las sales de adición de ácido no tóxicas aceptables incluyen las derivadas de ácidos o bases orgánicos e inorgánicos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, ácido sórbico, ácido aconítico, ácido salicílico, ácido ftálico, ácido embólico ácido enántico, y similares.

Los compuestos que son de naturaleza ácida son capaces de formar sales con diferentes bases farmacéuticamente aceptables. Las bases que se pueden usar para preparar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos ácidos son las que forman sales de adición de base no tóxicas, es decir, sales que contienen cationes farmacológicamente aceptables tales como, pero no limitado a sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos y en particular las sales de calcio, magnesio, sodio o potasio. Las bases orgánicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumaina (N-metilglucamina), lisina y procaína.

Como se usa en la presente memoria y salvo que se indique otra cosa, el término "solvato" significa un compuesto proporcionado en la presente memoria o una de sus sales, que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

Como se usa en la presente memoria, y salvo que se indique de otra forma, la expresión "estereoisoméricamente pura" significa una composición que comprende un estereoisómero de un compuesto y está sustancialmente exenta de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por ejemplo, una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral estará sustancialmente exenta del enantiómero opuesto del compuesto. Una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene dos centros quirales estará sustancialmente exenta de otros diastereoisómeros del compuesto. Un compuesto estereoisoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente 80% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 20% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, más preferiblemente más de aproximadamente 90% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, incluso más preferiblemente más de aproximadamente 95% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, y lo más preferiblemente más de aproximadamente 97% en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3% en peso de los otros estereoisómeros del compuesto. Como se usa en la presente memoria y salvo que se indique otra cosa, la expresión "estereoisoméricamente enriquecida" significa una composición que comprende más de aproximadamente 60% en peso de un estereoisómero de un compuesto, preferiblemente más de aproximadamente 70% en peso, más preferiblemente más de aproximadamente 80% en peso de un estereoisómero de un compuesto. Como se usa en la presente memoria y salvo que se indique otra cosa, la expresión "enantioméricamente puro" significa una composición estereoisoméricamente pura de un compuesto que tiene un centro quiral. De forma similar, la expresión "estereoisoméricamente enriquecida" significa una composición estereoisoméricamente enriquecida de un compuesto que tiene un centro quiral.

Como se usa en la presente memoria y salvo que se indique otra cosa, el término "cocristal" significa una forma cristalina que contiene más de un compuesto en una red cristalina. Los cocristales incluyen complejos moleculares cristalinos de dos o más compuestos no volátiles unidos entre sí en una red cristalina por interacciones no iónicas. Como se usa en la presente memoria, los cocristales incluyen cocristales farmacéuticos en donde los complejos moleculares cristalinos contienen un compuesto terapéutico y uno o más compuestos no volátiles adicionales (denominado en la presente memoria contra-molécula(s)). Una contra-molécula en un cocristal farmacéutico típicamente es una molécula farmacéuticamente aceptable no tóxica, tal como, por ejemplo, aditivos alimentarios, conservantes, excipientes farmacéuticos, u otros API. En algunas realizaciones, los cocristales farmacéuticos potencian algunas propiedades fisicoquímicas de los fármacos (p. ej., solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y/o estabilidad), sin comprometer la integridad estructural química del principio activo farmacéutico (API). Véase, p. ej., Jones et al., "Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement," *MRS Bulletin*, 2006, 31, 875-879; Trask, "An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property," *Molecular Pharmaceutics*, 2007, 4(3), 301-309; Schultheiss y Newman, "Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties," *Crystal Growth & Design*, 2009, 9(6), 2950-2967; Shan y Zaworotko, "The Role of Cocrystals in Pharmaceutical Science," *Drug Discovery Today*, 2008, 13(9/10), 440-446; y Vishweshwar et al., "Pharmaceutical Co-Crystals," *J. Pharm. Sci.*, 2006, 95(3), 499-516.

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

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

En realizaciones adicionales, un "biomarcador" indica un cambio en el nivel de expresión de polipéptidos o proteínas que se pueden correlacionar con el riesgo, susceptibilidad al tratamiento o avance de una enfermedad. En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser un polipéptido o proteína, o uno de sus fragmentos. El nivel relativo de proteínas específicas se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos basados en anticuerpos, tales como un ensayo de inmunotransferencia, inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), u otros métodos.

Debe indicarse que si hay una discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado a esa estructura,

se le debe dar más peso a la estructura representada. Además, si la estereoquímica de una estructura o una parte de una estructura no está indicada, por ejemplo, con líneas en negrilla o de trazos, debe interpretarse que la estructura o parte de la estructura abarca todos sus estereoisómeros.

- 5 La práctica de las realizaciones proporcionadas en la presente memoria usará, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología e inmunología, que están dentro de la experiencia de los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican de forma completa en la bibliografía. Los ejemplos de textos particularmente adecuados para la consulta incluyen los siguientes: Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual* (2ª ed.); D.N Glover, ed. (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; M.J. Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Transcription and Translation*; R.I. Freshney, ed. (1986) *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Scopes (1987) *Protein Purification: Principles and Practice* (2ª ed.; Springer Verlag, N.Y.); y D.M. Weir y C. C. Blackwell, eds. (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV.

6.2 Métodos para evaluar la eficacia de un compuesto

- 15 La presente invención proporciona métodos para determinar si un compuesto es capaz de alterar la respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula de un sujeto con el compuesto in vitro; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (c) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto para alterar la respuesta inmunitaria en el sujeto.

En una realización, la primera célula es una célula mononuclear de sangre periférica, célula B, célula T, monocito o granulocito. En otra realización, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

- 25 La presente invención también proporciona métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad inflamatoria, que comprenden: (a) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en una primera muestra de un sujeto que tiene el cáncer o la enfermedad inflamatoria al que se le ha administrado un compuesto; y (b) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (a) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento del cáncer o la enfermedad inflamatoria.

- 30 En una realización, la primera muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama. En otra realización, la referencia se prepara usando: (i) una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra; o (ii) una segunda muestra obtenida de un sujeto sano que no tiene el cáncer o la enfermedad inflamatoria; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.

- 35 En algunas realizaciones, el cáncer o la enfermedad inflamatoria es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica.

- 40 En una realización, la determinación del nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a IKZF1 (Ikaros); (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a dicha IKZF1 (Ikaros), y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente de dicha IKZF1 (Ikaros) que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

- 45 En otra realización, la determinación del nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica dicha IKZF1 (Ikaros); y (iii) determinar el nivel de ARN de dicha IKZF1 (Ikaros) basado en la cantidad del ADN amplificado.

- 50 En una realización, el compuesto disminuye el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) en comparación con la referencia. En una realización particular, el compuesto es la talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables.

- 55 En otra realización, los métodos comprenden además determinar el nivel de IKZF3 (Aiolos).

En una realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para determinar si un compuesto es

inmunomodulador, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula con el compuesto; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de la proteína asociada a CRBN en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de la proteína asociada a CRBN de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto como un inmunomodulador. El contacto en la etapa (a) se lleva a cabo in vitro. En una realización, las células se ponen en contacto con el compuesto durante un periodo de tiempo, p. ej., de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días. En algunas realizaciones, las células son células mononucleares de sangre periférica, células B, células T, monocitos o granulocitos. En otras realizaciones, las células son células tumorales o de cáncer, p. ej., linfoma, mieloma o leucemia. En una realización, las células tumorales o de cáncer se obtienen de una línea celular.

En alguna realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente en la proteína asociada a CRBN que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de proteína asociada a CRBN basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica la proteína asociada a CRBN; y (iii) determinar el nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad del ADN amplificado.

En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

En otra realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o enfermedad inflamatoria, que comprenden: (a) administrar un compuesto a un sujeto que tiene el cáncer o enfermedad inflamatoria; (b) obtener una primera muestra del sujeto; (c) determinar el nivel de una proteína asociada a CRBN en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de la proteína asociada a CRBN de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento del cáncer o la enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, el cáncer es p. ej., un tumor sólido o cáncer de la sangre como se describe en la sección 5.2.3 más adelante, y la enfermedad inflamatoria es p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica, otras enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, o una enfermedad inflamatoria como se describe en la sección 2.2 anterior. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama.

En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a la proteína asociada a CRBN y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente en la proteína asociada a CRBN que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de proteína asociada a CRBN basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica la proteína asociada a CRBN; y (iii) determinar el nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad del ADN amplificado.

En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento de la enfermedad o trastorno si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra. En otra realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida de un

sujeto sano que no tiene la enfermedad o trastorno; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.

En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto es un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante. En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto inmunomodulador es talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocrystalos, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables. En una realización, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En otra realización, el compuesto aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia.

Los métodos proporcionados en la presente memoria se basan, en parte, en el descubrimiento de que el CRBN está asociado con las actividades antiproliferativas de algunos fármacos, tales como los compuestos proporcionados en la presente memoria. El CRBN o una proteína asociada a CRBN se pueden usar como biomarcadores para indicar la eficacia o avance del tratamiento de una enfermedad con un compuesto proporcionado en la presente memoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria son útiles para caracterizar un cáncer o enfermedad inflamatoria en un sujeto, antes, durante o después de que el sujeto reciba un tratamiento de un compuesto inmunomodulador (p. ej., un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante).

Sin querer estar limitados por una teoría particular, la unión de CRBN puede contribuir o incluso puede ser necesaria para las actividades antiproliferativas u otras de determinados compuestos, tales como los compuestos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados en la presente memoria se dirigen a CRBN o una o más proteínas asociadas a CRBN. En un aspecto descrito en la presente memoria, los compuestos proporcionados en la presente memoria se unen directamente a CRBN-DDB1 y/o el complejo de CRBN ubiquitina-ligasa E3. Las mutaciones en CRBN se podrían asociar con resistencia a los compuestos proporcionados en la presente memoria.

Por ejemplo, los niveles de CRBN eran significativamente menores en las células resistentes a pomalidomida de la línea DF15R y las células resistentes a lenalidomida, H929 R10-1, H929 R10-2, H929 R10-3, H929 R10-4 y MM1/R en comparación con las líneas originales emparejadas. Además, se encontró una mutación interesante en el gen de CRBN de una de las líneas de mieloma que tenía resistencia adquirida a la lenalidomida mientras que en la línea original el gen del CRBN era de tipo natural. Esta mutación se encuentra en el dominio de unión de DDB1 en el CRBN. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la sensibilidad de una célula de cáncer, p. ej., una célula de mieloma, o un paciente que tiene cáncer, a la terapia con un compuesto proporcionado en la presente memoria está relacionada con la expresión de CRBN.

En el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) en recaída o refractario, se vieron respuestas mayores en el subtipo similar a células B activadas (ABC) que en el subtipo de células B similares a las del centro germinal. Como se proporciona en la presente memoria usando líneas de células de DLBCL, se mostró que el tratamiento con lenalidomida suprimía con preferencia la proliferación de células de ABC-DLBCL *in vitro* y retrasaba el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor humano, con efecto mínimo en células no ABC-DLBCL. Este efecto tumoricida se asoció con la regulación por disminución del factor regulador de interferón 4 (IRF4), una característica de las células de ABC-DLBCL.

La inhibición de IRF4 por la lenalidomida causaba la regulación por disminución de la activación de NF- κ B dependiente del receptor de células B (BCR). Aunque el ARNip específico de IRF4 imita los efectos de la lenalidomida en la reducción de la activación de NF- κ B, la sobreexpresión de IRF4 potenciaba la activación de NF- κ B y confería resistencia a la lenalidomida. Además, la regulación por disminución de IRF4 inducida por lenalidomida requería la expresión de CRBN. Sin querer estar limitados por una teoría particular, estos datos muestran que la lenalidomida puede tener actividad antitumoral directa contra células de DLBCL, con preferencia células de ABC-DLBCL, bloqueando la expresión de IRPF4 y la ruta de señalización de BCR-NF- κ B de una forma dependiente de CRBN.

Se ha propuesto que la proteína CRBN funciona como un receptor de sustrato para los complejos de Cul4-E3-ligasa a través de su interacción con DDB1. Como se proporciona en la presente memoria, se ha investigado si la ubiquitinación *in vivo* está asociada con respuestas a fármacos en células de mieloma múltiple. En células H929, los compuestos proporcionados en la presente memoria disminuyen la poliubiquitinación ligada a K48 total pero no la ubiquitinación ligada a K-63 después de 30 minutos de tratamiento. Actualmente, se han descrito casi dos docenas de proteínas que son degradadas por la Cul4-DDB1 ligasa2. Varios estudios han mostrado ubiquitinación dependiente de CUI4-DDB1 de histonas del núcleo, proteínas de reparación de ADN, reguladores del ciclo celular y moléculas de rutas de señalización clave. La señalización de mTORC1 requiere la función proteasómica y la implicación de CUL4-DDB1 ubiquitina ligasa E3. Usando la tecnología de CST Ubiscan, se identificaron 162 ubiquitina-péptidos únicos que eran modulados significativamente por los compuestos proporcionados en la presente memoria después de tratamientos cortos (1 - 4 h). Las proteínas correspondientes participan en la función del nucleosoma y cromatina, ensamblaje de proteína-ADN e histona H2A. La importancia de esta modificación

temprana en el modo de acción de compuestos proporcionados en la presente memoria, y la relación con las actividades de CRBN y CUL4-DDB1 se están investigando.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria son útiles para evaluar la sensibilidad clínica y la respuesta del paciente al tratamiento de un compuesto inmunomodulador (p. ej., un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante). En una realización, el compuesto inmunomodulador proporcionado en la presente memoria regula (p. ej., regula por disminución o disminuye) CRBN o la proteína asociada a CRBN. En otro aspecto, el compuesto inmunomodulador proporcionado en la presente memoria se une directamente a CRBN-DDB1.

De acuerdo con el método de la presente invención, la proteína asociada a CRBN es IKZF1. Otras proteínas asociadas a CRBN descritas en la presente memoria son DDB1, DDB2, GSK3B, CUL4A, CUL4B, XBP-1, FAS1, RANBP6, DUS3L, PHGDH, AMPK, IRF4 o NFκB. Otros ejemplos para proteínas asociadas a CRBN son DDB1, PABPC1, HNRNPR, RPL19, SYNCRIP, H2AFX, HSPA8, ALDOA, HIST1H2AA, HSPA1A, XRCC6, RPL12, RPL18A, RPL4, HNRNPA2B1, HNRNPC, RPS2, SEC24C, RPL9, USP15, SEC24A, CTPS, ABCE1, EEF1A1, IPO5, CPSF6, KCNAB2, C7ORF42, SMC4, GNB3, H2AFZ, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E, ACTB, CSNK2A1, CRBN, DDX21, DHX9, DNAJC1, G3BP1, HSPA1B, IGF2BP2, RPL10A, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL3, RPL30, RPL7, RPL7A, RPLP1, RPLP2, MYH10, ILF3, NCL, RPS13, RPS16, RPS19, RPS6, SND1, EIF2S2, HNRNPH2, UBB, EEF1G, TBL1XR1, NACA, EIF4A1, FASN, PPAT, G3BP2, TUBA1A, UBAP2L, MCM2, UAP1, TUBA1C, EIF2S1, EIF3J, PRKDC, MCM7, RPL11, TUBA1B, STAT3, PTRH2, PABPC4, PTPRC, MACF1, UBE2O, DUT, GNB2L1, NUP88, H2AFJ, SEC23B, PDXK, ACLY, ARID1A, GBE1, HSPA9, DDX17, FUBP1, FBXO21, EWSR1, IFI16, YWHAE, UBA52, COPS6, GNAS, UBE2Q1, FERMT3, NAP1L2, TPD52, VAPA, EEF1A1L3, DDIT4, NEDD8, HIST1H1A, HIST1H1B, PC1, o la proteína 3 con dedos de zinc ikaros (IKZF3).

En un aspecto de la descripción la proteína asociada a CRBN es IKZF3 (también conocida como "Aiolos"). En un aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3 que tiene un peso molecular de proteína de 58 kDa. En un aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3 que tiene un peso molecular de proteína de 42 kDa. En otro aspecto de la descripción, los compuestos inmunomoduladores proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de IKZF3 (Aiolos) (p. ej., expresión de proteína). En otra realización, los compuestos inmunomoduladores proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de IL-2. En otro aspecto de la descripción, los IMiD proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica). En otro aspecto de la descripción, la pomalidomida regula por disminución la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica). En otro aspecto de la descripción, la lenalidomida regula por disminución la expresión de Aiolos (p. ej., expresión de proteína o génica).

IKZF3, también conocido como "Aiolos" es un miembro de la familia de Ikaros de proteínas con dedos de zinc. IKZF3 es un factor de transcripción específico hematopoyético implicado en la regulación del desarrollo de linfocitos (p. ej., proliferación y diferenciación de linfocitos B). El dominio de unión de ADN de IKZF3 reconoce el motivo central de GGGA. Se mostró que IKZF3 participa en el remodelado de la cromatina, regula miembros de la familia Bcl, se une a HDAC, mSin3, Mi-2 en células T y actúa como un represor transcripcional. Se ha mostrado que la interacción Aiolos-Foxp3 silencia la expresión de IL-2 en células T humanas.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, la proteína asociada a CRBN es IKZF1 (también conocida como "Ikaros"). En otra realización, los compuestos proporcionados en la presente memoria regulan por disminución la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica). En otra realización, el compuesto es pomalidomida y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es lenalidomida y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es la 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución. En otra realización, el compuesto es el estereoisómero (S) de la 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona y la expresión de Ikaros (p. ej., expresión de proteína o génica) es regulada por disminución.

En un aspecto, se describen en la presente memoria métodos para determinar si un compuesto es inmunomodulador, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula con el compuesto; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de Aiolos en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de Aiolos de la etapa (c) con el nivel de Aiolos obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto como un compuesto inmunomodulador. En algunos aspectos, el contacto en la etapa (a) se lleva a cabo in vitro. En otros aspectos, el contacto en la etapa (a) se lleva a cabo in vivo. En un aspecto, las células se ponen en contacto con el compuesto durante un periodo de tiempo, p. ej., de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días. En algunos aspectos, las células son células mononucleares de sangre periférica, células B, células T, monocitos o granulocitos. En otros aspectos, las células son células tumorales o de cáncer, p. ej., linfoma, mieloma o leucemia. En un aspecto, las células tumorales o de cáncer se obtienen de una línea celular.

En algunos aspectos de la descripción, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a Aiolos; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a Aiolos y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en Aiolos que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de Aiolos basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En algunos aspectos de la descripción, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica Aiolos; y (iii) determinar el nivel de ARN de Aiolos basado en la cantidad del ADN amplificado.

En algunos aspectos de la descripción, el compuesto es inmunomodulador si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Aiolos en comparación con la referencia. En algunos aspectos, el compuesto es inmunomodulador si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Aiolos en comparación con la referencia. En un aspecto, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, que comprenden: (a) administrar un compuesto a un sujeto que tiene la enfermedad o trastorno; (b) obtener una primera muestra del sujeto; (c) determinar el nivel de Aiolos en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de t Aiolos de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento de la enfermedad o trastorno. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es cáncer (p. ej., un tumor sólido o cáncer de la sangre como se describe en la sección 5.2.3 más adelante), o una enfermedad inflamatoria tal como lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica, otras enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, o una enfermedad inflamatoria como se describe en la sección 2.2 anterior. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica. En algunos aspectos, la muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama.

En cierto aspecto de la descripción, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a Aiolos; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a Aiolos y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en Aiolos que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de Aiolos basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En cierto aspecto de la descripción, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica Aiolos; y (iii) determinar el nivel de ARN de Aiolos basado en la cantidad del ADN amplificado.

En una realización, se proporcionan en la presente memoria métodos para determinar si un compuesto es inmunomodulador, que comprenden: (a) poner en contacto una primera célula con el compuesto in vitro; (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a); (c) determinar el nivel de Ikaros en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de Ikaros de la etapa (c) con el nivel de Ikaros obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto como un inmunomodulador. El contacto en la etapa (a) se lleva a cabo in vitro. En una realización, las células se ponen en contacto con el compuesto durante un periodo de tiempo, p. ej., de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 55 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas, o 2 o 3 o más días. En algunas realizaciones, las células son células mononucleares de sangre periférica, células B, células T, monocitos o granulocitos. En otras realizaciones, las células son células tumorales o de cáncer, p. ej., linfoma, mieloma o leucemia. En una realización, las células tumorales o de cáncer se obtienen de una línea celular.

En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a Ikaros; (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a Ikaros y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en Ikaros que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de Ikaros basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

En algunas realizaciones, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica Ikaros; y (iii) determinar el nivel de ARN de Ikaros basado en la cantidad del ADN amplificado.

5 En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es inmunomodulador si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda célula es del mismo tipo que la primera célula.

10 En otra realización, se describen en la presente memoria métodos para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o enfermedad inflamatoria, que comprenden: (a) administrar un compuesto a un sujeto que tiene la enfermedad o trastorno; (b) obtener una primera muestra del sujeto; (c) determinar el nivel de Ikaros en la primera muestra; y (d) comparar el nivel de Ikaros de la etapa (c) con el nivel de la misma proteína obtenido de una muestra de referencia, en donde un cambio en el nivel en comparación con el de referencia, es indicativo de la
15 eficacia del compuesto en el tratamiento de la enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, el cáncer es p. ej., un tumor sólido o cáncer de la sangre como se describe en la sección 5.2.3 más adelante, y la enfermedad inflamatoria es p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica, otras enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, o una enfermedad inflamatoria como se describe en la sección 2.2 anterior. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no
20 Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama.

En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra de la etapa (b) con un primer anticuerpo que se une inmuno-específicamente a Ikaros; (ii) poner en contacto las proteínas
25 unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a Ikaros y en donde el segundo anticuerpo se une inmuno-específicamente a un epítipo diferente en Ikaros que el primer anticuerpo; (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a las proteínas; y (iv) determinar la cantidad de Ikaros basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

30 En cierta realización, la etapa (c) comprende: (i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN; (ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica Ikaros; y (iii) determinar el nivel de ARN de Ikaros basado en la cantidad del ADN amplificado.

En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento del cáncer o enfermedad
35 inflamatoria si disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En algunas realizaciones, el compuesto es probablemente eficaz en el tratamiento del cáncer o enfermedad inflamatoria si aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En una realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra. En otra realización, la referencia se prepara usando una segunda muestra obtenida de un sujeto sano que no tiene el cáncer o enfermedad
40 inflamatoria; en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.

En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto es un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante. En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el compuesto inmunomodulador es talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-
45 4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)encil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables. En una realización, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En otra realización, el compuesto aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de la proteína asociada a CRBN en comparación con la referencia. En otra
50 realización, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En otra realización, el compuesto aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Ikaros en comparación con la referencia. En otros aspectos de la descripción, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Aiolos que tiene un peso molecular de proteína de 42 kDa en comparación con la referencia. En otro aspecto de la descripción, el compuesto aumenta el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Aiolos que tiene un
55 peso molecular de proteína de 42 kDa en comparación con la referencia. En otro aspecto de la descripción, el compuesto disminuye el nivel (p. ej., nivel de proteína o ARN) de Aiolos que tiene un peso molecular de proteína de 58 kDa en comparación con la referencia.

De acuerdo con la presente invención, la enfermedad o trastorno es cáncer o una enfermedad inflamatoria. En diferentes realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la enfermedad o trastorno es el
60 mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso

sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica.

6.2.1 Métodos de detección y cuantificación de cereblon o proteínas asociadas a cereblon

5 En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria métodos de detección y cuantificación del nivel de proteína de la proteína asociada a CRBN de una muestra biológica, que comprenden: (a) poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a la proteína asociada a CRBN; (b) poner en contacto la muestra unida al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a la proteína asociada a CRBN y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en la proteína asociada a CRBN que el primer anticuerpo; (c) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a la muestra; y (d) determinar el nivel de proteína de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

10 En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria métodos de detección y cuantificación del nivel de ARN (p. ej., ARNm) de la proteína asociada a CRBN de una muestra biológica, que comprenden: (a) obtener ARN de la muestra; (b) poner en contacto el ARN con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente a una secuencia en el ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria a dicho ARN; (c) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica la proteína asociada a CRBN; y (d) determinar el nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN basado en la cantidad del ADN amplificado.

20 De acuerdo con la presente invención, la proteína asociada a CRBN es IKZF1 (Ikaros). Otras proteínas asociadas a CRBN son DDB1, DDB2, GSK3B, CUL4A, CUL4B, XBP-1, FAS1, RANBP6, DUS3L, PHGDH, AMPK, IRF4 o NFκB. En otros aspectos de la descripción, la proteína asociada a CRBN es DDB1, PABPC1, HNRNPR, RPL19, SYNCRIP, H2AFX, HSPA8, ALDOA, HIST1H2AA, HSPA1A, XRCC6, RPL12, RPL18A, RPL4, HNRNPA2B1, HNRNPC, RPS2, SEC24C, RPL9, USP15, SEC24A, CTPS, ABCE1, EEF1A1, IPO5, CPSF6, KCNAB2, C7ORF42, SMC4, GNB3, H2AFZ, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E, ACTB, CSNK2A1, CRBN, DDX21, DHX9, DNAJC1, G3BP1, HSPA1B, IGF2BP2, RPL10A, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL3, RPL30, RPL7, RPL7A, RPLP1, RPLP2, MYH10, ILF3, NCL, RPS13, RPS16, RPS19, RPS6, SND1, EIF2S2, HNRNPH2, UBB, EEF1G, TBL1XR1, NACA, EIF4A1, FASN, PPAT, G3BP2, TUBA1A, UBAP2L, MCM2, UAP1, TUBA1C, EIF2S1, EIF3J, PRKDC, MCM7, RPL11, TUBA1B, STAT3, PTRH2, PABPC4, PTPRC, MAF1, UBE2O, DUT, GNB2L1, NUP88, H2AFJ, SEC23B, PDXK, ACLY, ARID1A, GBE1, HSPA9, DDX17, FUBP1, FBXO21, EWSR1, IFI16, YWHAE, UBA52, COPS6, GNAS, UBE2Q1, FERMT3, NAP1L2, TPD52, VAPA, EEF1A1L3, DDIT4, NEDD8, HIST1H1A, HIST1H1B, PCM1 o IKZF3. En otro aspecto de la descripción, la proteína asociada a CRBN es IKZF3.

30 En una realización, se proporcionan en la presente memoria métodos de detección y cuantificación del nivel de proteína de Ikaros de una muestra biológica, que comprenden: (a) poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a Ikaros; (b) poner en contacto la muestra unida al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a Ikaros y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en Ikaros que el primer anticuerpo; (c) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a la muestra; y (d) determinar el nivel de proteína de Ikaros basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.

40 En otra realización, se proporcionan en la presente memoria métodos de detección y cuantificación del nivel de ARN (p. ej., ARNm) de Ikaros de una muestra biológica, que comprenden: (a) obtener ARN de la muestra; (b) poner en contacto el ARN con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente a una secuencia en el ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria a dicho ARN; (c) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica Ikaros; y (d) determinar el nivel de ARN de Ikaros basado en la cantidad del ADN amplificado.

45 En algunas realizaciones de los diferentes métodos proporcionados en la presente memoria, las dos o más de las etapas se llevan a cabo de forma secuencial. En otras realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, dos o más de las etapas se llevan a cabo en paralelo (p. ej., al mismo tiempo).

50 Los ensayos de ejemplo proporcionados en la presente memoria para los métodos de detección y cuantificación del nivel de proteína de la proteína asociada a CRBN son inmunoensayos tales como análisis de transferencia Western y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (p. ej., un ELISA en sándwich). Un ensayo de ejemplo proporcionado en la presente memoria para los métodos de detección y cuantificación del nivel de ARN de la proteína asociada a CRBN es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), p. ej., PCR cuantitativa o qPCR.

6.2.2 Sujetos y muestras

55 En algunas realizaciones, los diferentes métodos proporcionados en la presente memoria usan muestras (p. ej., muestras biológicas) de sujetos o individuos (p. ej., pacientes). El sujeto puede ser un paciente, por ejemplo, un paciente con un cáncer de la sangre tal como mieloma múltiple, leucemia o un linfoma; inflamación o enfermedad mínima residual. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano. El sujeto puede ser hombre o mujer,

y puede ser un adulto, niño o bebé. Las muestras se pueden analizar en un tiempo durante una fase activa de una enfermedad o trastorno, o cuando una enfermedad o trastorno está inactivo. En algunas realizaciones, se puede obtener más de una muestra de un sujeto.

5 En algunas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende fluidos corporales de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre (p. ej., sangre entera periférica, sangre periférica), plasma sanguíneo, líquido amniótico, humos acuoso, bilis, cerumen, fluido de Cowper, líquido pre-eyaculatorio, quilo, quimo, eyaculado femenina, líquido intersticial, linfa, líquido menstrual, leche materna, moco, líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, lágrimas, orina, lubricación vaginal, vómito, agua, heces, fluidos corporales internos, incluyendo el líquido cefalorraquídeo que rodea el cerebro y la médula espinal, líquido sinovial que rodea las articulaciones óseas, líquido intracelular es el líquido dentro de las células, y humor vítreo los líquidos en el globo ocular. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. La muestra de sangre se puede obtener usando técnicas convencionales como se describe en, p. ej., Innis et al, editors, PCR Protocols (Academic Press, 1990). Los glóbulos blancos se pueden separar de muestras de sangre usando técnicas convencionales o kits disponibles en el comercio, p. ej., RosetteSep kit (Stein Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Las subpoblaciones de glóbulos blancos, p. ej., células mononucleares, células B, células T, monocitos, granulocitos o linfocitos, se pueden aislar además usando técnicas convencionales, p. ej., separación magnética de células activadas (MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, California) o separación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson, San Jose, California).

20 En una realización, la muestra de sangre es de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10,0 ml, de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 7 ml, de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,4 ml a aproximadamente 3,5 ml, o de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 3 ml. En otra realización, la muestra de sangre es aproximadamente de 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 ml.

25 En algunas realizaciones, la muestra usada en los presentes métodos comprende una biopsia (p. ej., una biopsia tumoral). La biopsia puede ser de cualquier órgano o tejido, por ejemplo, piel, hígado, pulmón, corazón, colon, riñón, médula ósea, dientes, ganglios linfáticos, cabello, bazo, cerebro, senos u otros órganos. Se puede usar cualquier técnica de biopsia conocida por los expertos en la técnica para aislar una muestra de un sujeto, por ejemplo, biopsia abierta, biopsia cerrada, biopsia central, biopsia por incisión, biopsia por escisión o biopsia por aspiración con aguja fina.

30 En una realización, la muestra usada en los métodos proporcionados en la presente memoria se obtiene del sujeto antes de que el sujeto reciba un tratamiento para la enfermedad o trastorno. En otra realización, la muestra se obtiene del sujeto mientras el sujeto está recibiendo un tratamiento para la enfermedad o trastorno. En otra realización, la muestra se obtiene del sujeto después de que el sujeto esté recibiendo un tratamiento para la enfermedad o trastorno. En diferentes realizaciones, el tratamiento comprende administrar un compuesto (p. ej., un compuesto proporcionado en la sección 5.3 más adelante) al sujeto.

6.2.3 Tipos de células

40 En algunas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en la presente memoria comprende una pluralidad de células. Dichas células pueden incluir cualquier tipo de células, p. ej., citoblastos, células sanguíneas (p. ej., células mononucleares de sangre periférica), linfocitos, células B, células T, monocitos, granulocitos, células inmunitarias o células tumorales o de cáncer. Las células tumorales o de cáncer o un tejido tumoral, tal como una biopsia de tumor o un explante de tumor. Las células T (linfocitos T) incluyen, por ejemplo, células T auxiliares (células T efectoras o células Th), células T citotóxicas (CTL), células T de memoria y células T reguladoras. En una realización, las células usadas en los métodos proporcionados en la presente memoria son células T CD3⁺, p. ej., detectadas por citometría de flujo. El número de células T usado en los métodos puede estar en el intervalo desde una sola célula a aproximadamente 10⁹ células. Las células B (linfocitos B) incluyen, por ejemplo, células B plasmáticas, células B de memoria, células B1, células B2, células B de zona marginal, y células B foliculares. Las células B pueden expresar inmunoglobulinas (anticuerpos, receptor de células B). En una realización, las células usadas en los métodos proporcionados en la presente memoria son células B CD20⁺, p. ej., detectadas por citometría de flujo.

50 Las poblaciones de células específicas se pueden obtener usando una combinación de anticuerpos disponibles en el mercado (p. ej., Quest Diagnostic (San Juan Capistrano, Calif.); Dako (Dinamarca)).

55 Las células en los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden obtener de una línea celular. En algunas realizaciones, la línea celular es la línea celular resistente a la pomalidomida DF15R. En otras realizaciones, la línea celular es la línea celular H929 R10-1, H929 R10-2, H929 R10-3, H929 R10-4 o MM1/R resistente a la lenalidomida. En algunas realizaciones, la línea celular usada en los métodos proporcionados en la presente memoria es una línea celular de linfoma. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular de leucemia. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular de ABC-DLBCL (linfoma difuso de células B grandes similar a células B activadas, por ejemplo, la línea celular U2932. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular de GCC-DLBCL (linfoma difuso de células B grandes de células B similares a las del centro germinal,

- por ejemplo, la línea celular OCI-LY19 o WSU-DLBCL2. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular de MCL, por ejemplo, la línea celular Rec-1, Mino, JeKo-1 o GRanta-519. En algunas realizaciones, la línea celular es una línea celular de MCL, por ejemplo, la línea celular U266. En una realización, la línea celular es la línea celular U2932, OCI-LY19, WSU-DLBCL2, Rec-1, Mino, JeKo-1, GRanta-519 o U266. En otra realización la línea celular de tumor o cáncer es una línea celular del cáncer de la sangre o tumor sólido descrito más adelante. En otra realización, el tejido tumoral es de un individuo que tiene un cáncer, por ejemplo, un tumor sólido o un cáncer de la sangre.
- En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de la sangre. En una realización, el cáncer de la sangre es mieloma múltiple. En otra realización, el cáncer de la sangre es leucemia linfocítica crónica (CLL). En otra realización, el cáncer de la sangre es linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). En otra realización, el cáncer de la sangre es el síndrome mielodisplásico, una leucemia aguda, p. ej., leucemia de células T aguda, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda de precursora de células B, leucemia linfoblástica aguda de precursora de células T, leucemia de Burkitt (linfoma de Burkitt) o leucemia bifenotípica aguda; una leucemia crónica, p. ej., linfoma mieloide crónico, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica crónica, linfoma linfocítico pequeño o leucemia prolinfocítica de células B; linfoma de células pilosas; leucemia prolinfocítica de células T; o un linfoma, p. ej., linfoma histiocítico, linfoma linfoplasmocítico (p. ej., macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de la zona marginal esplénica, neoplasia de células plasmáticas (p. ej., mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, una enfermedad por depósito de inmunoglobulinas monoclonales o una enfermedad por cadenas pesadas), linfoma extranodal de zona marginal de células B (linfoma MALT), linfoma nodal de zona marginal de células B (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia de células NK agresivas, leucemia/linfoma de células T del adulto, linfoma extranodal de células T/NK, tipo nasal, linfoma de células T de tipo enteropatía, linfoma de células T hepatoesplénico, linfoma de células NK blástico, micosis fungoide (síndrome de Sezary), un trastorno linfoproliferativo de células T CD30-positivo cutáneo primario (p. ej., linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes o papulosis linfomatoide), linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma periférico de células T, no especificado, linfoma anaplásico de células grandes, un linfoma de Hodgkin o un linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular.
- En otras realizaciones, el cáncer es un tumor sólido, p. ej., un carcinoma, tal como un adenocarcinoma, un carcinoma corticosuprarrenal, un adenocarcinoma de colon, un adenocarcinoma colorrectal, un carcinoma colorrectal, un carcinoma de células ductales, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de tiroides, un carcinoma nasofaríngeo, un melanoma (p. ej., un melanoma maligno), un carcinoma de piel no melanoma o un carcinoma no especificado; un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas redondas; un tumor endocrino; un sarcoma de Ewing; un tumor de células germinales (p. ej., cáncer testicular, cáncer de ovario, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, germinoma, etc.); un hepatosblastoma; un carcinoma hepatocelular; un neuroblastoma; un sarcoma de tejido blando no rhabdomyosarcoma; un osteosarcoma; un retinoblastoma; un rhabdomyosarcoma; o un tumor de Wilms. En otra realización, el tumor sólido es cáncer pancreático o cáncer de mama. En otras realizaciones, el tumor sólido es un neuroma acústico; un astrocitoma (p. ej., un astrocitoma pilocítico de grado I, un astrocitoma de bajo grado de grado II, un astrocitoma anaplásico de grado III o un glioblastoma multiforme de grado IV); un cordoma; un craneofaringioma; un glioma (p. ej., un glioma de tronco encefálico; un ependimoma; un glioma mixto; un glioma del nervio óptico; o un subependimoma); un glioblastoma; un meduloblastoma; un meningioma; un tumor cerebral metastásico; un oligodendroglioma; un pineoblastoma; un tumor hipofisario; un tumor neuroectodérmico primitivo; o un schwannoma. En otra realización, el cáncer es cáncer de próstata.
- En algunas realizaciones, las células tumorales son células de línea celular tumoral. En otras realizaciones, las células tumorales son citoblastos tumorales o citoblastos cancerosos. En una realización, las células tumorales son células de mesotelioma, células de melanoma, células de adenoma, células de carcinoma, células de adenocarcinoma, células de carcinoma ductal, células de leucemia, células de leucemia mielógena aguda, células de leucemia mieloide aguda, células de leucemia aguda de células T, células de leucemia linfoblástica aguda, células de leucemia de células pilosas, células de leucemia promielocítica aguda, células de linfoma no Hodgkin, células de linfoma de Burkitt, células de leucemia linfocítica crónica de células B, células de linfoma no Hodgkin, células de linfoma de Hodgkin o células de mieloma múltiple. células de rhabdomyosarcoma, células de osteosarcoma, células de neuroblastoma, células de astrocitoma o células de glioblastoma. En otra realización, la línea celular tumoral es 5637 (Carcinoma), KHOS/NP (Osteosarcoma), MNNG/HOS (Osteosarcoma), Saos-2 (Osteosarcoma), U-2 OS (Osteosarcoma), SJSA-1 (Osteosarcoma), CCF-STTG1 (Astrocitoma), DBTRG-05MG (Glioblastoma), U87 MG (Glioblastoma), T98G (Glioblastoma), SK-N-SH (Neuroblastoma), SK-N-AS (Neuroblastoma), MCF-7 (Adenocarcinoma), MDA-MB-231 (Adenocarcinoma), MDA-MB-436 (Adenocarcinoma), SK-BR-3 (Adenocarcinoma), BT-20 (Carcinoma), BT-474 (Carcinoma), CAMA-1 (Carcinoma), HCC2218 (Carcinoma), SW527 (Carcinoma), MDA-MB-453 (Carcinoma), MDA-MB-435S (Carcinoma), T-47D (Carcinoma), ZR-75-1 (Carcinoma), UACC-812 (Carcinoma), HCC1419 (Carcinoma), HeLa (Adenocarcinoma), Caco-2 (Adenocarcinoma), COLO205 (Adenocarcinoma), COLO320/DM (Adenocarcinoma), DLD-1 (Adenocarcinoma), HCT-15 (Adenocarcinoma), SK-CO-1 (Adenocarcinoma), SW48 (Adenocarcinoma), SW480 (Adenocarcinoma), HCT-8 (Adenocarcinoma), RKO (Carcinoma), LS411N (Carcinoma), T84 (Carcinoma), AGS (Adenocarcinoma), KATO III (Carcinoma), NCI-N87

(Carcinoma), SNU-16 (Carcinoma), 769-P (Adenocarcinoma), 786-0 (Adenocarcinoma), ACHN (Adenocarcinoma), A-498 (Carcinoma), Caki-1 (Carcinoma), G-402 (Leiomioblastoma), CML-T1 (Leucemia), CTV-1 (Leucemia), JVM-2 (Leucemia), K562 (Leucemia), MHH-CALL2 (Leucemia), NALM-6 (Leucemia), 8E5 (Leucemia), CCRF-SB (Leucemia), CEM/C1 (Leucemia), CEM/C2 (Leucemia), CEM-CM3 (Leucemia), CCRF-HSB-2 (Leucemia), KG-1 (Leucemia), KG-1a (Leucemia), CCRF-CEM (Leucemia), MOLT-3 (Leucemia), SUP-B15 (Leucemia), TALL-104 (Leucemia), Loucy (Leucemia), RS4;11 (Leucemia), REH (Leucemia), AML-193 (Leucemia), THP-1 (Leucemia), MOLM-13 (Leucemia), Kasumi-1 (Leucemia), Kasumi-3 (Leucemia), BDCM (Leucemia), HL-60 (Leucemia), I 2.1 (Leucemia), I 9.2 (Leucemia), J.gam1.WT (Leucemia), J.RT3-T3.5 (Leucemia), P116 (Leucemia), P116.cl39 [P116.c39] (Leucemia), D1.1 (Leucemia), J45.01 (Leucemia), MV-4-11 (Leucemia), Kasumi-4 (Leucemia), MEG-01 (Leucemia), KU812 (Leucemia), Mo (Leucemia), JM1 (Leucemia), GDM-1 (Leucemia), CESS (Leucemia), ARH-77 (Leucemia), SK-HEP-1 (Adenocarcinoma), Bel-7402 (Carcinoma), Bel-7404 (Carcinoma), HEP-3B (Carcinoma), HepG2 (Carcinoma), Calu-3 (Adenocarcinoma), NCI-H1395 (Adenocarcinoma), NCI-H1975 (Adenocarcinoma), SK-LU-1 (Adenocarcinoma), NCI-H2122 (Adenocarcinoma), NCI-H727 (Carcinoide), A-427 (Carcinoma), A549 (Carcinoma), SW1573 (Carcinoma), NCI-H358 (Carcinoma), NCI-H460 (Carcinoma), NCI-H292 (Carcinoma), NCI-H82 (Carcinoma), NCI-H226 (Carcinoma), NCI-H526 (Carcinoma), o MSTO-211H (Mesotelioma).

En algunas realizaciones, la muestra usada en los métodos proporcionados en la presente memoria es de un tejido enfermo, p. ej., de un individuo que tiene cáncer, inflamación o una enfermedad o trastorno hematopoyético. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido o cáncer de la sangre, como se ha descrito antes. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno hematopoyético es hemoglobinopatía, inmunodeficiencia o enfermedad mínima residual. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria son útiles para detectar el reordenamiento de genes en células de un individuo sano. En algunas realizaciones, el número de células usado en los métodos proporcionados en la presente memoria puede estar en el intervalo desde una sola célula a aproximadamente 10^9 células. En algunas realizaciones, el número de células usado en los métodos proporcionados en la presente memoria es aproximadamente 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 o 5×10^8 .

El número y tipo de células recogidas de un sujeto se puede vigilar, por ejemplo, midiendo cambios en la morfología y marcadores de superficie celular usando técnicas de detección celular convencionales tales como citometría de flujo, separación celular, inmunocitoquímica (p. ej., tinción con anticuerpos específicos de tejido o específicos de marcador celular) separación de células activadas por fluorescencia (FACS), separación magnética de células activadas (MACS), por examen de la morfología de las células usando microscopía óptica o confocal, y/o por medición de cambios en la expresión de genes usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como PCR y perfil de expresión de genes. Estas técnicas se pueden usar también para identificar células que son positivas para uno o más marcadores particulares. La separación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método muy conocido para la separación de partículas, incluyendo células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas (Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151:150-165). La excitación por láser de restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. En una realización, los anticuerpos o ligandos específicos de marcador de superficie celular están marcados con diferentes marcadores fluorescentes. Las células son procesadas por el separador celular, permitiendo la separación de células basada en su capacidad para unirse a los anticuerpos usados. Las partículas separadas por FACS se pueden depositar directamente en pocillos individuales de placas de 96 pocillos o 384 pocillos para facilitar la separación y clonación.

En algunas realizaciones, se usan subconjuntos de células en los métodos proporcionados en la presente memoria. Los métodos para separar y aislar poblaciones específicas de células son bien conocidos en la técnica y se pueden basar en el tamaño celular, morfología, o marcadores intracelulares o extracelulares. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a citometría de flujo, separación por flujo, FACS, separación basada en perlas tales como separación magnética de células, separación basada en tamaño (p. ej., un tamiz, un conjunto de obstáculos o un filtro), separación en un dispositivo de microfluidos, separación basada en anticuerpos, sedimentación, adsorción por afinidad, extracción por afinidad, centrifugación por gradiente de densidad, microdissección por captura láser, etc.

En una realización, el ARN (p. ej., ARNm) o proteína se purifica del tumor y se mide la presencia o ausencia de un biomarcador por análisis de la expresión de genes o proteínas. En algunas realizaciones, se mide la presencia o ausencia de un biomarcador por PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), micromatrices, citometría de flujo o inmunofluorescencia. En otras realizaciones, la presencia o ausencia de un biomarcador se mide por metodologías basadas en ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otros métodos similares conocidos en la técnica.

6.2.4 Métodos de detección de niveles de ARNm en una muestra

Se conocen en la técnica varios métodos de detección o cuantificación de los niveles de ARNm. Los métodos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a transferencias Northern, ensayos de protección de ribonucleasas, métodos basados en PCR, y similares. Se puede usar la secuencia de ARNm, p. ej., el ARNm de CRBN o proteínas asociadas a CRBN, o un fragmento de la misma, para preparar una sonda que el al menos parcialmente complementaria. Después la sonda se puede usar para detectar la secuencia de ARNm en una muestra, usando cualquier ensayo adecuado, tal como métodos basados en PCR, transferencia Northern, un ensayo de tiras

reactivas, y similares.

En otras realizaciones, se puede preparar un ensayo de ácidos nucleicos para determinar la actividad inmunomoduladora en una muestra biológica. Un ensayo contiene típicamente un soporte sólido y al menos un ácido nucleico en contacto con el soporte, donde el ácido nucleico corresponde a al menos una parte de un ARNm que tiene expresión alterada durante un tratamiento inmunomodulador en un paciente, tal como el ARNm de CRBN o proteínas asociadas a CRBN. El ensayo también puede tener medios para detectar la expresión alterada del ARNm en la muestra.

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

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

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

En algunas realizaciones, las secuencias de ARNm comprenden desde IKZF1 o un fragmento del mismo. En otros aspectos, las secuencias de ARNm comprenden al menos un ARNm seleccionado del grupo que consiste en el ARNm de DDB1, PABPC1, HNRNPR, RPL19, SYNCRIP, H2AFX, HSPA8, ALDOA, HIST1H2AA, HSPA1A, XRCC6, RPL12, RPL18A, RPL4, HNRNPA2B1, HNRNPC, RPS2, SEC24C, RPL9, USP15, SEC24A, CTPS, ABCE1, EEF1A1, IPO5, CPSF6, KCNAB2, C7ORF42, SMC4, GNB3, H2AFZ, HIST1H1C, HIST1H1D, HIST1H1E, ACTB, CSNK2A1, CRBN, DDX21, DHX9, DNAJC1, G3BP1, HSPA1B, IGF2BP2, RPL10A, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL21, RPL3, RPL30, RPL7, RPL7A, RPLP1, RPLP2, MYH10, ILF3, NCL, RPS13, RPS16, RPS19, RPS6, SND1, EIF2S2, HNRNPH2, UBB, EEF1G, TBL1XR1, NACA, EIF4A1, FASN, PPAT, G3BP2, TUBA1A, UBAP2L, MCM2, UAP1, TUBA1C, EIF2S1, EIF3J, PRKDC, MCM7, RPL11, TUBA1B, STAT3, PTRH2, PABPC4, PTPRC, MACF1, UBE2O, DUT, GNB2L1, NUP88, H2AFJ, SEC23B, PDXK, ACLY, ARID1A, GBE1, HSPA9, DDX17, FUBP1, FBXO21, EWSR1, IF116, YWHAE, UBA52, COPS6, GNAS, UBE2Q1, FERMT3, NAP1L2, TPD52, VAPA, EEF1A1L3, DDIT4, NEDD8, HIST1H1A, HIST1H1B, PCM1 o IKZF3, o un fragmento de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en sitios localizables, específicos en un soporte sólido; correspondiendo cada uno a al menos una parte de las secuencias de ARNm que son expresadas de forma diferencial tras el tratamiento con un compuesto inmunomodulador en una célula o paciente.

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

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

La hibridación se lleva a cabo típicamente en condiciones de hibridación restrictivas. Las técnicas de hibridación convencionales (p. ej., en condiciones suficiente para proporcionar la unión específica de los ARNm objetivo en la muestra con las sondas) se describen en Kallioniemi et al., *Science* 258:818-821 (1992) y el documento WO 93/18186. Están disponibles varias guías de técnicas generales, p. ej., Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Partes I y II (Elsevier, Amsterdam 1993). Para descripciones de técnicas adecuadas para las hibridaciones in situ, véase, Gall et al. *Meth. Enzymol.*, 21:470-480 (1981); y Angerer et al. en *Genetic Engineering: Principles and Methods* (Setlow and Hollaender, Eds.) Vol 7, páginas 43-65 (Plenum Press, New York 1985). La selección de condiciones adecuadas, que incluyen temperatura, concentración salina, concentración de polinucleótidos, tiempo de hibridación, restricción de las condiciones de lavado, y similares, dependerá del diseño experimental, que incluye la fuente de la muestra, identidad de agentes de captura, grado de complementariedad esperado, etc., y se puede determinar como un tema de experimentación rutinaria para los expertos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

6.2.5 Métodos de detección de niveles de polipéptidos y proteínas en una muestra

Se pueden usar varios métodos de detección y cuantificación de proteínas para medir el nivel de CRBN o proteínas asociadas a CRBN. Se puede usar cualquier método de cuantificación de proteínas adecuado. En algunas realizaciones, se usan métodos basados en anticuerpo. Los métodos de ejemplo que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoensayo de absorción ligado a enzimas (ELISA), inmunohistoquímica, citometría de flujo, matriz de perlas citométricas, espectroscopía de masas, y similares. Se usan habitualmente varios tipos de ELISA, que incluyen ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA en sándwich.

6.3 Compuestos

Los compuestos para los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a los compuestos inmunomoduladores, que incluyen compuestos conocidos como "IMiD®" (Celgene Corporation), un grupo de compuestos que pueden ser útiles para tratar varios tipos de enfermedades humanas, incluyendo algunos cánceres.

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

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

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

25 Además, sin estar limitado por la teoría, los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria también pueden ser potentes coestimuladoras de células T y aumentar la proliferación celular de forma notable de una forma dependiente de la dosis. Los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria también pueden tener un efecto coestimulador mayor en el subconjunto de células T CD8+ que en el subconjunto de células T CD4+. Además, los compuestos pueden tener propiedades antiinflamatorias contra respuestas de células mieloides, ya que estimulan eficazmente a las células T para producir mayores cantidades de IL-2, IFN- γ , y para potenciar la proliferación de células T y actividad citotóxica de células T CD8+. Además, sin querer estar limitados por una teoría particular, los compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria pueden ser capaces de actuar tanto indirectamente a través de la activación de citoquinas como directamente en las células citolíticas naturales ("NK") y células T citolíticas naturales ("NKT") y aumentar la capacidad de las células NK para producir citoquinas beneficiosas tales como, pero no limitadas a IFN- γ , y potenciar la actividad citotóxica de las células NK y NKT.

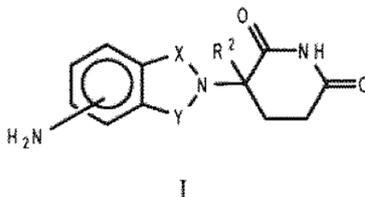
Los ejemplos específicos de compuestos inmunomoduladores incluyen derivados de ciano y carboxi de estirenos sustituidos tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 5.929.117; 1-oxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidin-3-il)isoindolinas y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxo-3-fluoropiperidina-3-il)isoindolinas tales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

55 Varios compuestos inmunomoduladores descritos en la presente memoria contienen uno o más centros quirales, y pueden existir como mezclas racémicas de enantiómeros o mezclas de diastereoisómeros. Por lo tanto, se proporciona también en la presente memoria el uso de formas estereoisoméricamente puras de dichos compuestos, así como el uso de mezclas de esas formas. Por ejemplo, se pueden usar mezclas que comprenden cantidades iguales o no de los enantiómeros de un compuesto inmunomodulador particular. Estos isómeros se pueden sintetizar de forma asimétrica o se pueden resolver usando técnicas convencionales tales como columnas quirales o agentes de resolución quirales. Véase, p. ej., Jacques, J., et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H., et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E. L., *Stereochemistry of*

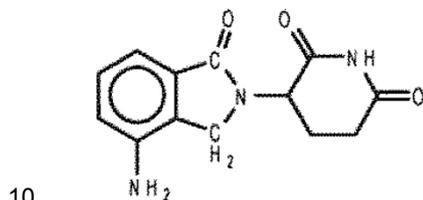
Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S. H., *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* pág. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972).

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

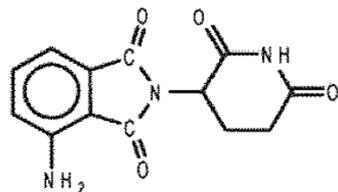
Estos compuestos tienen la estructura I:



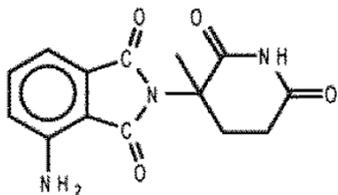
en la que uno de X e Y es C=O, el otro de X e Y es C=O o CH₂, y R² es hidrógeno o alquilo inferior, en particular metilo. Los compuestos inmunomoduladores específicos incluyen, pero no se limitan a:



10 1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina;



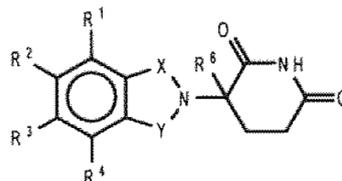
1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindolina; y



1,3-dioxo-2-(3-metil-2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-aminoisoindol, y sus isómeros ópticamente puros.

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

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



en la que:

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

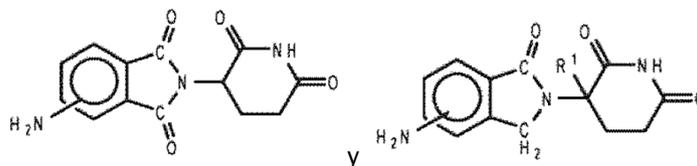
(i) cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono o (ii) uno de R¹, R², R³ y R⁴ es -NHR⁵ y el resto de R¹, R², R³ y R⁴ son hidrógeno;

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

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

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

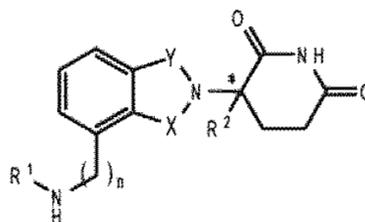
5 Los compuestos representativos de esta clase son de fórmulas:



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

10 Otros compuestos inmunomoduladores específicos más descritos en la presente memoria pertenecen a una clase de isoindol-imidas descritas en la patente de EE.UU. n° 7.091.353, publicación de patente de EE.UU. n° 2003/0045552 y solicitud internacional n° PCT/US01/50401 (publicación internacional n° WO 02/059106).

Compuestos representativos son de fórmula II:



II

15 y sus sales, hidratos, solvatos, clatratos, enantiómeros, diastereoisómeros, racematos y mezclas de estereoisómeros, farmacéuticamente aceptables, en donde:

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

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

20 R² es H, F, bencilo, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈) o alquino(C₂-C₈);

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

25 R⁴ es alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), alquil(C₁-C₄)-OR⁵, bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-(C₁-C₆)-heterocicloalquilo o alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅);

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

cada caso de R⁶ es independientemente H, alquilo(C₁-C₈), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, heteroarilo(C₂-C₅) o alquil(C₀-C₈)-C(O)OR⁵ o los grupos R⁶ se pueden unir para formar un grupo heterocicloalquilo;

n es 0 o 1; y

30 * representa un centro quiral de carbono.

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

R² es H o alquilo(C₁-C₈); y

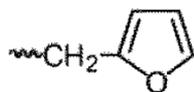
35 R³ es alquilo(C₁-C₈), cicloalquilo(C₃-C₇), alqueno(C₂-C₈), alquino(C₂-C₈), bencilo, arilo, alquil(C₀-C₄)-

heterocicloalquilo(C₁-C₆), alquil(C₀-C₄)-heteroarilo(C₂-C₅), alquil(C₅-C₈)-N(R⁶)₂; alquil(C₀-C₈)-NH-C(O)O-R⁵; alquil(C₁-C₈)-OR⁵, alquil(C₁-C₈)-C(O)OR⁵, alquil(C₁-C₈)-O(CO)R⁵ o C(O)OR⁵; y las otras variables tienen las mismas definiciones.

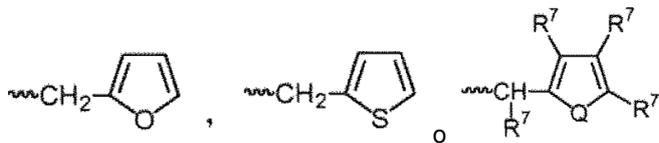
En otros compuestos específicos de fórmula II, R² es H o alquilo(C₁-C₄).

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

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es H, alquilo(C₁-C₈), bencilo, CH₂OCH₃, CH₂CH₂OCH₃, o



En otra realización de los compuestos de fórmula II, R¹ es



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

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

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

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

En otros compuestos específicos de fórmula II, R¹ es C(O)OR⁴.

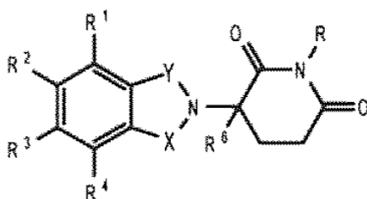
- 20 En otros compuestos específicos de fórmula II, el H de C(O)NHC(O) se puede sustituir por alquilo(C₁-C₄), arilo o bencilo.

Ejemplos adicionales de los compuestos en esta clase incluyen, pero no se limitan a: [2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil]-amida; éster de *tert*-butilo del ácido (2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-carbámico; 4-(aminometil)-2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-isoindolina-1,3-diona; N-(2-(2,6-dioxo-piperidin-3-il)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1H-isoindol-4-ilmetil)-acetamida;

- 25 N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)ciclopropil-carboxamida; 2-cloro-N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)acetamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-3-piridilcarboxamida; 3-{1-oxo-4-(bencilamino)isoindolin-2-il}piperidina-2,6-diona; 2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-4-(bencilamino)isoindolina-1,3-diona; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)propanamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)heptanamida; N-((2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)metil)2-furilcarboxamida; acetato de {N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)carbamoil}metilo; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)pentanamida; N-(2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il)-2-tienilcarboxamida; N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil](butilamino)carboxamida; N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil](octilamino)carboxamida; y N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil](bencilamino)carboxamida.

- 30 N-[[2-(2,6-dioxo(3-piperidil))-1,3-dioxoisoindolin-4-il]metil](bencilamino)carboxamida.

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



III

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

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

5 R es H o CH₂OCOR';

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

R⁵ es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 carbonos;

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

R' es R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

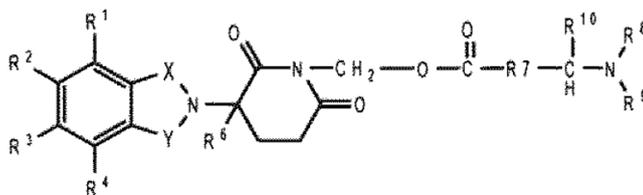
R⁷ es m-fenileno o p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en el que n tiene un valor de 0 a 4;

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

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

* representa un centro quiral de carbono.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



20 en donde:

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

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

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

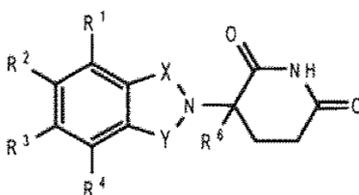
R⁶ es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, benzo, cloro o fluoro;

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

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

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

Otros compuestos representativos son de fórmula:



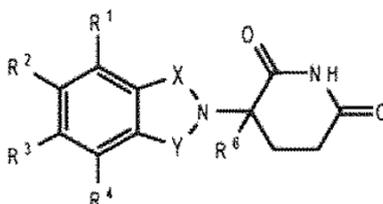
en la que:

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

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

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

Otros compuestos representativos son de fórmula:



- 10 en la que:

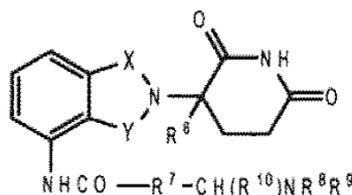
uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

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

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

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

Ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



en la que:

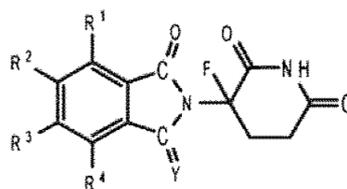
- 20 uno de X e Y es C=O y el otro de X e Y es C=O o CH₂;

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

R⁷ es m-fenileno, p-fenileno o -(C_nH_{2n})- en el que n tiene un valor de 0 a 4; cada uno de R⁸ y R⁹ considerado independientemente del otro es hidrógeno o alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, o R⁸ y R⁹ considerados juntos son tetrametileno, pentametileno, hexametileno, o -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂- en el que X¹ es -O-, -S- o -NH-; y

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

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

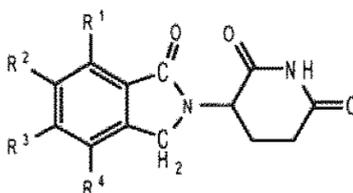


en donde:

Y es oxígeno o H₂ y

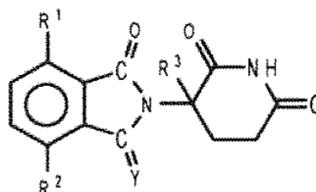
- 5 cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, o amino.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos son las 2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1-oxoisoindolinas tetrasustituídas descritas en la patente de EE.UU. n° 5.798.368. Compuestos representativos son de fórmula:



- 10 en donde cada uno de R¹, R², R³ y R⁴, independientemente de los otros, es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos son 1-oxo y 1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)isoindolinas descritas en la patente de EE.UU. n° 6.403.613. Compuestos representativos son de fórmula:



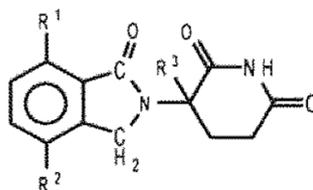
en la que:

- 15 Y es oxígeno o H₂,

un primero de R¹ y R² es halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano o carbamoilo, el segundo de R¹ y R², independientemente del primero, es hidrógeno, halógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, ciano o carbamoilo, y

R³ es hidrógeno, alquilo o bencilo.

- 20 Ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



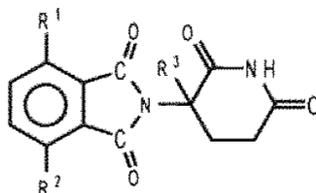
en donde:

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

R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o bencilo. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a

1-oxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-4-metilisoindolina.

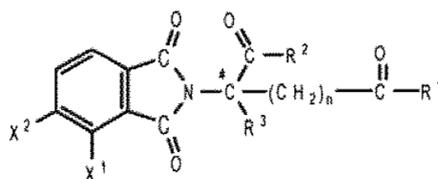
Otros compuestos representativos son de fórmula:



en donde:

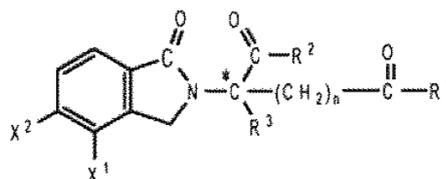
- 5 un primero de R¹ y R² es halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano o carbamoilo; el segundo de R¹ y R², independientemente del primero es hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 4 átomos de carbono, alquilamino en el que el alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, dialquilamino en el que cada alquilo es de 1 a 4 átomos de carbono, ciano o carbamoilo; y
- 10 R³ es hidrógeno, alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o bencilo.

Otros compuestos inmunomoduladores específicos descritos en la presente memoria son 1-oxo y 1,3-dioxoisoindolinas sustituidas en la posición 4 o 5 del anillo de indolina, descritas patente de EE.UU. n° 6.380.239 y patente de EE.UU. n° 7.244.759. Compuestos representativos son de fórmula:



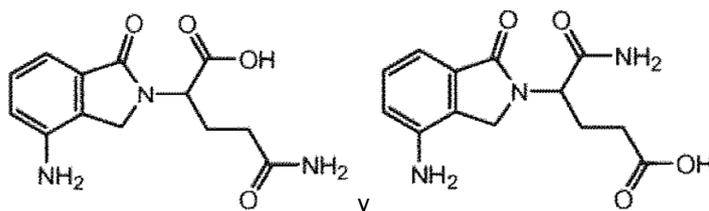
- 15 en la que el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad (cuando n no es cero y R¹ no es igual a R²); uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independiente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es hidrógeno, alquilo de uno a seis carbonos, halógeno o halogenoalquilo; Z es hidrógeno, arilo, alquilo de uno a seis carbonos, formilo o acilo de uno a seis carbonos; y n tiene un valor de 0, 1 o 2; con la condición de que si X¹ es amino, y n es 1 o 2, entonces R¹ y R² no son ambos hidroxilo; y sus sales.
- 20

Compuestos representativos adicionales son de fórmula:



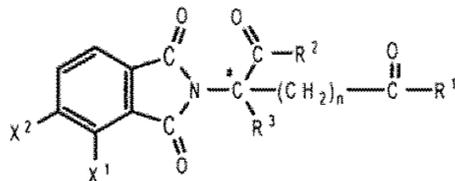
- 25 en la que el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independiente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo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

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



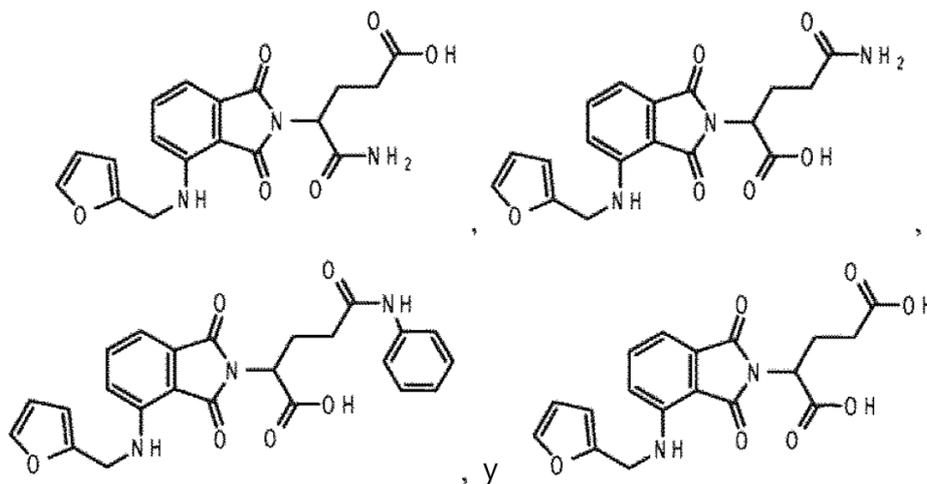
30

Otros compuestos representativos son de fórmula:

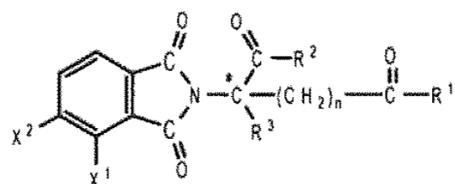


- 5 en el que el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad cuando n no es cero y R¹ no es R²; uno de X¹ y X² es amino, nitro, alquilo de uno a seis carbonos, o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno; cada uno de R¹ y R² independiente del otro, es hidroxilo o NH-Z; R³ es alquilo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

- 10 Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a ácido 4-carbamoil-4-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 4-carbamoil-2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-butírico, ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-4-fenilcarbamoil-butírico y ácido 2-{4-[(furan-2-il-metil)-amino]-1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il}-pentanodioico, que tienen las siguientes estructuras, respectivamente, y sus sales, solvatos, profármacos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables:

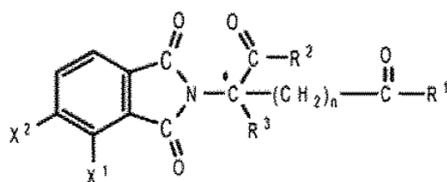


Otros ejemplos específicos de los compuestos son de fórmula:



- 15 en donde:
 uno de X¹ y X² es nitro o NH-Z, y el otro de X¹ o X² es hidrógeno;
 cada uno de R¹ y R², independiente del otro, es hidroxilo o NH-Z;
 R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno o hidrógeno;
 Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y
 20 n tiene un valor de 0, 1 o 2; y
 si -COR² y -(CH₂)_nCOR¹ son diferentes, el átomo de carbono designado C* constituye un centro de quiralidad.

Otros compuestos representativos son de fórmula:



en donde:

uno de X¹ y X² es alquilo de uno a seis carbonos;

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

5 R³ es alquilo de uno a seis carbonos, halógeno o hidrógeno;

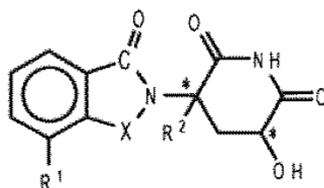
Z es hidrógeno, fenilo, un acilo de uno a seis carbonos, o un alquilo de uno a seis carbonos; y

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

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

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

Compuestos representativos son de fórmula:



en donde:

los átomos de carbono designados * constituyen centros de quiralidad;

15 X es -C(O)- o -CH₂-;

R¹ es alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o -NHR³;

R² es hidrógeno, alquilo de 1 a 8 átomos de carbono o halógeno; y

R³ es hidrógeno,

20 alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, sustituido o no sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

25 bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o -COR⁴ en el que

R⁴ es hidrógeno,

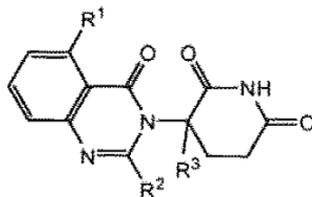
alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, no sustituido o sustituido con alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono,

cicloalquilo de 3 a 18 átomos de carbono,

30 fenilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono, o

bencilo, no sustituido o sustituido con alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, alcoxi de 1 a 8 átomos de carbono, halógeno, amino o alquilamino de 1 a 4 átomos de carbono.

Otros compuestos específicos proporcionados en la presente memoria son de fórmula:



y sus sales, solvatos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables, en donde:

- 5 R¹ es: hidrógeno; halógeno; -(CH₂)_nOH; alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; alcoxi(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o

-(CH₂)_nNHR^a, en donde R^a es:

hidrógeno;

alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

-(CH₂)_n-(arilo de 6 a 10 miembros);

- 10 -C(O)-(CH₂)_n-(arilo de 6 a 10 miembros) o -C(O)-(CH₂)_n-(heteroarilo de 6 a 10 miembros), en donde el arilo o heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más de: halógeno; -SCF₃; alquilo(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o alcoxi(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

-C(O)-alquilo(C₁-C₈), en donde el alquilo está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

- 15 -C(O)-(CH₂)_n-(cicloalquilo-C₃-C₁₀);

-C(O)-(CH₂)_n-NR^bR^c, en donde R^b y R^c son cada uno independientemente:

hidrógeno;

alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

alcoxi(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o

- 20 arilo de 6 a 10 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más de: halógenos; alquilo(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o alcoxi(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

-C(O)-(CH₂)_n-O-alquilo(C₁-C₆); o

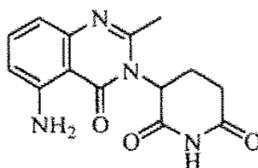
-C(O)-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n-(arilo de 6 a 10 miembros);

- 25 R² es: hidrógeno; -(CH₂)_nOH; fenilo; -O-alquilo(C₁-C₆); o alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

R³ es: hidrógeno; o alquilo(C₁-C₆), opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; y

n es 0, 1 o 2.

- 30 Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona ("Compuesto A"), que tiene la siguiente estructura:

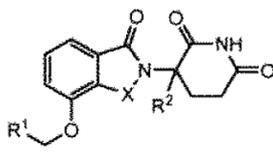


A

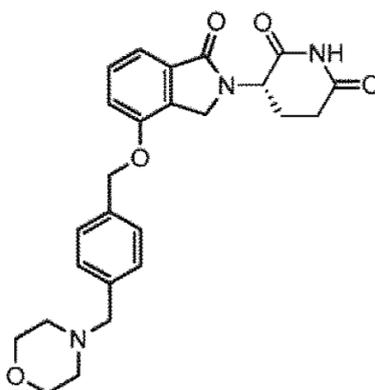
o un enantiómero o una mezcla de sus enantiómeros; o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocrisales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables.

El compuesto A se puede preparar de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos proporcionados en la presente memoria o como se describe en la patente de EE.UU. nº 7.635.700. El compuesto también se puede sintetizar de acuerdo con otros métodos evidentes para los expertos en la técnica, basándose en la enseñanza de la presente memoria. En algunas realizaciones, el compuesto A está en una forma cristalina descrita en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/451.806, presentada el 11 de marzo de 2011. En algunas realizaciones, se usa la sal de hidrocloreuro del compuesto A en los métodos proporcionados en la presente memoria. Los métodos de tratamiento, prevención y/o atención integral del cáncer y otras enfermedades usando el compuesto A se describen en la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/451.995, presentada el 11 de marzo de 2011.

Otros compuestos específicos proporcionados en la presente memoria son de fórmula:



- o una de sus sales, solvatos o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables, en donde:
- X es C=O o CH₂;
- R¹ es -Y-R³;
- R² es H o alquilo(C₁-C₆);
- Y es: arilo, heteroarilo o heterociclo de 6 a 10 miembros, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o un enlace;
- R³ es: -(CH₂)_n-arilo, -O-(CH₂)_n-arilo o -(CH₂)_n-O-arilo, en donde el arilo está opcionalmente sustituido con uno o más: alquilo(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; alcoxi(C₁-C₆), él mismo sustituido con uno o más halógenos; oxo; amino; carboxilo; ciano; hidroxilo; halógeno; deuterio; arilo o heteroarilo de 6 a 10 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo(C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆) o halógeno; -CONH₂; o -COO-alquilo(C₁-C₆), en donde el alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;
- (CH₂)_n-heterociclo, -O-(CH₂)_n-heterociclo o -(CH₂)_n-O-heterociclo, en donde el heterociclo está opcionalmente sustituido con uno o más: alquilo(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; alcoxi(C₁-C₆), él mismo sustituido con uno o más halógenos; oxo; amino; carboxilo; ciano; hidroxilo; halógeno; deuterio; arilo o heteroarilo de 6 a 10 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo(C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆) o halógeno; -CONH₂; o -COO-alquilo(C₁-C₆), en donde el alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; o
- (CH₂)_n-heteroarilo, -O-(CH₂)_n-heteroarilo o -(CH₂)_n-O-heteroarilo, en donde el heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más: alquilo(C₁-C₆), él mismo opcionalmente sustituido con uno o más halógenos; alcoxi(C₁-C₆), él mismo sustituido con uno o más halógenos; oxo; amino; carboxilo; ciano; hidroxilo; halógeno; deuterio; arilo o heteroarilo de 6 a 10 miembros, opcionalmente sustituido con uno o más alquilo(C₁-C₆), alcoxi(C₁-C₆) o halógeno; -CONH₂; o -COO-alquilo(C₁-C₆), en donde el alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;
- y
- n es 0, 1, 2 o 3.
- Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona. En una realización, se proporciona en la presente memoria el estereoisómero (S) de la 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona ("compuesto B") p. ej., para usar en los métodos descritos en la presente memoria. La 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisindolin-2-il)piperidina-2,6-diona racémica y métodos para su preparación, se han descrito en la publicación de patente de EE.UU. nº 2011/0196150. El compuesto B tiene la siguiente estructura:



B

5 Todos los compuestos descritos se pueden adquirir en el mercado o se pueden preparar de acuerdo con los métodos descritos en las patentes o publicaciones de patentes descritas en la presente memoria. Además, los compuestos ópticamente puros se pueden sintetizar de forma asimétrica o resolver usando agentes de resolución conocidos o columnas quirales, así como otras técnicas de química orgánica sintética convencionales. Se puede encontrar información adicional sobre compuestos inmunomoduladores, su preparación y uso, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° US20060188475, US20060205787 y US20070049618.

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

Debe indicarse que si hay una discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado a esa estructura, se le debe dar más peso a la estructura representada. Además, si la estereoquímica de una estructura o una parte de una estructura no está indicada, por ejemplo, con líneas en negrilla o de trazos, debe interpretarse que la estructura o parte de la estructura abarca todos sus estereoisómeros.

15 6.4 Kits

También están contemplados kits y composiciones para llevar a cabo los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria kits útiles para determinar la eficacia de un compuesto inmunomodulador. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria kits útiles para determinar si un compuesto es inmunomodulador. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria kits útiles para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria kits útiles para determinar el efecto de un compuesto inmunomodulador. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria kits útiles para predecir la verosimilitud de un tratamiento eficaz del linfoma, leucemia, mieloma múltiple, un tumor sólido, linfoma no Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del manto, linfoma folicular, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, síndrome mielodisplásico o melanoma, o para la vigilancia de la eficacia de un tratamiento con uno o más compuestos (p. ej., fármacos). El kit comprende un soporte sólido, y un medio para detectar la expresión de proteínas de al menos un biomarcador en una muestra biológica. Dicho kit puede usar, por ejemplo, una tira reactiva, una membrana, un chip, un disco, una tira de ensayo, un filtro, una microesfera, un portaobjetos, una placa de múltiples pocillos o una fibra óptica. El soporte sólido del kit puede ser, por ejemplo, un plástico, silicio, un metal, una resina, vidrio, una membrana, una partícula, un precipitado, un gel, un polímero, una lámina, una esfera, un polisacárido, un capilar, una película, una placa o un portaobjetos. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un tejido oral, tejido gastrointestinal, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico, una muestra de sangre, una muestra de orina o una muestra de piel. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una biopsia de ganglio linfático, una biopsia de médula ósea, o una muestra de células tumorales de sangre periférica.

En otra realización, el kit comprende un soporte sólido, ácidos nucleicos en contacto con el soporte, donde los ácidos nucleicos son complementarios en al menos 20, 50, 100, 200, 350, o más bases del ARNm, y un medio para detectar la expresión del ARNm en una muestra biológica.

40 En algunas realizaciones, los kits proporcionados en la presente memoria usan medios para detectar la expresión de un biomarcador por PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR), micromatrices, citometría de flujo o inmunofluorescencia. En otras realizaciones, la expresión de un biomarcador se mide por metodologías basadas en ELISA u otros métodos similares conocidos en la técnica.

En otras realizaciones más, los kits proporcionados en la presente memoria son útiles para predecir la verosimilitud de un tratamiento eficaz de una enfermedad o trastorno seleccionado de lupus eritematoso sistémico, vasculitis

inducida por ANCA, glomerulonefritis, granulomatosis de Wegener aguda, miastenia grave, síndrome de Sjogren, síndrome antifosfolipídico, artritis reumatoide y afecciones fibróticas tales como la esclerosis sistémica.

5 En una realización, un kit proporcionado en la presente memoria comprende un compuesto proporcionado en la presente memoria, o una de sus sales, solvatos o hidratos farmacéuticamente aceptables. Los kits pueden comprender además agentes activos adicionales, que incluyen, pero no se limitan a los descritos en la presente memoria.

Los kits proporcionados en la presente memoria pueden comprender además dispositivos que se usan para administrar los principios activos. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen, pero no se limitan a jeringas, bolsas de goteo, parches e inhaladores.

10 Los kits pueden comprender además células o sangre para trasplante, así como vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar para administrar uno o más principios activos. Por ejemplo, si un principio activo se proporciona en una forma sólida que se debe reconstituir para la administración parenteral, el kit puede comprender un recipiente herméticamente cerrado de un vehículo adecuado en el que se puede disolver el principio activo para formar una solución estéril sin partículas que es adecuada para la administración parenteral. Los ejemplos de
15 vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a: agua para inyección USP; vehículos acuosos tales como, pero no limitados a inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de Dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo,
20 miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

En algunas realizaciones de los métodos y kits proporcionado en la presente memoria, se usan soportes en fase sólida para purificar proteínas, marcar muestras o llevar a cabo ensayos en fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas adecuadas para llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria incluyen perlas, partículas, coloides, superficies individuales, tubos, placas de múltiples pocillos, placas de microvaloración, portaobjetos,
25 membranas, geles y electrodos. Cuando la fase sólida es un material en partículas (p. ej., perlas), en una realización se distribuye en los pocillos de placas de múltiples pocillos para permitir el procesamiento en paralelo de los soportes en fase sólida.

Hay que indicar que también está contemplada cualquier combinación de las realizaciones citadas antes, por ejemplo, con respecto a uno o más reactivos, tal como, sin limitación, cebadores de ácidos nucleicos, soporte sólido
30 y similares, en relación con cualquiera de los diferentes métodos y/o kits proporcionado en la presente memoria.

7 Ejemplos

Algunas realizaciones de la invención se ilustran mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

7.1 Procedimientos

7.1.1 Conjugación y ensayo de anticuerpo contra Aiolos

35 Este ejemplo demuestra la conjugación de anticuerpos contra Aiolos con Alexa Fluor 647 usada en algunas realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria y el ensayo de los anticuerpos conjugados. Brevemente, se conjugan directamente anticuerpos policlonales de conejo contra Aiolos 0-21 (SantaCruz Cat. n° sc-101982) u otros anticuerpos poli o monoclonales, con Alexa Fluor 647 y después se determina la especificidad en una línea celular de control positivo (sangre periférica) y negativo. Las células se fijan mediante tampón de lisis/fijación de BD seguido de tampón I de Perm BD. La especificidad de los anticuerpos se lleva a cabo con y sin
40 compuestos de ensayo.

Primero, se conjugan 100 µg de anticuerpos purificados con un exceso molar de 5 (EM) y EM de 10 de Alexa Fluor 647 para determinar las condiciones de conjugación óptimas. La especificidad después de conjugación se determina incubando 0,5 µg de cada anticuerpo de ensayo conjugado y purificado con un bloqueador peptídico específico por separado. Células de sangre entera normal (control positivo) y células HEK-293 (control negativo) se procesan y se tiñen con los anticuerpos conjugados y purificados (con y sin bloqueadores) por separado. Se revelan los reactivos purificados con anticuerpo secundario anti-Alexa Fluor 647 de especie adecuado. Se determinan la relación de señal a ruido y el porcentaje de fluorescencia específica. Si la relación de señal a ruido y el porcentaje de fluorescencia específica para los anticuerpos conjuntados y los anticuerpos purificados son comparables, entonces se determina
45 la relación molar óptima de colorante fluorescente y anticuerpo. El resto de los anticuerpos purificados se conjugan en la relación molar óptima. La valoración completa de los anticuerpos conjugados para determinar la saturación se lleva a cabo en células de sangre entera normal tratada o sin tratar con compuestos de ensayo.

7.1.2 Determinación de la fijación para células

Propósito: Determinar un método óptimo para la detección de todos los marcadores de interés mientras se mantiene
55 la expresión del marcador de superficie en las PBMC. Las PBMC o sangre entera reciente de donante normal se

tratan con un vehículo de control o compuesto B 1 micromolar durante 2 horas y después se procesan, a continuación. También se usan MM-BMMC no tratadas.

5 PBMC congeladas (control y tratadas), sangre entera reciente de donante normal (control y tratada) y MM-BMMC congeladas (solo sin tratar) se descongelan y después se fijan mediante uno de los siguientes métodos de fijación/permeabilización: (1) Lisis/fijación BD + tampón I Perm; (2) Lisis/fijación BD + tampón II Perm; o (3) fijador Esoterix patentado.

7.1.3 Estabilidad del ensayo

10 Se examina la estabilidad de las muestras de sangre entera reciente de donante normal. Se extraen cinco (5) muestras de sangre entera de donante normal (solo expresión basal) y se fijan por el método determinado por el ejemplo previo. Las muestras fijadas se dividen en dos partes alícuotas. Una parte alícuota se pone a 4°C 1 hora y otra se pone a -20°C durante 1 hora. Estas muestras se ensayan inmediatamente (día 0). Las alícuotas restantes se almacenan a 4°C o -20°C y se ensayan después de 1 día ex vivo, 2 días ex vivo y 3 días ex vivo.

Se analiza la variabilidad biológica de las muestras mediante análisis de la diferencia basal de Aiolos en sangre entera normal de 5 donantes diferentes.

15 7.1.4 Reproducibilidad intraensayo y precisión entre técnicos

20 Para determinar la repetibilidad de los ensayos, las mismas 5 muestras de SEN (sangre entera normal) ensayadas respecto a la estabilidad antes, se ensayan por triplicado en un tiempo de medición. Estas muestras se ensayaron por triplicado el día 0, muestras preparadas a 4°C. Para el ensayo de la precisión entre técnicos, un segundo técnico procesó las mismas muestras un segundo día. El análisis incluye los niveles de expresión cuantitativos de Aiolos en la población de linfocitos CD19+ a, CD3+ y CD45+ total y en (dado en MEFL). Se calculan la media, desviación estándar y % de CV entre repeticiones y entre técnicos.

7.1.5 Determinación de Aiolos por análisis de FACS en líneas celulares y PBMC

Este ejemplo demuestra la determinación de Aiolos en líneas celulares y PBMC usando análisis de FACS.

25 Materiales: Tampón de fijación I BD (cat. nº 55870); tampón Perm III BD (cat. nº 558050); tampón de tinción BD (cat. nº 554657); anticuerpo anti-IKZF3 (Santa Cruz lote nº B1612) y anticuerpo secundario (de cabra anti-Ig de conejo FITC BD cat. nº 554020).

Procedimiento de ensayo

30 El tampón de fijación I se calentó a 37°C en un incubador o baño de agua antes de usar. El tampón Perm III se enfrió en un refrigerador a -20°C antes de usar. Las células se recogieron al final del tratamiento con compuestos de ensayo. Se mezcló un volumen del tampón de fijación I precalentado con un volumen de suspensión celular. Si el volumen de la suspensión celular era mayor de 100 µl, las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en 100 µl de medio o PBS. El tampón y la suspensión celular se mezclaron bien y se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 10 min. Las células se centrifugaron a 250 x g durante 10 min y se aspiró el líquido sobrenadante. Las células se lavaron una vez con tampón de tinción BD. El sedimento se centrifugó y se separó el líquido sobrenadante. Las células se agitaron con vórtice para que se soltaran, y se permeabilizaron mediante la adición lenta de tampón Perm III frío mientras se agitaban con vórtice o se mezclaban. Posteriormente, las células se incubaron sobre hielo durante 30 min. Después las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón de tinción. El líquido sobrenadante se centrifugó y se aspiró. Las células se volvieron a suspender en un volumen pequeño de tampón de tinción (50 o 100 µl que contenían de 200.000 a 1 millón de células). Se añadió anticuerpo anti-IKFZ3 a la suspensión celular con una dilución 1:1000 y se incubó durante 45 min a 4°C. Después las células se centrifugaron y se lavaron una vez con tampón de tinción. Se añadió el anticuerpo secundario a las células con una dilución 1:5000 y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en la oscuridad. Las células se lavaron una vez con tampón de tinción antes del análisis por FACS.

7.1.6 Procedimiento para el procesamiento de sangre de macaco cangrejero para el análisis de proteínas y ARNm

45 La sangre de macaco cangrejero (*M. fascicularis*) tiene aproximadamente 10 millones (10x10⁶) de células mononucleares (PBMC) por 2,5 ml de sangre entera (según el protocolo de Non Human Primate Reagent Source, Boston). Después de aislar las PBMC de la sangre de macaco cangrejero, se dividieron en partes alícuotas aproximadamente 7x10⁶ células para el análisis de proteínas, mientras que se usaron 3x10⁶ células para el análisis de ARNm.

50 Procesamiento de PBMC para el análisis de proteínas

Las siguientes etapas se llevaron a cabo sobre hielo y cualquier centrifugación se llevó a cabo en una centrifuga refrigerada a 4°C. Primero se preparó tampón de lisis RIPA (Pierce, cat. nº 89900) por adición de 10 µl de inhibidores de proteinasa (Pierce, cat. nº 78443) a 1 ml de tampón RIPA. Posteriormente, las PBMC se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. Las PBMC después se lisaron con 0,25 ml

de tampón de lisis RIPA. Las PBMC se pusieron sobre hielo durante 30 minutos y se agitaron con vórtice cada 10 minutos. Después los lisados se congelaron y almacenaron a -80°C para el procesamiento posterior.

5 Los lisados se pusieron en un tubo QIAshredder (QIAGEN, cat. n° 79656) y se centrifugaron durante 30 s, velocidad máxima (13200 rpm) en una centrifuga de sobremesa Eppendorf (Modelo 5415 R). Después el lisado se transfirió a un tubo Eppendorf transparente de 1,5 ml y se centrifugó durante 10 min a la velocidad máxima. El líquido sobrenadante se recogió sin alterar el sedimento de restos celulares. El líquido sobrenadante se congeló en hielo seco y se almacenó a -80°C antes del análisis.

10 La concentración de proteínas en el líquido sobrenadante se midió usando el ensayo de BCA y el rendimiento de proteínas esperado era aproximadamente 0,5-5 µg/µl, o 125-1250 µg total. Se cargaron aproximadamente ≥10 µg de proteína por banda para la transferencia Western (IRF4, IKZF3, etc.) usando anticuerpos contra las proteínas humanas.

Procesamiento de PBMC para el análisis de ARNm

15 Las PBMC se lisaron en 0,35 ml de tampón RLT (Qiagen cat. n° 79216) y se agitaron con vórtice hasta homogeneidad. Los lisados se congelaron y almacenaron a -20°C hasta el procesamiento posterior. Los lisados se descongelaron a temperatura ambiente. El ARN se aisló usando el Mini kit Rneasy de Qiagen (cat. n° 74104) manual o usando QIAcube. Las concentraciones de ARN se obtuvieron con Nanodrop. El ARN necesario para la preparación del ADNc era aproximadamente 500-1000 ng de ARN en un volumen total de aproximadamente 38,5 µl.

20 La preparación del ADNc se hizo primero preparando una disolución de mezcla primaria de reactivos de transcripción inversa Tagman (Applied Biosys n° N808-0234). Se añadieron 61,5 µl de la mezcla primaria a los 38,5 µl de ARN (volumen total = 100 µl). El ARN/mezcla primaria se puso inmediatamente en el ciclador térmico.

25 La preparación de la placa de qRT-PCR de IRF4, BLIMP-1, BCL-6, IgJ etc. usando el ADNc ADNc de macaco cangrejero y cebadores específicos de secuencia de macaco cangrejero se llevó a cabo preparando primero la mezcla primaria Tagman, agua y ensayo de expresión génica de Tagman. Se añadieron 5 µl de muestra de ADNc por triplicado en la placa. Se añadieron 45 µl de mezcla primaria. La placa se centrifugó y se puso en la RT-PCR para una ejecución.

7.1.7 Muestreo PD en el estudio de pauta posológica en primates no humanos de compuesto B

30 Como se representa en la figura 4, el estudio en macacos cangrejeros se dividió en dos fases. Fase I (7 días de administración oral del artículo de ensayo, hidrocloreuro del compuesto B) seguido de periodo de 28 días sin artículo de ensayo y finalmente fase II (28 días de administración oral del artículo de ensayo). El objetivo de la fase I de este estudio era determinar el inicio y duración del efecto farmacodinámico del compuesto B. El objetivo de la fase II de este estudio era explorar la relación de los efectos farmacodinámicos y la seguridad/tolerabilidad del compuesto B. Además, se determinaron las características toxicocinéticas del compuesto B. Las dosis del compuesto B ensayado eran 0,75 mg/kg QD, cada dos días, o 4 días si, 3 días no. Los artículos de ensayo y control se administraron a los animales adecuados mediante alimentación por sonda los días 1 a 7 para la fase 1 y los días 1 a 28 en la fase II siguiendo las pautas posológicas descritas antes. La fase I y la fase II estaban separadas por al menos una sesión sin dosis de 28 días. El volumen de dosis para cada animal se basaba en la medición de peso corporal más reciente. Se insertó una sonda naso/bucogástrica a través de la fosa nasal (nasogástrico) o a través de la boca (bucogástrico) y se avanzó al esófago inferior hasta el estómago. Los animales se sujetaron temporalmente (p. ej., de forma manual) para la administración de la dosis, y no se sedaron. Se usaron jeringas y sondas 40 naso/bucogástricas estériles desechables para cada animal/dosis. A cada dosis le siguió un lavado de descarga de agua corriente de aproximadamente 5 ml. Las formulaciones de las dosis se agitaron continuamente durante la administración de la dosis. Los subconjuntos de células mononucleares de sangre periférica analizados por citometría de flujo eran: CD45⁺/CD3⁺/CD20⁺/CD16⁺, CD45⁺/CD20⁺, CD45⁺/CD3⁺, CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺, CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺, CD45⁺/CD3⁺/CD16⁺, CD45⁺/CD3⁺/CD14⁺. Las titulaciones de anticuerpo anti-KLH se ensayaron 45 por ELISA (figura 5).

Se midieron los niveles de proteínas de Aiolos/IKZF3 en las células mononucleares de sangre periférica como sigue. La sangre de macaco cangrejero (*M. fascicularis*) tenía aproximadamente 10 millones (10x10⁶) de células mononucleares (PBMC) por 2,5 ml de sangre entera (según el protocolo de Non Human Primate Reagent Source, Boston). Después de aislar las PBMC de macaco, cada muestra se dividió en dos porciones: 7x10⁶ células para el análisis de proteínas y 3x10⁶ células para el análisis de ARNm. Todas las etapas se hicieron sobre hielo, toda 50 centrifugación en una centrifuga refrigerada a 4°C. Se preparó tampón de lisis RIPA (Pierce, cat. n° 89900) por adición de 10 µl de inhibidores de proteinasa (Pierce, cat. n° 78443) a 1 ml de tampón RIPA. Las PBMC se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo. Se añadió tampón de lisis (uso de 0,25 ml de tampón de lisis RIPA por 7x10⁶ PBMC). El tubo se puso sobre hielo durante 30 minutos, se agitó con vórtice 55 cada 10 min. El lisado se congeló y se almacenó a -80°C hasta el análisis. El lisado se puso en un tubo QIAshredder (QIAGEN, cat. n° 79656) y se centrifugó 30 s a la velocidad máxima (13200 rpm) en una centrifuga de sobremesa Eppendorf (Modelo 5415 R). El lisado se transfirió a un tubo Eppendorf transparente de 1,5 ml y se centrifugó 10 min a la velocidad máxima (los tubos de la colección QIAshredder son de color lechoso y es difícil ver el sedimento de

restos celulares, por ello la transferencia a tubos nuevos). El líquido sobrenadante se recogió sin alterar el sedimento de restos celulares (el reactivo RIPA permite la extracción de proteínas de membrana, nucleares y citoplasmáticas que permanecerán en el líquido sobrenadante). El lisado de proteínas se congeló sobre hielo seco y se almacenó a -80°C hasta el análisis. La concentración de proteínas se midió usando el ensayo BCA. Se esperaba que el rendimiento de proteínas fuera 0,5-5 µg/µl, o 125-1250 µg total. Se cargaron ≥ 10 µg de proteínas por banda para la transferencia Western para IKZF3/Aiolos usando anticuerpos contra las proteínas humanas.

7.1.8 Transferencias Western de células U266, DF15 B y T

Las células U266 se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU.). Las células DF15 se obtuvieron de John Shaughnessy (University of Arkansas, Little Rock, AR, EE.UU.). Las células B CD19+ se adquirieron en HemaCare BioResearch Products (Van Nuys, CA). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Cellgro, Manassas, VA) que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (V/V) (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) complementado con glutamina 2 mM. Células U266 y DF15 (8×10^5 /pocillo) o células B (4×10^5 células/pocillo) se sembraron en placa en placas de 6 pocillos y se trataron con lenalidomida o pomalidomida durante diferentes tiempos y concentraciones. Se aislaron células T primarias de leucocitos humanos (Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ) por centrifugación a través de Ficoll siguiendo el protocolo de "RosetteSep" (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Las células T purificadas se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (Ebioscience, San Diego, CA) y se trataron con lenalidomida o pomalidomida durante diferentes tiempos y concentraciones. Se trataron con dexametasona (Sigma, St. Louis, MO), melfalán (Sigma, St. Louis, MO) y bortezomib (Selleck Chemicals, Houston, TX) durante 6 horas. La concentración final en DMSO es 0,1%. Las células se trataron previamente con MG-132 10 µM (Calbiochem Biochemicals, Billerica, MA) durante 30 minutos antes de la adición de fármaco. Las células se recogieron, se lavaron en PBS y los lisados celulares se separaron en geles de SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA). Las membranas se inmunotransfirieron con anticuerpos anti-Aiolos (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-Ikaros (Millipore, Billerica, MA) y anti-Actina (Sigma, St. Louis, MO; o LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) y anticuerpos secundarios (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Las transferencias se analizaron en el dispositivo Odyssey imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

7.1.9 Métodos de experimentos con cicloheximida

Se sembraron en placa dos millones y medio de células de mieloma múltiple U266 (ATCC) por pocillo en placas de 6 pocillos, se incubaron con cicloheximida 100 mg/ml (Sigma, C4859), y se trataron con DMSO, lenalidomida 10 µM o pomalidomida 1 µM durante 0, 1,5, 3 o 6 horas. Los lisados celulares se separaron en un gel de TGX SDS-PAGE al 10% (Bio-Rad) y se llevaron a cabo las transferencias para Aiolos (Santa Cruz, sc-10198), Ikaros (Millipore, ABD16) y Actina (Sigma, AC15).

7.1.10 Transfección de ARNip de CRBN y Aiolos en células T

Se aislaron células T primarias de leucocitos humanos (Blood Center of New Jersey, East Orange, NJ) por centrifugación a través de Ficoll siguiendo el protocolo de "RosetteSep" (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Células T purificadas se trataron con PHA-L 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) a 37°C durante 24 horas, después se transfectaron con siCRBN o siAiolos (Invitrogen) (ARNip 200 nM/ 100 µl de tampón T/ 8×10^6 células/carga x 5 cargas) usando el sistema de transfección Neon (Invitrogen, Grand Island, NY) con el programa de voltaje 2100 + anchura 15 +2 pulsos. Se transfectó ARNip de bajo contenido de GC (Invitrogen, Grand Island, NY) como control negativo. Las células transfectadas se juntaron y se cultivaron en placa de 10 cm recubierta con OKT3 (3 µg/ml, eBioscience, San Diego, CA) con 20 ml de RPMI que contenía FBS al 10% a 37°C durante 24 horas. Se recogieron las células para medir la eficacia de la reducción de la expresión de CRBN o Aiolos por transferencia Western (anticuerpo anti-Aiolos: Santa Cruz, sc-10198, lote.C-0212) y qRT-PCR (Applied Biosystem, expresión génica de CRBN Hs00372271_ml; IKZF3 ID n°: Hs00232635_ml). También se recogieron las células para medir el ARN de IL-2 por qRT-PCR (Applied Biosystem, expresión génica ID n°: Hs00174114_ml). Para la expresión de Aiolos en las células transfectadas con siCRBN, el resto de las células transfectadas con siCRBN se sembraron en placas TC de 12 pocillos previamente unidas a OKT3 (3 µg/ml) con 15×10^6 células/3 ml/pocillo y se trataron con DMSO o fármaco a 37°C durante 24 horas y después se recogieron para el análisis Western. La expresión de proteínas de Aiolos e Ikaros se determinó por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos contra Aiolos (Santa Cruz, Dallas, TX) e Ikaros (Millipore, Billerica, MA). Para la producción de IL-2 en las células transfectadas con siAiolos, el resto de las células transfectadas se sembraron en placas TC de 96 pocillos previamente unidas a OKT3 (3 µg/ml) con 2×10^6 células por pocillo y se trataron con DMSO o fármaco a 37°C durante 2 días. Se recogieron los líquidos sobrenadantes y se detectó la proteína IL-2 por ELISA (Thermo Scientific, Lafayette, CO).

7.1.11 Métodos de xenoinjerto H929 y e211

Se inyectó a ratones hembra SCID (Fox Chase SCID®, C.B-17/1cr-Prkdcscid, Charles River) (Wilmington, MA) por vía subcutánea en el flanco derecho un total de 1×10^7 células tumorales NCI-H929 en matrigel al 50% (BD Biosciences). Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100-150 mg, 10 ratones en cada grupo se trataron con vehículo (carboximetilcelulosa al 0,5%: Tween 80 al 0,25% en H₂O desionizada), o las dosis indicadas de lenalidomida oral diariamente durante 19 días. Se vigiló diariamente el estado de salud de los ratones, así como el crecimiento del tumor. Los tumores de todos los ratones se midieron con un calibre digital, y los volúmenes se

calcularon con la siguiente fórmula: volumen tumoral (mm^3) = largo (mm) \times ancho (mm)². En un grupo satélite, se trataron los ratones (3 por grupo) durante 7 días con vehículo o las dosis indicadas de lenalidomida oral diaria, los tumores se extirparon y se congelaron instantáneamente para el análisis inmunohistoquímico.

7.1.12 Inmunohistoquímica

5 Se tiñeron secciones de tumor de xenoinjerto introducido en parafina fijados con formalina de cuatro micrómetros de espesor con anticuerpos contra CRBN (monoclonal de conejo Celgene CRBN65), Aiolos (anticuerpo policlonal de conejo; Santa Cruz, Dallas, Texas), e Ikaros (anticuerpo policlonal de conejo; Millipore, Billerica, MA) usando el dispositivo de tinción de portaobjetos automático Bond-Max (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) y el kit Bond Polymer Refine Detection asociado. La recuperación de antígeno se llevó a cabo con Epitope Retrieval 2 (pH 9,0) durante 20 min a 100°C en el instrumento. Los portaobjetos se bloquearon para la actividad de la peroxidasa endógena con Peroxide Block durante 5 min a temperatura ambiente. Después se incubaron secciones con anticuerpos primarios contra CRBN en 1:4000, Aiolos en 1:1000 e Ikaros en 1:1000 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Puesto que estos anticuerpos primarios son especies hospedantes de conejo, se eliminó la etapa post-primaria del protocolo para evitar la reactividad cruzada con los componentes de xenoinjerto de ratón. Los portaobjetos de control negativo recibieron diluyente de anticuerpo primario Bond en lugar del anticuerpo primario. Se aplicó el polímero marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en las condiciones por defecto del instrumento y se usó tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) como el sustrato enzimático para visualizar la localización del anticuerpo específico. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. La intensidad de la tinción IHC se puntuó en una escala de 0-3 (0 = negativo, 1 = débil, 2 = intermedio, 3 = fuerte). Se registraron los intervalos de células con inmunorreactividad específica (<1%=0, 1-25%=1, 26-75%=2, y >75%=3). La puntuación total de la intensidad de la inmunorreactividad se calculó como el producto de la intensidad y el intervalo de células positivas.

7.1.13 Inhibición de Aiolos por cohorte

Se administró a pacientes con cáncer el compuesto A en dosis de 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 o 3,5 mg. Se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración y 1,5 h y 5 h después de una sola dosis de compuesto A. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron por Ficoll de muestras de sangre entera y se congelaron de forma viable en DMSO. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría, después se permeabilizaron por adición de 2 ml de tampón Cytotfix/cytoperm BD frío y se incubaron sobre hielo durante 15 minutos. Las células se centrifugaron, después se lavaron dos veces con tampón de perm/lavado BD, después se volvieron a suspender en 40 μl de tampón de perm/lavado BD. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD3 o anti-CD19, y 20 μl de Ac anti-Aiolos (Santa Cruz Santa Cruz, IgG policlonal de conejo, cat. n° sc-101982 con dilución 1:200 con tampón de tinción), o 20 μl de controles de isotipo adecuado contra células. Las células se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad, se lavaron una vez con tampón de perm/lavado BD, después se volvieron a suspender en 80 μl de tampón de perm/lavado BD, y se añadieron 20 μl de anticuerpo secundario antes del análisis en un citómetro de flujo.

7.1.14 Tratamiento con fármaco en células T

Se aislaron células T primarias de hasta 3 donantes de leucocitos humanos (Centro de sangre de New Jersey, East Orange, NJ) por centrifugación a través de Ficoll siguiendo el protocolo de "RosetteSep" (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Las células T purificadas se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (Ebioscience, San Diego, CA), se trataron con fármacos durante seis horas, se recogieron y la expresión de proteínas Aiolos e Ikaros se determinó por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos contra Aiolos (Santa Cruz, Dallas, TX) e Ikaros (Millipore, Billerica, MA), con o sin péptido bloqueante.

7.1.15 Degradación de proteína Aiolos en células Jurkat

Se transfectaron células Jurkat con ADN de Aiolos de longitud completa de tipo natural y de Aiolos de longitud completa con mutación de lisina (Origene, 5 μg de ADN/100 μl de tampón R / 2×10^6 células/carga) usando el sistema de transfección Neon (Invitrogen, Grand Island, NY) con el programa de voltaje 1350+anchura 10+3 pulsos. También se transfectó ADN de control de GFP (Lonza). Las células transfectadas se cultivaron en placa de 24 pocillos con 1 ml de RPMI+FBS al 10% a 37°C durante 6 h y después se trataron con DMSO o fármaco durante otras 48 h, las células tratadas con fármaco se recogieron para medir la expresión de proteína Aiolos e Ikaros por transferencia Western con anticuerpos contra Aiolos (Santa Cruz, Dallas, TX) e Ikaros (Millipore, Billerica, MA).

7.1.16 Citometría de flujo de Aiolos en células B y T

Se administró a voluntarios sanos placebo (n=10) o compuesto B en dosis de 0,03 mg, 0,1 mg, 0,3 mg, 1 mg o 2 mg (N=6 cada uno). Se extrajeron muestras de sangre antes de administración, o 3 h, 12 h y 24 h después de administración. 1. Las muestras de sangre se lisaron y fijaron inmediatamente mezclando 1 volumen de sangre con 20 volúmenes de 1x tampón de lisis/fijación (BD Biosciences, cat. n° 558049) y se mezclaron bien invirtiendo el tubo varias veces. Esta mezcla de la muestra se incubó en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos, y las células se sedimentaron por centrifugación a 800x durante 5 minutos para separar el líquido sobrenadante por aspiración. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría, después se permeabilizaron por adición de 2 ml de tampón Cytotfix/cytoperm BD frío y se incubaron sobre hielo durante 15

minutos. Las células se centrifugaron, después se lavaron dos veces con tampón de perm/lavado BD, después se volvieron a suspender en 40 µl de tampón de perm/lavado BD. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD3 o anti-CD19, y 20 µl de Ac anti-Aiolos (Santa Cruz Santa Cruz, IgG policlona de conejo, cat. nº sc-101982 con dilución 1:200 con tampón de tinción), o 20 µl de controles de isotipo adecuado contra células. Las células se mezclaron bien y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad, se lavaron una vez con tampón de perm/lavado BD, después se volvieron a suspender en 80 µl de tampón de perm/lavado BD, y se añadieron 20 µl de anticuerpo secundario antes del análisis en un citómetro de flujo.

7.1.17 Electroferogramas de SimpleWestern de células B CD19+ humanas normales

Se aislaron células B humanas de 3 donantes de sangre entera del Centro de Sangre de New Jersey usando kits de aislamiento de células B de StemCell Technologies. Las proteínas de la familia IKZF se cuantificaron usando el sistema Sally SimpleWestern automático basado en capilar (ProteinSimple). Se mezclaron 100 ng de proteína de lisado celular o diluciones seriadas de proteínas recombinantes en tampón de reducción con patrones de peso molecular (PM) fluorescentes. Después de calentar estas muestras a 95°C durante 5 min, las muestras se cargaron en cada uno de los tubos capilares y las proteínas se separaron basándose en los tamaños de PM a través de matrices de apilamiento y separación durante 40 minutos a 250 V. Después las proteínas se inmovilizaron sobre las paredes capilares usando química de captura fotoactivada óptima. Después de inmovilización de proteínas, los capilares se incubaron con un reactivo de bloqueo durante 23 min y las proteínas objetivo se hibridaron con un anticuerpo primario específico y anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (ProteinSimple). Se añadió una mezcla de luminol y peróxido (ProteinSimple), la señal quimioluminiscente resultante se capturó por una cámara de CCD, y las intensidades de las señales se cuantificaron y analizaron usando el software Compass para Sally (ProteinSimple). Después se calcularon las proteínas de la familia Ikaros en cada muestra basándose en la curva de referencia de proteínas recombinantes humanas. También se usó la B-actina como un control de normalización interno.

7.1.18 Procedimiento de análisis de ARNm

Se aislaron PBMC de sangre entera de voluntarios normales y pacientes con las enfermedades inflamatorias indicadas (Conversant Bio, Huntsville, Alabama). Después las células se cultivaron durante 24 horas en medio RPMI-1640 complementado con suero autólogo al 5% y antibióticos. Después de incubación, se recogieron 1×10^6 células, se lavaron con PBS frío y se lisaron con 350 µl de tampón RLT (Qiagen). Los lisados de células se transfirieron a tubos con códigos de barras para el análisis de QC de ARN y expresión génica con micromatriz. Se llevaron a cabo experimentos de matrices de Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 en The Covance Genomics Laboratory (Covance).

7.1.19 Procedimiento para muestras de PBMC de macaco cangrejero

32 macacos cangrejeros se dividieron aleatoriamente en 4 grupos. Cada grupo tenía 4 monos hembras y 4 machos (n=8). Se administró por vía oral a los 3 grupos de monos el compuesto B en una dosis de 0,04, 0,15, 0,75 mg/kg respectivamente. El grupo que quedaba se usó como control de vehículo (carboximetilcelulosa al 0,5%: Tween 80 al 0,25% en H₂O desionizada). Después de la administración de fármacos durante 1 mes, se tomaron muestras de sangre entera de cada mono y se aislaron las PBMC. Se cuantificaron los niveles de Ikaros en las PBMC usando el sistema Sally SimpleWestern basado en capilar (ProteinSimple) como se ha mencionado previamente. Los análisis para comparaciones múltiples de grupos se llevaron a cabo con análisis de la varianza de 1 vía, seguido de prueba a posteriori de Dunnett, usando GraphPad Prism® versión 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo en todos los análisis.

7.1.20 Materiales de cultivo de células B-CLL

Se obtuvieron células B-CLL primarias humanas congeladas de forma viable de muestras de pacientes de AllCells (Emeryville, California, EE.UU.) y se mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fibroblastos que expresan CD40L (regalo de Angela Piperno, Rockefeller University, NY, NY) se mantuvieron en medio DMEM suministrado con FBS al 20%. Antes de los cultivos, los fibroblastos CD40L se trataron previamente durante 3 horas con mitomicina C 10 µg/ml seguido de un lavado con PBS y disociación con acutasa. Después las células se volvieron a sembrar en placa con una densidad de 6×10^5 células por pocillo (formato de 24 pocillos por placa) y se cultivaron durante la noche para permitir la formación de monocapa. Células B-CLL primarias de pacientes descongeladas de forma viable se tiñeron previamente con reactivo CFSE (Vibrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con un protocolo suministrado por el fabricante y se cultivaron $0,8 \times 10^6$ células por pocillo en la monocapa previamente formada de fibroblastos CD40L en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, rh-IL4 5 ng/ml y rh-IL10 10 ng/ml (Peprotech, EE.UU.). Para cultivos a largo plazo, se renovó la mitad de los medios de cultivos cada tres días. Alternativamente, para otros ensayos, las células B-CLL se cocultivaron en CD40L sin ser teñidas previamente.

7.2 Efectos en la expresión de Aiolos

El efecto del compuesto B en la inhibición de la expresión de Aiolos en linfocitos (panel izquierdo) granulocitos

(panel superior) y monocitos (panel derecho) se muestra en la figura 1. Como se muestra en las figuras 2 y 3, respectivamente, el compuesto B inhibía significativamente la expresión de Aiolos en células B CD20+ y células T CD3+. Como se muestra en la figura 51A y B, aunque se ha observado algo de inhibición en células B CD19+ y células T CD3+ tras el tratamiento con el compuesto B, se encontró que dosis mayores de 0,3 mg del compuesto B inhibían la expresión de Aiolos en niveles significativos.

El análisis de transferencia Western de sangre entera humana, tratada con los compuestos como se ha especificado, 250 nM durante 18 horas, se muestra en la figura 7, y lo mismo para PMBC de monos de la Isla Mauricio, se muestra en la figura 8. Como se muestra en la figura 8, el compuesto B, 18 horas después del tratamiento, inhibía la expresión de Aiolos.

Se llevaron a cabo estudios en macacos cangrejeros usando el compuesto B de acuerdo con el régimen de tratamiento resumido en la figura 6. Brevemente, se asignaron cuatro grupos de tratamiento, cada uno de los cuales recibió el tratamiento con el compuesto B de acuerdo con la pauta posológica y dosis especificadas en la figura 6. Los resultados de cada uno de los grupos se muestran en las figuras 9-16, que muestran que los efectos del compuesto B en la expresión de Aiolos puede variar de acuerdo con la pauta posológica, pero el compuesto B en general inhibe la expresión de Aiolos.

También se evaluaron los efectos de los compuestos A y B, lenalidomida ("len") y pomalidomida ("pom") en la expresión de Aiolos. Como se muestra en la figura 17, se mostró que el compuesto A inhibe la expresión de Aiolos en ausencia de un inhibidor de proteasa, pero se observó inhibición pequeña cuando estaba presente un inhibidor de proteasoma. Como se muestra en la figura 18, todos de len, pom, compuesto A y compuesto B mostraron efecto inhibidor en la expresión de Aiolos. Parecía que el efecto inhibidor se correlaciona con la actividad antiproliferativa del compuesto en células de mieloma. Como se muestra en la figura 43 A-D, Aiolos es un regulador negativo de IL-2 en células T y el silenciamiento de Aiolos imita el tratamiento con IMiD. Como se muestra en la figura 50 A-D, la lenalidomida, pomalidomida, compuesto A y compuesto B mostraron un efecto inhibidor en la expresión de Aiolos en células T primarias.

Se llevaron a cabo estudios de expresión de Aiolos en diferentes células de leucemia. Se encontró que el nivel de Aiolos es mayor en células B obtenidas de paciente con CLL que en células B obtenidas de sujetos sanos (figura 22). También se mostró que len, pom, compuesto A y compuesto B inhiben la expresión de Aiolos en células B obtenidas de pacientes con CLL así como de sujetos sanos (figura 22). También se mostraron efectos similares en células de linfoma MCL y DLBCL (figura 23). En especial, se mostró que se produce poca inhibición o no se produce inhibición de la expresión de Aiolos en células con expresión baja de cereblon (figura 19), y de forma similar, se mostró que la pérdida de cereblon previene la regulación por disminución de la expresión de Aiolos (figura 20), sugiriendo la implicación de cereblon en este proceso. Finalmente, se mostró que la reducción de la expresión de Aiolos induce la expresión de p21, disminuye IRF4 y disminuye el número de células en la fase S (figuras 21 y 24).

7.3 Identificación de proteínas asociadas a cereblon

Espectrometría de masas de proteínas ubiquitiladas (UbiScan): Se usó la plataforma de proteómica de UbiScan™ de tecnología de señalización celular para identificar y cuantificar diferencias en la ubiquitinación en células T humanas primarias no tratadas (tratamiento 1) o tratadas con tratamiento 2 o tratamiento 3, y en líneas celulares de MM tratadas con compuestos inmunomoduladores en presencia o ausencia del inhibidor de proteosoma MG132. El método de UbiScan combina el aislamiento de péptidos ubiquitinados de extractos de proteínas digeridos con proteasa usando el método de purificación por inmovilización de fase sólida patentado con la identificación y cuantificación de péptidos por cromatografía líquida, espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La cuantificación de la ubiquitinación se basa en la abundancia de péptidos ubiquitinados recuperados por inmunoprecipitación con anticuerpos. La abundancia o intensidad de información para cada péptido ubiquitinado se basa en la altura del pico de ese péptido medido en el canal MS1. La confianza en el número de veces de cambio calculado depende de una serie de factores, siendo uno importante la intensidad o altura del pico del péptido ubiquitinado. Las muestras se analizaron por LC-MS/MS en un espectrómetro de masas Orbitrap Velos. Las intensidades de las puntas de los picos cromatográficos de iones peptídicos en cada muestra se obtuvieron de sus correspondientes cromatogramas de iones extraídos. La cuantificación sin marcador se llevó a cabo comparando las intensidades de los picos del mismo ion peptídico en cada muestra para generar su correspondiente número de veces de cambio. La evaluación de los datos cualitativos era principalmente un procedimiento automático. Las asignaciones de péptidos que cumplían los criterios de puntuación específicos de la plataforma SORCERER y estaban dentro de los parámetros experimentales establecidos, se retuvieron en los resultados finales del estudio. Se obtuvo confianza adicional en la asignación si el péptido particular contenía múltiples líneas de confirmación a partir del SORCERER redundante daba como resultado el respaldo de la misma identificación de sitio, tal como secuencias que se superponen debido a la digestión incompleta por proteasa, la presencia de un resto de metionina en la forma reducida y/u oxidada, o la presencia del péptido ubiquitinado en estados de carga múltiple. Los péptidos que se han identificado independientemente muchas veces tienen una mayor verosimilitud de ser asignados correctamente en comparación con péptidos con un recuento de 1. Sin embargo, las asignaciones de péptidos con bajos recuentos deben considerarse también como identificados con confianza si tienen suficiente prueba experimental como indican sus correspondientes puntuaciones de SORCERER y métricas de calidad de datos (XCorr, DeltaCn, probabilidad PP y error de masas). Como se muestra en la figura 38, se encontró que la pomalidomida y lenalidomida potencian la

ubiquitinación del péptido de Aiolos que contiene lisina 203. Este resultado muestra que la lenalidomida y pomalidomida promueven la degradación de Aiolos.

7.4 Identificación de proteínas que se unen al compuesto usando entrecruzamiento covalente con farmacóforos reactivos (Caprotec)

5 La lenalidomida y opcionalmente una (1) molécula precursora nitro-lenalidomida se sintetizaron usando tres (3) conectores diferentes y un (1) armazón de captura para sintetizar seis (6) Compuestos de Captura (Capture Compounds™) en total. Los compuestos de captura pueden contener una biotina o un resto fluorescente como función de extracción. Esto requería aproximadamente 24 etapas sintéticas. 4 etapas eran de riesgo medio para ser optimizadas. 20 etapas eran de transformación rutinaria y con riesgo bajo para ser optimizadas. Todos los compuestos de captura se purificaron y analizaron para confirmar la identidad estructural, pureza y estabilidad. Se investigó críticamente la fotoquímica de los compuestos de captura. Se incubaron múltiples lisados de línea celular de mieloma con los compuestos de captura usando las condiciones de captura optimizadas para llevar a cabo el perfil de todos los compuestos de captura de la etapa 3 dentro del material biológico especificado. Las interacciones selectivas se confirmaron mediante experimentos de control y competición adecuados usando lenalidomida y análogos posiblemente inactivos proporcionados en cantidades suficientes. El número de muestras de MS en esta etapa era aproximadamente 100. La etapa 6, etapa 4 y etapa 5 estaban acompañadas de análisis de espectrometría de masas seguido de análisis de datos estadístico y cuantitativo LC-MSn de las proteínas capturadas. Basándose en esto, se consideró la optimización del ensayo en la etapa 4 y se generará la lista de todas las proteínas que interactúan específicamente con la molécula pequeña en la etapa 5.

20 7.5 Efectos del compuesto A en Aiolos endógeno en células de cáncer de mama

Las líneas celulares (AU565, ZR 75-1, BT-474, EFM-192A, HCC1954, HCC70, MB436 y BT549) se mantuvieron usando técnicas de cultivo celular convencionales. Para la expresión de Aiolos endógeno, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos con $0,5 \times 10^6$ células por pocillo en un volumen de medio de 3 ml. Se dejó que las células se adhirieran a la placa durante la noche. Las células se expusieron al compuesto A 0, 1 y 10 μM durante las cantidades de tiempo especificadas.

En algunos experimentos, las líneas celulares se transfectaron con un vector de sobreexpresión de Aiolos usando reactivo lipofectamina en un método discontinuo. Las células se sembraron en una placa de 12 pocillos con 1×10^5 células en un volumen de 3 ml por pocillos. Cuando se especificó, las células se pretrataron con MG132 10 μM durante 1 hora o se añadió DMSO como un control. Después del pretratamiento, se añadió el compuesto A directamente al medio de cultivo celular a la concentración especificada.

Las células se recogieron y lisaron en tampón Ripa de Pierce n° 89900 que contenían 2x cóctel de inhibidor de proteasa de Pierce n° 78442. El lisado se aplicó a un dispositivo QiaShredder para separar el ADN. El rendimiento total de proteína se midió usando el kit de determinación de proteínas DC de BioRad (Cat. n° 500-0112). Los lisados se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las muestras se aplicaron a geles Criterion PreCast de BioRad, 10% (BioRad n° 345-0010) y se transfectaron a sándwiches de nitrocelulosa /papel de filtro Bio-Rad (n° 162-0233) para análisis de transferencia Western.

Como se muestra en la figura 25, se encontró que, a las 24 horas después del tratamiento, el compuesto A redujo los niveles de Aiolos (una banda que aparecía alrededor de 60 kDa) en líneas celulares tanto ZR 75-1 como AU565. En algunos experimentos, se sobreexpresó la proteína de fusión flag-Aiolos-myc en células AU565, y las células se trataron con compuesto A. En dichos casos, se encontró que el análisis de transferencia Western usando el anticuerpo anti-myc proporcionaba una banda de Aiolos alrededor de 65 kD, mientras que el mismo análisis con anticuerpo anti-flag proporcionaba múltiples bandas (figura 26). Además, se encontró que la reducción de Aiolos sobreexpresado empezaba a mostrarse aproximadamente 5 horas después del tratamiento con el compuesto A (figura 27) y la inhibición de Aiolos por el compuesto A era rescatada por la adición del inhibidor de proteasa MG-132 (figuras 26 y 27). Finalmente, se mostró que Aiolos endógeno es inhibido por el compuesto A en células Her2⁺ (AU565, BT-474, EFM-192A y HCC1954), pero no en células triple negativo (HCC70, MB436 y BT549). Estos resultados sugieren que Aiolos es inhibido por el compuesto A, y por lo tanto, se puede usar como un biomarcador para el tratamiento mediante el compuesto A.

7.6 Expresión de Aiolos en células de linfoma

50 Se usaron xenoinjertos de células OCI-LY10 de linfoma para los siguientes experimentos. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica en el dispositivo de tinción de portaobjetos automático Bond-Max (Leica Microsystems) usando el kit Bond Polymer Refine Detection. Se desparafinaron secciones de FFPE de cuatro micrómetros de espesor en el instrumento. La recuperación del antígeno se llevó a cabo con Epitope Retrieval 2 (pH 9,0) durante 20 minutos a 100°C . Los portaobjetos se bloquearon para la actividad de la peroxidasa endógena con Peroxide Block durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después las secciones se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo contra Aiolos (Santa Cruz, sc-101982) con una dilución 1/1000 durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubación con polímero marcado con HRP durante 8 minutos a temperatura ambiente. La detección enzimática del anticuerpo anti-Aiolos se llevó a cabo con sustrato de peróxido de hidrógeno y el cromógeno tetrahidrocloruro de

diaminobencidina (DAB) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portaobjetos se contratificaron con hematoxilina durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Como se muestra en las figuras 29-32, se muestra que todos de la lenalidomida (figura 29), compuesto A (figura 30), isómero R del compuesto A (figura 31) e isómero S del compuesto A (figura 32) inhibían la expresión de Aiolos en células de linfoma. Los niveles de Aiolos aproximados en los tumores tratados con compuesto eran: Isómero S del compuesto A < compuesto A < isómero R del compuesto A < lenalidomida, pero los tumores tratados con cualquiera de estos compuestos mostraban niveles menores de Aiolos que los tumores tratados con vehículo o vincristina. Los resultados sugieren que la expresión de Aiolos puede ser un buen biomarcador en relación con el tratamiento con cualquiera de los compuestos ensayados.

10 7.7 Efectos del compuesto A o compuesto B en la expresión de Aiolos en linfocitos

7.7.1 Efectos en sangre entera determinados por ensayo de FACS

El compuesto de ensayo previamente pesado se disolvió en DMSO al 100% para hacer concentraciones madre 100 mM o 10 mM. El compuesto en DMSO al 100% se diluyó a las concentraciones madre 10 mM, 1 mM, 0,1 mM, 0,01 mM, 0,001 mM según fuera adecuado. Los compuestos se añadieron directamente a sangre entera humana heparinizada (dilución 1:1000) para concentraciones finales de 10 μ M, 1 μ M o 0,1 μ M según sea adecuado. Se transfirieron diez (10 ml) de sangre entera a un tubo cónico de 50 ml y se trataron con compuesto de ensayo. La concentración final en DMSO era 0,1%. La sangre se incubó durante 1,5 o 5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Después de cada tiempo de medición, la sangre se lizó/fijó, se permeabilizó, se lavó y se tiñó con Aiolos como se describe más adelante.

El tampón de lisis/fijación BD se diluyó 5x con agua destilada (o desionizada). El tampón de lisis/fijación se precalentó en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos antes de usar. Las células se lisaron y se fijaron inmediatamente mezclando 1 volumen de sangre entera con 20 volúmenes de 1x tampón de lisis/fijación (para 1 ml de sangre + compuesto, añadir 20 ml de 1x tampón de lisis/fijación) y se mezclaron bien invirtiendo el tubo varias veces. La mezcla de células lisadas/fijadas y sangre se incubó en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos y se separó el líquido sobrenadante por aspiración. Las células se suspendieron con 5 ml de PBS frío y después se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos, y el líquido sobrenadante se separó por aspiración. Se añadieron doscientos (200) μ l de PBS a las células. Las células se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo en U, de poliestireno (BD, Cat. N° 353910) para usar con el dispositivo FACSCanto con HTS. Las células se lavaron con 200 μ l de PBS frío y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, y la placa se golpeó y sacudió suavemente sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón. Las células se volvieron a suspender y se permeabilizaron por adición de 200 μ l de tampón 1 de perm/lavado BD y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos y se separó el tampón. Las células se lavaron una vez con 200 μ l de tampón de perm/lavado BD y se volvieron a sedimentar, y se separó el tampón.

El sedimento celular se volvió a suspender en 40 μ l de tampón de perm/lavado BD. Se añadieron veinte (20) μ l de cada uno de los anticuerpos de conejo anti-CD3-PE, anti-CD20-APC, y anti-Aiolos, o 20 μ l de los controles de isotipo adecuado, o 20 μ l de IgG de conejo normal 1:400 (control para Aiolos) a las células. La mezcla se mezcló completamente y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. La mezcla se centrifugó y se lavó una vez con tampón de perm/lavado BD a 500 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se volvió a suspender en 80 μ l de tampón de perm/lavado BD, y se añadieron 20 μ l de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo AF488 (con dilución 1:400 en tampón de perm/lavado), y la mezcla se incubó a t.a. durante 30 min en la oscuridad. El anticuerpo secundario no se añadió a los controles de isotipo. La mezcla se lavó una vez con 200 μ l de tampón de tinción BD y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, y las células sedimentadas se volvieron a suspender en 200 μ l de tampón de tinción. Las células se analizaron en el FACSCanto BD usando la plataforma HTS. Las células se analizaron usando el método convencional. Si las células no se podían leer inmediatamente, las placas se cubrían con papel de aluminio para protegerlas de la luz y se almacenaban a 4°C durante hasta 2 días. Se llevó a cabo el análisis de datos usando FlowJo de Tree Star, Inc. para evaluar la intensidad media de la fluorescencia y el porcentaje de inhibición de Aiolos en la población de células.

Como se muestra en la figura 33A, el compuesto A y el compuesto B inhibían ambos significativamente la expresión de Aiolos en linfocitos a las 1,5 horas después del tratamiento, pero no se observó efecto significativo en los no linfocitos. En linfocitos, el efecto inhibitor se observó en poblaciones tanto de células T como B (figura 33B). Se observó un patrón sustancialmente similar a las 5 horas después del tratamiento, aunque el grado de inhibición era más significativo que el observado a las 1,5 horas (figuras 34A y 34B).

7.7.2 Efectos en PBMC congeladas de forma viable

El compuesto de ensayo previamente pesado se disolvió en DMSO al 100% para hacer concentraciones madre 100 mM o 10 mM. El compuesto en DMSO al 100% se diluyó a las concentraciones madre 10 mM, 1 mM o 0,1 según fuera adecuado. Los compuestos se añadieron directamente a sangre entera humana heparinizada (dilución 1:1000) para concentraciones finales de 10 μ M, 1 μ M o 0,1 μ L según fuera adecuado. Se transfirieron siete (7 ml) de sangre

5 entera a un tubo cónico de 50 ml y se trataron con compuesto de ensayo. La sangre se incubó durante 1,5 o 5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Después de cada tiempo de medición, se transfirieron 3,5 ml de sangre al tubo de preparación celular CPT Vacutainer BD, y el tubo se invirtió genéticamente 10 veces y se centrifugó a t.a., 1800 RCF durante 20 minutos. Se recogió la capa mononuclear y se transfirió a un tubo cónico de 15 ml (se añadieron controles de DMSO 3 x 3,5 ml a tres tubos CPT, y las capas mononucleares se recogieron y se combinaron para las siguientes etapas). El tubo se llenó con PBS frío y se centrifugó a 4°C, 300 RCF durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se descartó y el sedimento celular se volvió a suspender en 2 ml de medio de congelación (10% de DMSO+90% de FBS). La suspensión celular se transfirió a un criovial y se puso en un recipiente Mr. Frosty (Fisher, cat. 15-350-50) y se dejó a -80°C en el congelador durante la noche.

10 Las células se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se centrifugaron y se separó el medio de congelación. El sedimento celular se lavó 1x con PBS frío. Las células se lisaron y se fijaron añadiendo 1x tampón de lisis/fijación y se mezclaron completamente invirtiendo el tubo varias veces. La mezcla de células lisadas/fijadas y sangre se incubó en un baño de agua a 37°C durante 10 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos y se separó el líquido sobrenadante por aspiración. Las células se suspendieron con 1 ml de PBS
15 frío y después se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos, y el líquido sobrenadante se separó por aspiración. Se añadieron doscientos (200) µl de PBS a las células. Las células se transfirieron a placas de 96 pocillos de fondo en U de poliestireno (BD, Cat. N° 353910) para usar con el dispositivo FACSCanto con HTS. Las células se lavaron con 200 µl de PBS frío y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos, y la placa se golpeó y sacudió suavemente sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de tampón. Las células se volvieron a
20 suspender y se permeabilizaron por adición de 200 µl de tampón I de perm/lavado BD y se incubaron sobre hielo durante 30 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos y se separó el tampón. Las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón de perm/lavado BD y se volvieron a sedimentar, y se separó el tampón.

25 El sedimento celular se volvió a suspender en 40 µl de tampón de perm/lavado BD. Se añadieron veinte (20) µl de cada uno de los anticuerpos de conejo anti-CD3-PE, anti-CD20-APC y anti-Aiolos, o 20 µl de los controles de isotipo adecuado, o 20 µl de IgG de conejo normal 1:400 (control para Aiolos) a las células. La mezcla se mezcló completamente y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. La mezcla se centrifugó y se lavó una vez con tampón de perm/lavado BD a 500 x g durante 5 minutos. El sedimento celular se volvió a suspender en 80 µl de tampón de perm/lavado BD, y se añadieron 20 µl de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG
30 de conejo AF488 (con dilución 1:400 en tampón de perm/lavado), y la mezcla se incubó a t.a. durante 30 min en la oscuridad. El anticuerpo secundario no se añadió a los controles de isotipo. La mezcla se lavó con 200 µl de tampón de tinción BD y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, y las células sedimentadas se volvieron a suspender en 200 µl de tampón de tinción. Las células se analizaron en el FACSCanto BD usando la plataforma HTS. Las células se analizaron usando el método convencional. Si las células no se podían leer inmediatamente, las placas se cubrían con papel de aluminio para protegerlas de la luz y se almacenaban a 4°C durante hasta 2 días. Se llevó a
35 cabo el análisis de datos usando FlowJo de Tree Star, Inc. para evaluar la intensidad media de la fluorescencia y el porcentaje de inhibición de Aiolos en la población de células.

40 Como se muestra en la figura 35A, el compuesto A y el compuesto B muestran algo de efectos inhibidores en la expresión de Aiolos en linfocitos congelados a las 1,5 horas después del tratamiento, pero no se observó efecto en los no linfocitos. En linfocitos, el efecto inhibitor se observó en poblaciones tanto de células T como B (figura 35B). En células linfocitos congeladas a las 5 horas después del tratamiento se observó que tanto el compuesto A como el compuesto B presentaban efectos inhibidores significativos, mientras que dichos efectos no eran observados en no linfocitos (figuras 36A y 36B). Los resultados indican que las células se pueden congelar antes de que pueda tener
45 lugar el ensayo real de los niveles de Aiolos, y por lo tanto, implica que la congelación de las células puede ser un método viable cuando es necesario el almacenamiento de células durante un periodo de tiempo antes del ensayo.

7.8 Efectos de los compuestos en la expresión de Aiolos e Ikaros

Los efectos de los compuestos de ensayo (pomalidomida, lenalidomida, compuesto A y compuesto B) en la expresión de Aiolos y la expresión de Ikaros se evaluaron por análisis de transferencia Western a las 6 horas después de tratamiento con los compuestos, usando procedimientos similares a los usados en relación con la
50 transferencia Western descrita en la figura 7, antes. Como se muestra en la figura 37, se mostró que todos los compuestos, en grados variables, inhibían la expresión tanto de Aiolos como de Ikaros.

7.8.1 Lenalidomida y Pomalidomida

El efecto de la lenalidomida y pomalidomida en la inhibición de la expresión de Aiolos e Ikaros en U266, células T CD3+ primarias y células B CD19 + primarias se muestra en la figura 39A. Como se muestra en la figura 39B y C, diferentes concentraciones de lenalidomida y pomalidomida inhibían significativamente la expresión de Aiolos e Ikaros en seis líneas celulares de MM (OPM-2, RPMI-8226, LP-1, U266, H929 y JJJ3). Cada barra representa la media de 6 líneas celulares ensayadas por duplicado y las barras de error representan una desviación estándar.
55

El efecto de la lenalidomida 10 µM y pomalidomida 1 µM en la inhibición de la expresión de Aiolos e Ikaros en U266, células de MM DF15, células T CD3+ primarias y células B CD19+ primarias se muestra en la figura 40. El efecto en

las células U266 tratadas con cicloheximida tratadas con lenalidomida 10 μM y pomalidomida 1 μM se muestra en la figura 41. Los resultados mostraban que la lenalidomida y pomalidomida reducían la expresión de Aiolos e Ikaros en todas las respectivas células ensayadas.

5 También se encontró que la reducción de los niveles de Aiolos e Ikaros por la lenalidomida y pomalidomida depende de CRBN. Se transfectaron células T CD3+ primarias humanas con siControl o siCRBN durante 24 horas y después se trataron con lenalidomida o pomalidomida en las concentraciones indicadas durante 6/24 horas. Los lisados celulares se separaron en geles de SDS-PAGE y se inmunotransfirieron para la expresión de las proteínas Aiolos, Ikaros y Actina. Como se muestra en la figura 42 A y B, en las células donde se reduce la expresión de CRBN, el efecto de la lenalidomida y pomalidomida en la reducción o inhibición de la expresión de Aiolos e Ikaros se reducía significativamente en comparación con las células de control sin reducción de la expresión de CRBN.

10 La figura 44 A muestra la actividad antitumoral in vivo de la lenalidomida, mientras que las figuras 44 B y C muestran la reducción de la expresión de Aiolos e Ikaros mediante las mismas dosis de lenalidomida. Como puede verse a partir de estas dos figuras, se encontró que la actividad antitumoral in vivo de la lenalidomida se correlaciona con la reducción de los niveles de Aiolos e Ikaros. Además, como se muestra en la figura 46, esta correlación también se extendía a la actividad antitumoral de la lenalidomida mostrada en los modelos de xenoinjerto de DLBCL. Además, se ensayaron otros compuestos de tratamiento para el mieloma múltiple (MM) junto con la lenalidomida y pomalidomida, para determinar su capacidad de reducir los niveles de Aiolos e Ikaros. Es interesante que se encontró que la reducción de los niveles de Aiolos e Ikaros en células de MM es única para los compuestos inmunomoduladores proporcionados en la presente memoria, es decir, la lenalidomida y pomalidomida (figura 45).

20 7.8.2 Compuesto A y compuesto B

El efecto del compuesto A en la expresión de Aiolos en células B y T se muestra en la figura 47 A y B. El efecto de diferentes compuestos proporcionados en la presente memoria, incluyendo el compuesto A y compuesto B, en Aiolos e Ikaros se muestra en la figura 48 A y B. Los resultados muestran que el compuesto A y el compuesto B reducían la expresión de Aiolos e Ikaros en todas las respectivas células ensayadas.

25 También se evaluaron los efectos del compuesto A en Aiolos endógeno y sobreexpresado en células Jurkat. Como se muestra en la figura 49, es necesaria la ubiquitinación de múltiples lisinas para la degradación de Aiolos mediada por el compuesto A. Se encontró que la degradación de Aiolos inducida por el compuesto se debe a la ubiquitinación de Aiolos, y la degradación de Ikaros inducida por el compuesto A es independiente de Aiolos en células Jurkat.

30 El análisis de transferencia Western (electroferogramas de lisados) de células B CD19+ humanas normales, tratadas con compuesto B en concentraciones especificadas se muestra en la figura 52. Como se muestra en la figura, el compuesto B inhibía la expresión de Ikaros y Aiolos en diferentes concentraciones sin afectar a Helios, Pegasus o β -Actina.

35 Los niveles de ARNm relativos que corresponden a diferentes proteínas en células obtenidas de una variedad de fuentes de enfermedades se muestran en la figura 53 A-G. Como se muestra en las figuras, Ikaros y Aiolos eran sobreexpresadas en la esclerosis sistémica (SSc) y el lupus eritematoso sistémico (SLE).

Se llevaron a cabo estudios en 32 macacos cangrejeros usando el compuesto B. Brevemente, se asignaron cuatro grupos de tratamiento, cada uno de los cuales recibió tratamiento con el compuesto B de acuerdo con las dosis especificadas en la figura 54. Los resultados en las figuras 54 y 55 A-C muestran que el compuesto B en general reduce los niveles de Ikaros.

40 7.9 Efectos de compuestos en los niveles de proteínas medidos por transferencia Western

45 Se cocultivaron células B-CLL con fibroblastos CD40L como se ha descrito antes, seguido de 72 horas de tratamiento con DMSO, lenalidomida 10 μM , pomalidomida 1 μM , compuesto A 0,1 μM y compuesto B 0,1 μM . Las células se recogieron y analizaron por transferencia Western. Los efectos del tratamiento con compuestos en CRBN, Aiolos, p21^{WAF-1} y IRF4 se evaluaron en 3 muestras celulares de pacientes diferentes (figura 56A). Las tres muestras de pacientes muestran niveles de expresión similares de la proteína CRBN (compárese la banda 1 de las 3 transferencias Western en la figura 56A; las muestras se experimentaron en la misma membrana incluso aunque los geles se presentan como 3 imágenes independientes en la figura). Los tratamientos con compuestos no afectan a los niveles de proteína CRBN o en algunas muestras inducen un ligero aumento de los niveles de CRBN. Los niveles de proteínas de los factores de transcripción Aiolos e IRF4, objetivos propuestos de IMiD corriente abajo de CRBN, eran regulados por disminución (figura 56A) y el nivel de proteína p21^{WAF-1} era regulado por aumento por tratamiento con lenalidomida, pomalidomida, compuesto A y compuesto B en las tres muestras de pacientes evaluadas. El efecto de los compuestos en la disminución de Aiolos dependía de la dosis como se demostraba por citometría de flujo (figura 56B) usando un anticuerpo específico para Aiolos (Santa Cruz) en tres cocultivos de B-CLL de pacientes diferentes. Los efectos en p21, IRF4 y Aiolos están de acuerdo con la detención del ciclo celular y la inhibición de la proliferación observada con el tratamiento con compuesto.

7.10 La reducción de la expresión de CRBN anula el efecto de los compuestos IMiD en Aiolos e Ikaros en células B-CLL.

5 Se cocultivaron células B-CLL transfectadas durante 48 horas con ARNip de control negativo o ARNip específico de CRBN, con fibroblastos CD40L y se trataron con compuestos. Después de 5 días de tratamiento se midieron los niveles de proteínas Aiolos e Ikaros por transferencia Western de la citometría de flujo. La reducción de la expresión de CRBN reducía significativamente el efecto de los compuestos IMiD en los niveles de proteínas Aiolos e Ikaros previniendo su degradación en tres muestras de B-CLL de pacientes diferentes (figura 57). Como se muestra en la figura 57, se encontró que la reducción de la expresión de CRBN disminuye los efectos inhibidores de los compuestos en los niveles de proteínas Aiolos e Ikaros los objetivos más próximos de los compuestos corriente abajo de CRBN. Estos resultados están de acuerdo con datos similares en células de mieloma y T. Aiolos es sobreexpresada en pacientes de B-CLL y es necesaria para la viabilidad de B-CLL, sugiriendo que Aiolos y otros miembros de la familia de Ikaros de factores de transcripción deben ser buenos objetivos terapéuticos en células B-CLL.

10 Los ejemplos expuestos antes se proporcionan para dar a los expertos en la técnica una descripción completa y descripción de cómo hacer y usar las realizaciones reivindicadas, y no se pretende que limiten el alcance de lo que se describe en la presente memoria. Se pretende que las modificaciones que son obvias para los expertos en la técnica estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un compuesto es capaz de alterar la respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende:
 - (a) poner en contacto una primera célula de un sujeto con el compuesto in vitro;
 - 5 (b) obtener una primera muestra de la primera célula de la etapa (a);
 - (c) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra; y
 - (d) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (c) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia,
 - 10 en donde un cambio en el nivel en comparación con la referencia es indicativo de la eficacia del compuesto para alterar la respuesta inmunitaria en el sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la primera célula es una célula mononuclear de sangre periférica, célula B, célula T, monocito o granulocito.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la referencia se prepara usando una segunda célula que no se ha puesto en contacto con el compuesto; en donde la segunda células es del mismo tipo que la primera célula.
- 15 4. Un método para evaluar la eficacia de un compuesto en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad inflamatoria, que comprende:
 - (a) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en una primera muestra de un sujeto que tiene el cáncer o la enfermedad inflamatoria al que se le ha administrado un compuesto; y
 - (b) comparar el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) de la etapa (a) con el nivel de IKZF1 (Ikaros) obtenido de una muestra de referencia,
 - 20 en donde un cambio en el nivel en comparación con la referencia, es indicativo de la eficacia del compuesto en el tratamiento del cáncer o la enfermedad inflamatoria.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la primera muestra se obtiene de una biopsia de tumor, biopsia de ganglio, o una biopsia de médula ósea, bazo, hígado, cerebro o mama.
- 25 6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde la referencia se prepara usando:
 - (i) una segunda muestra obtenida del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra; o
 - (ii) una segunda muestra obtenida de un sujeto sano que no tiene la enfermedad o trastorno; y en donde la segunda muestra es de la misma fuente que la primera muestra.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde la enfermedad o trastorno es el mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, linfoma de células del manto, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende:
 - 35 (i) poner en contacto las proteínas dentro de la primera muestra con un primer anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a IKZF1 (Ikaros);
 - (ii) poner en contacto las proteínas unidas al primer anticuerpo con un segundo anticuerpo con un marcador detectable, en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a dicha IKZF1 (Ikaros), y en donde el segundo anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un epítipo diferente en dicha IKZF1 (Ikaros) que el primer anticuerpo;
 - 40 (iii) detectar la presencia del segundo anticuerpo unido a la proteína; y
 - (iv) determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) basado en la cantidad de marcador detectable en el segundo anticuerpo.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde determinar el nivel de IKZF1 (Ikaros) en la primera muestra comprende:
- 45

(i) poner en contacto el ARN dentro de la primera muestra con un cebador que comprende una secuencia que se une específicamente al ARN para generar una primera molécula de ADN que tiene una secuencia complementaria al ARN;

(ii) amplificar el ADN que corresponde a un segmento de un gen que codifica IKZF1 (Ikaros); y

5 (iii) determinar el nivel de ARN de dicha IKZF1 (Ikaros) basado en la cantidad del ADN amplificado.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el compuesto disminuye el nivel de dicha IKZF1 (Ikaros) en comparación con la referencia.

10 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el compuesto es la talidomida, lenalidomida, pomalidomida, 3-(5-amino-2-metil-4-oxo-4*H*-quinazolin-3-il)-piperidina-2,6-diona o 3-(4-((4-(morfolinometil)bencil)oxi)-1-oxoisoindolin-2-il)piperidina-2,6-diona, uno de sus estereoisómeros, o una de sus sales, solvatos, hidratos, cocristales, clatratos o polimorfos farmacéuticamente aceptables.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que además comprende determinar el nivel de IKZF3 (Aiolos).

Efecto del COMP B en la inhibición de la expresión de Aiolos en poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos (Presentado como % de control DMSO, n=3)

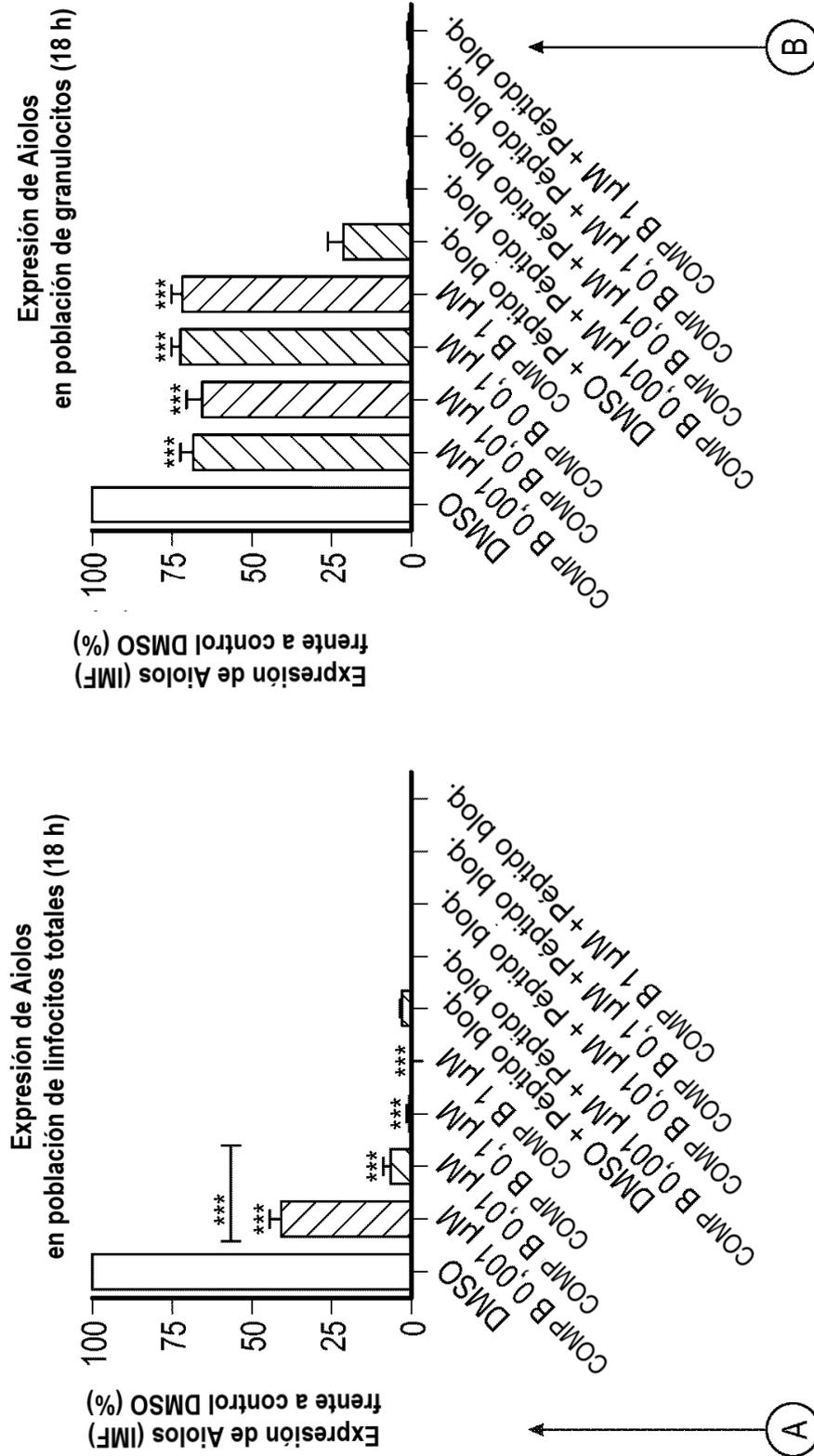


FIG. 1A

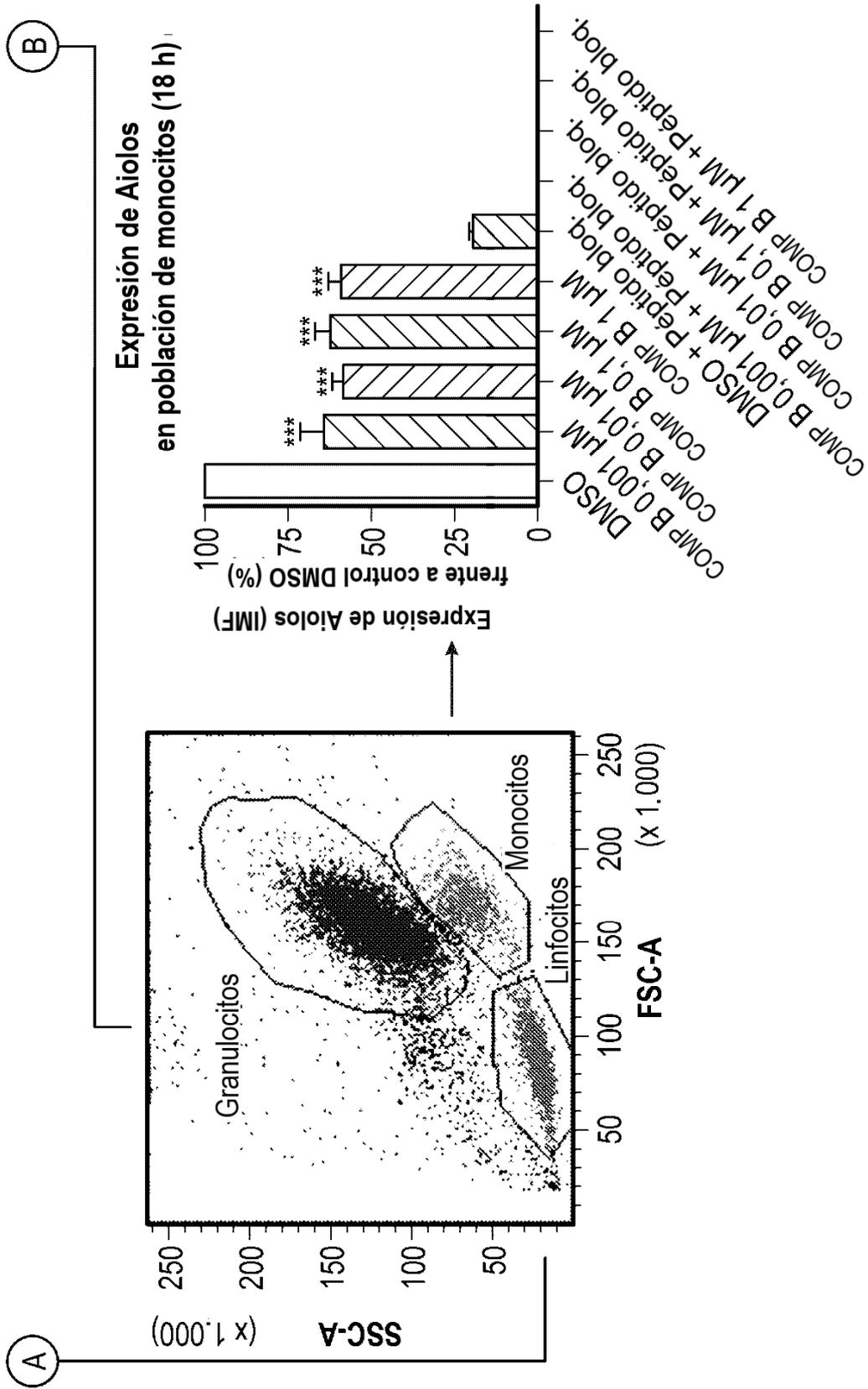


FIG. 1B

COMP B inhibe significativamente la expresión de Aiolos en células B CD20+

(Presentado como % de control DMSO, n=3)

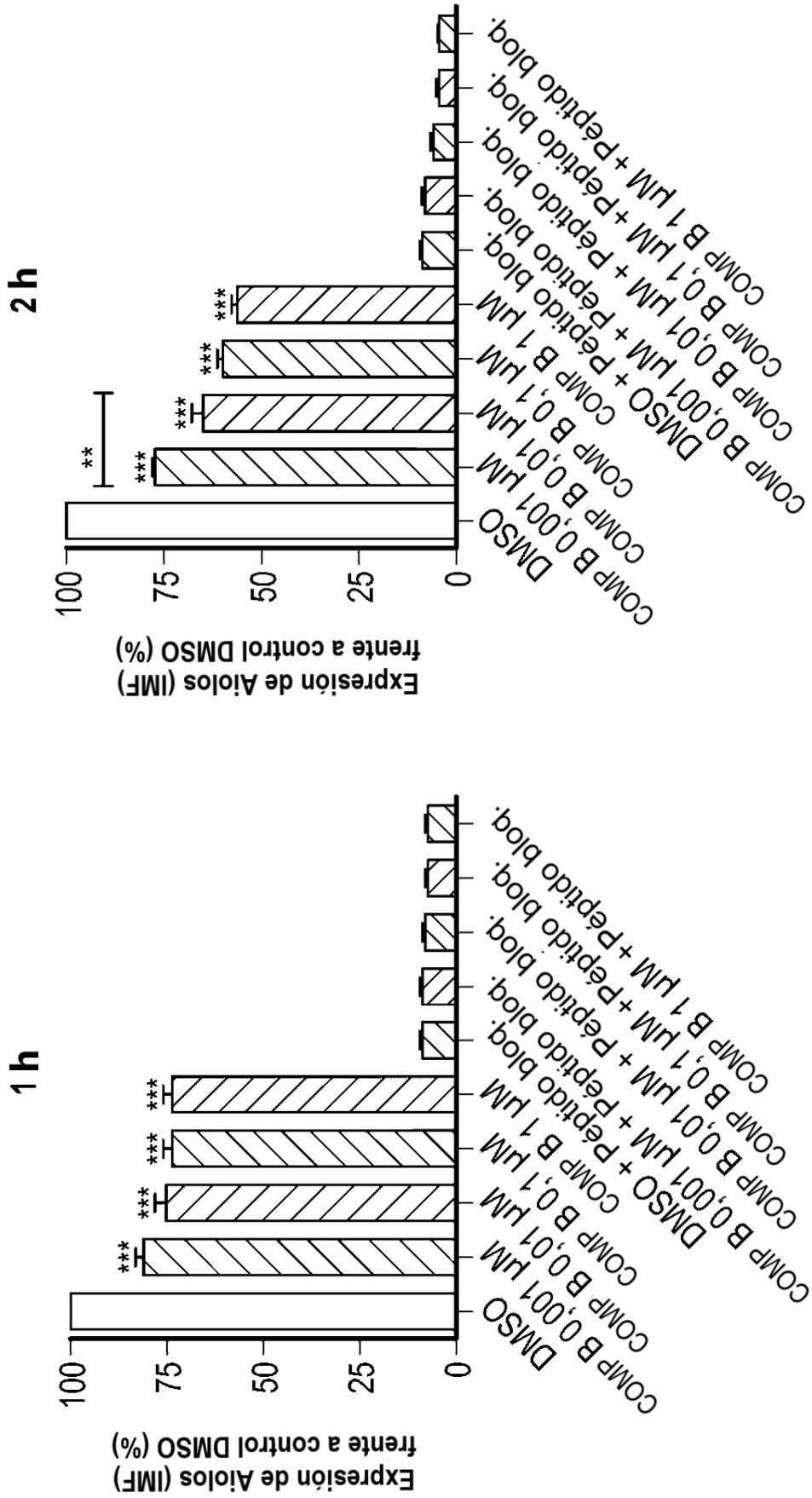


FIG. 2A

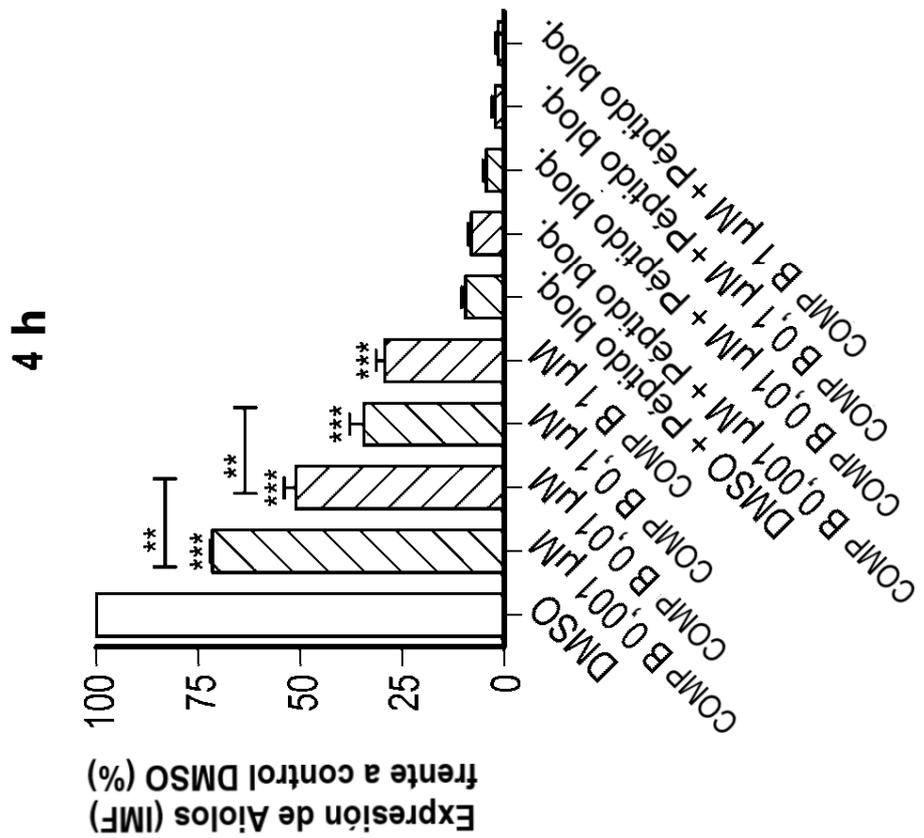
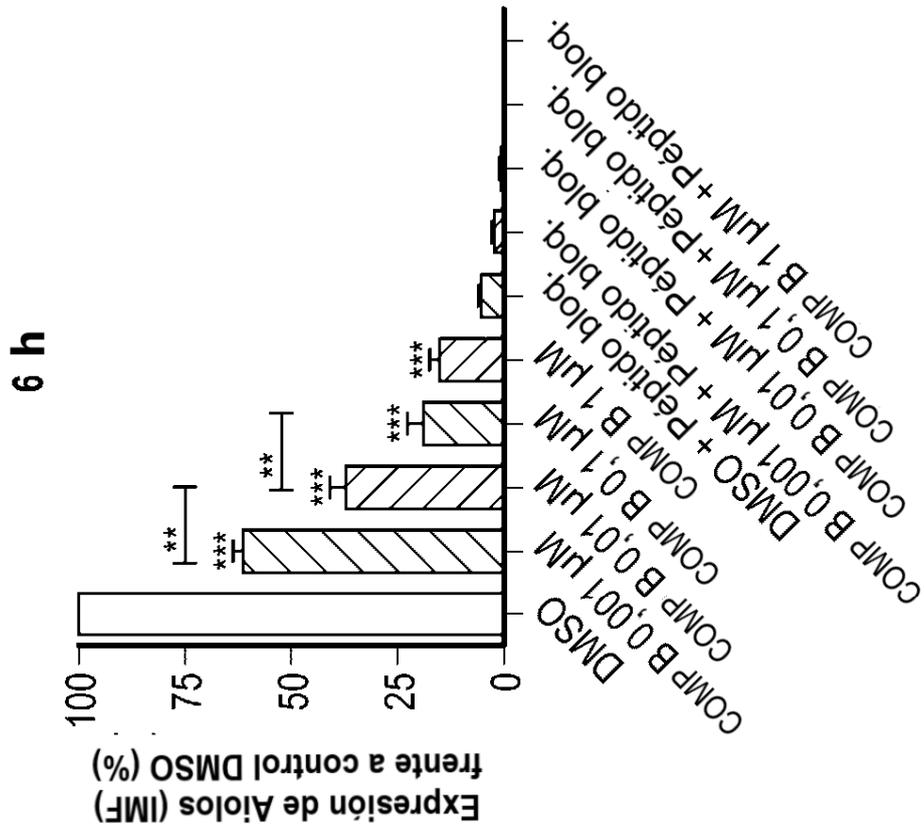


FIG. 2B

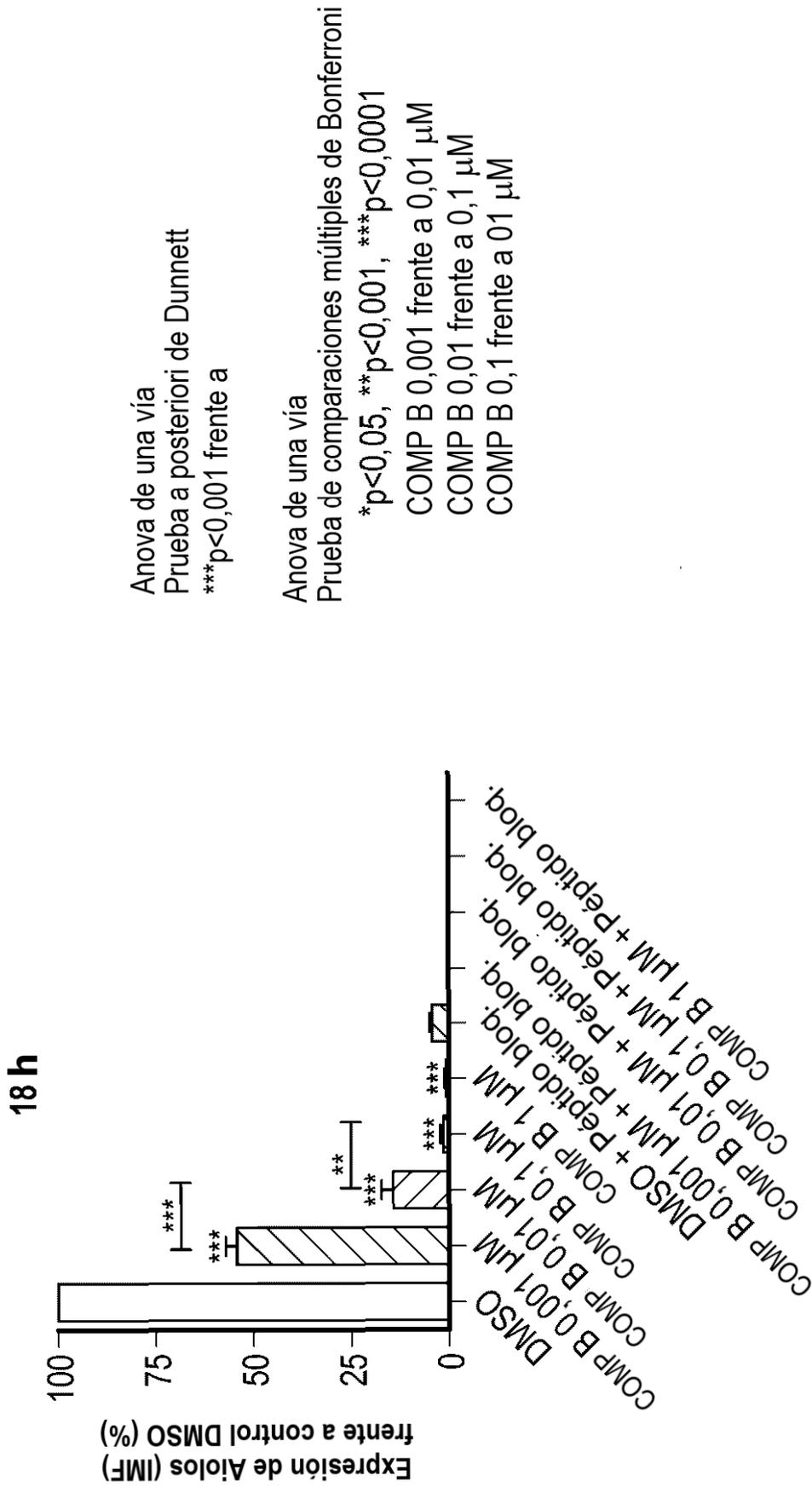


FIG. 2C

COMP B inhibe significativamente la expresión de Aiolos en células T CD3+ (Presentado como % de control DMSO, n=3)

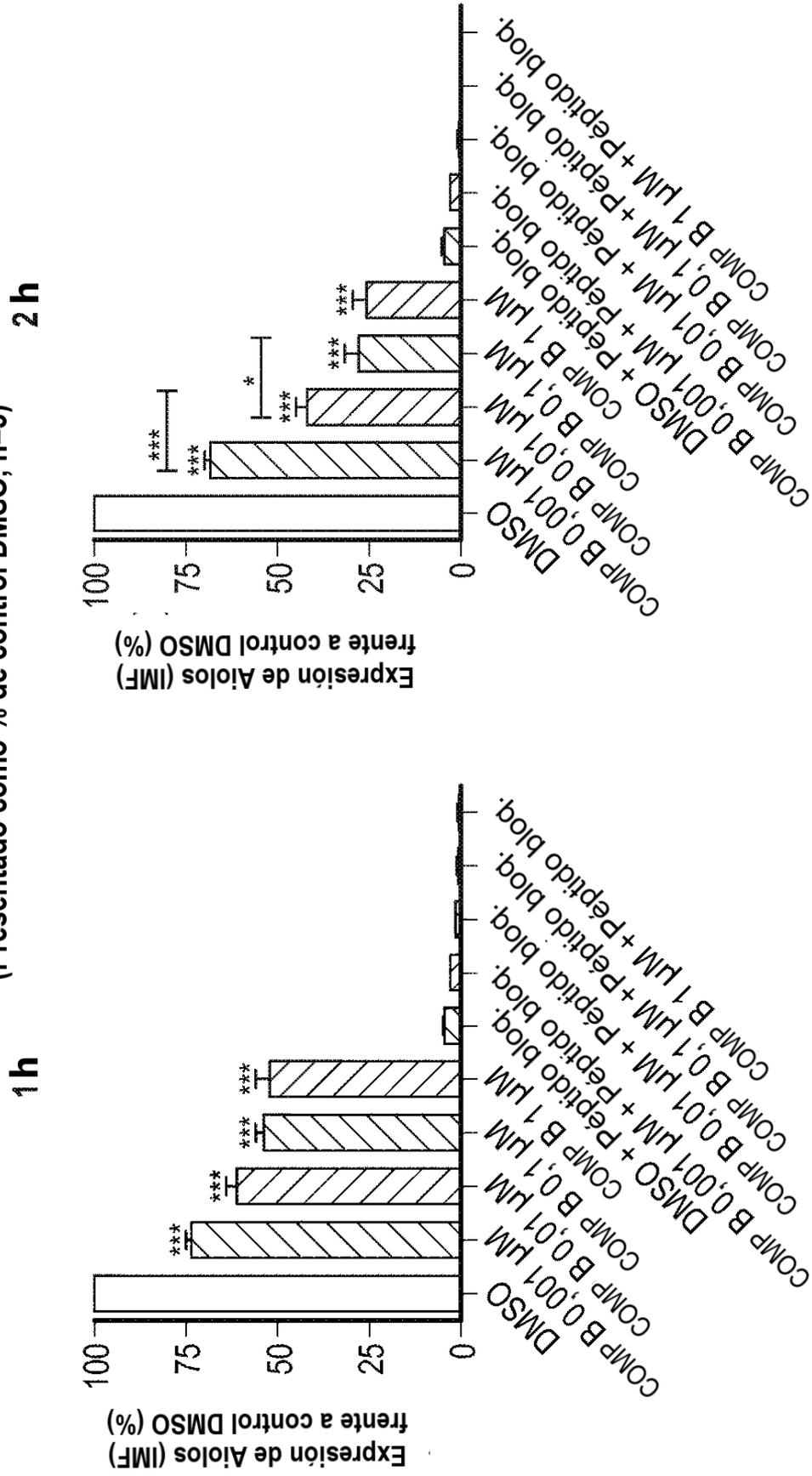


FIG. 3A

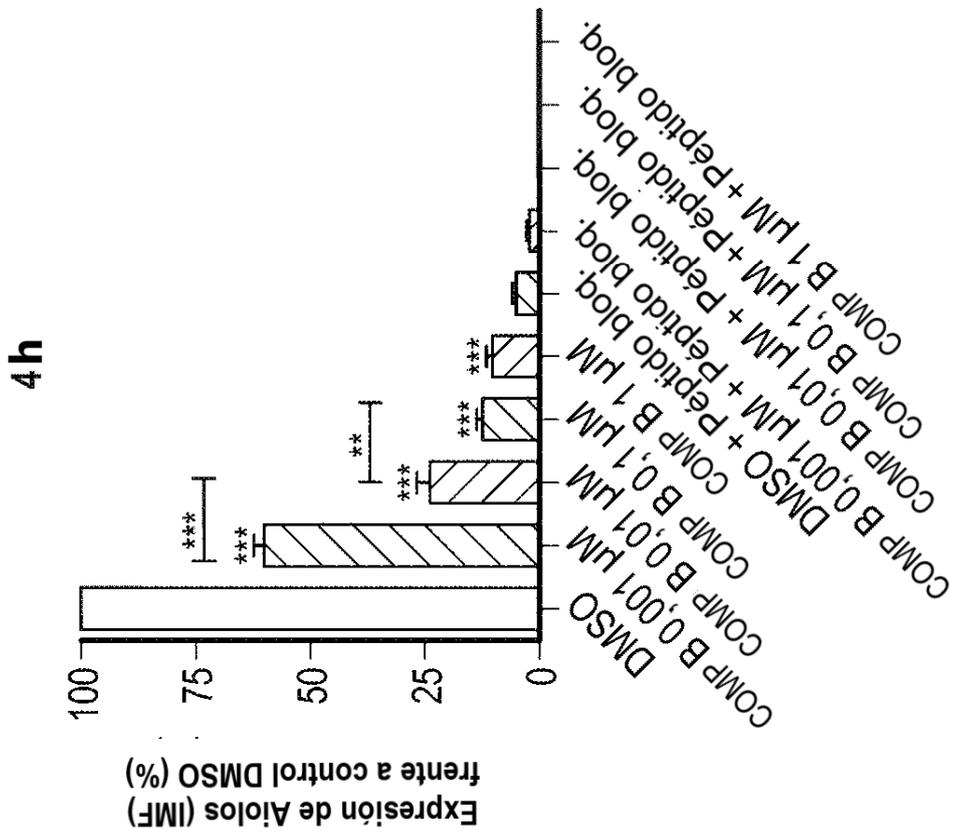
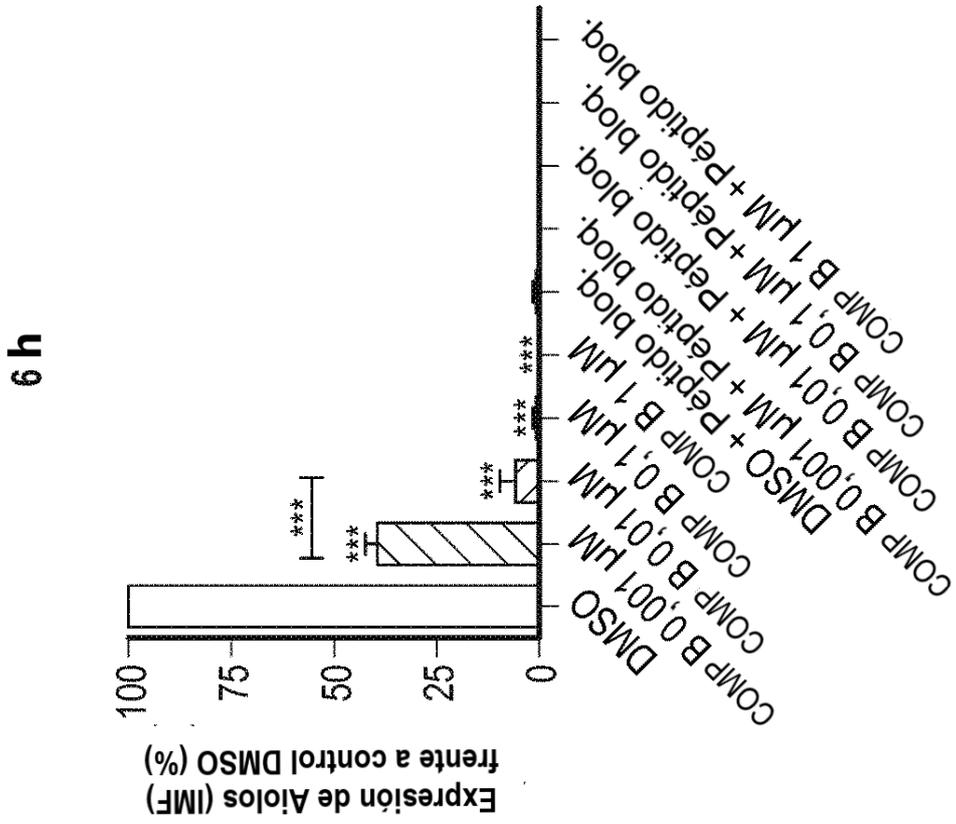


FIG. 3B

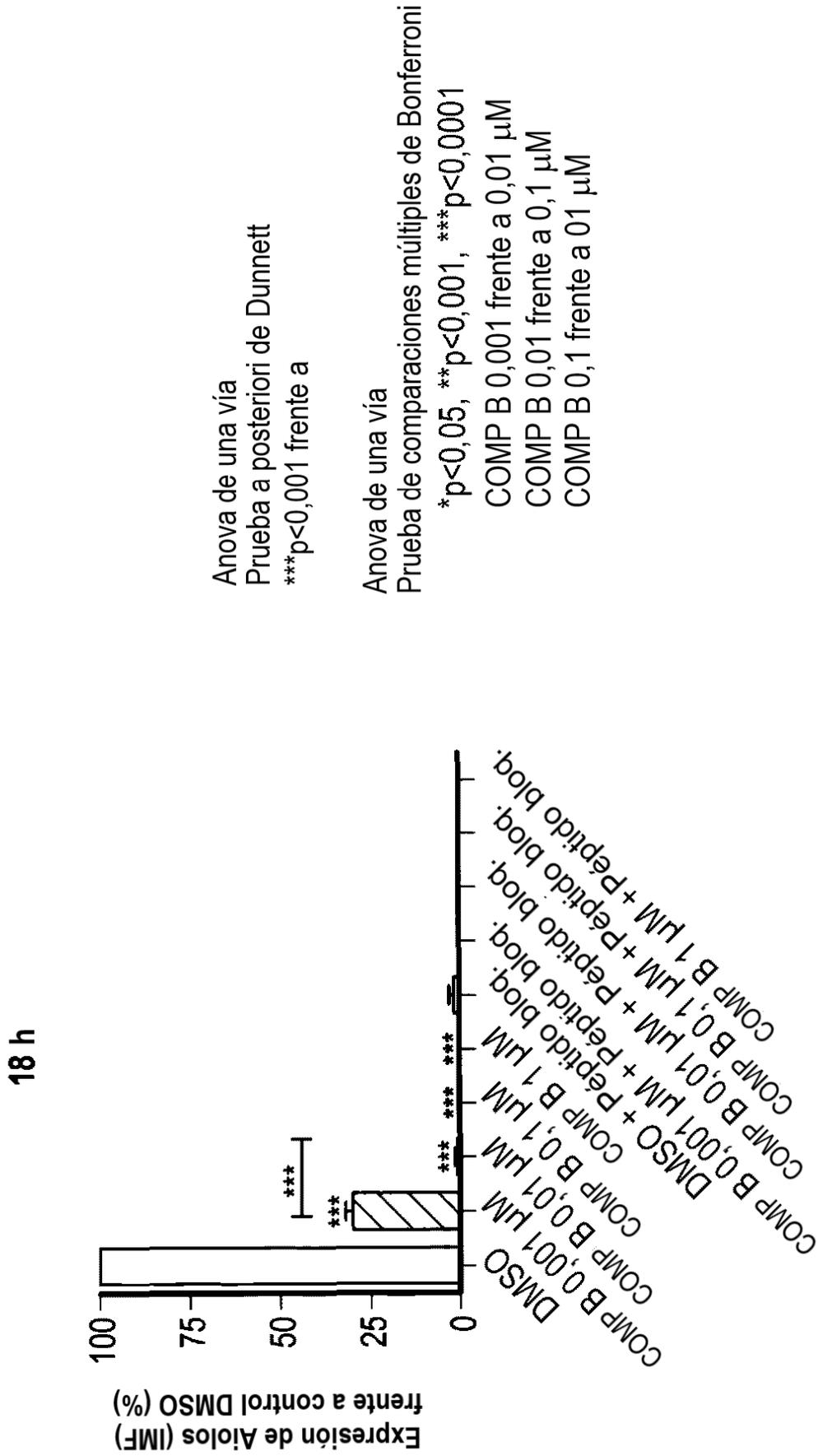


FIG. 3C

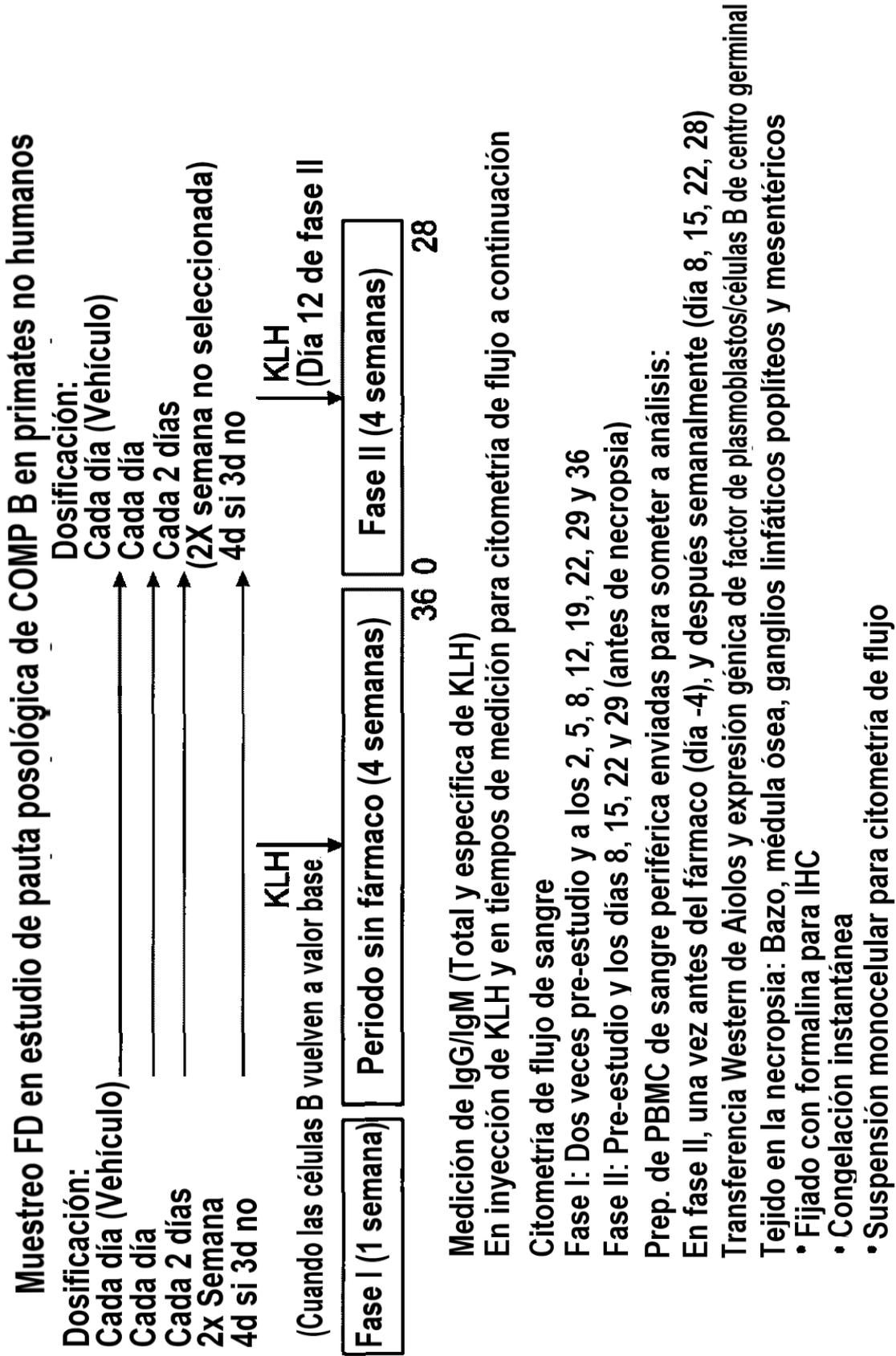


FIG. 4

COMP B en estudio de pauta posológica de respuesta de anticuerpos dependiente de T (TDAR) en monos

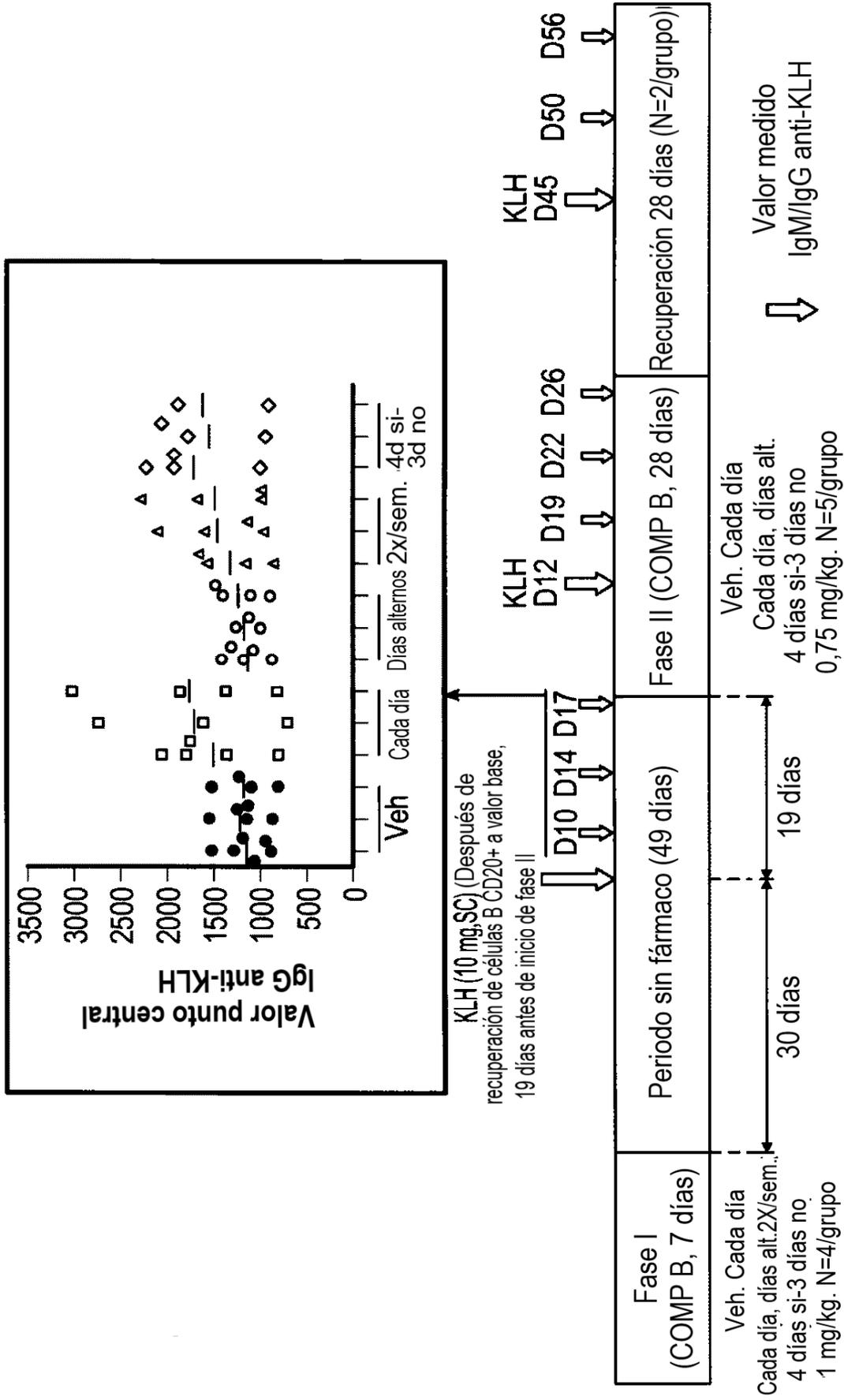


FIG. 5

Estudio en macacos cangrejeros, grupos de tratamiento

Grupo N°	N° de machos ^{a,b}	Material de ensayo ^c	Pauta posológica	Nivel de dosis (mg Sal/kg)	Conc. dosis (mg Sal/kg)
1	5 ^d	Vehículo ^d	Cada día	0	0
2	5	COMP B	Cada día	0,819	0,1629
3	5	COMP B	Días alternos ^e	0,819	0,1629
4	5	COMP B	Días 1-4,8-11, 15-18 y 22-25 ^f	0,819	0,1629

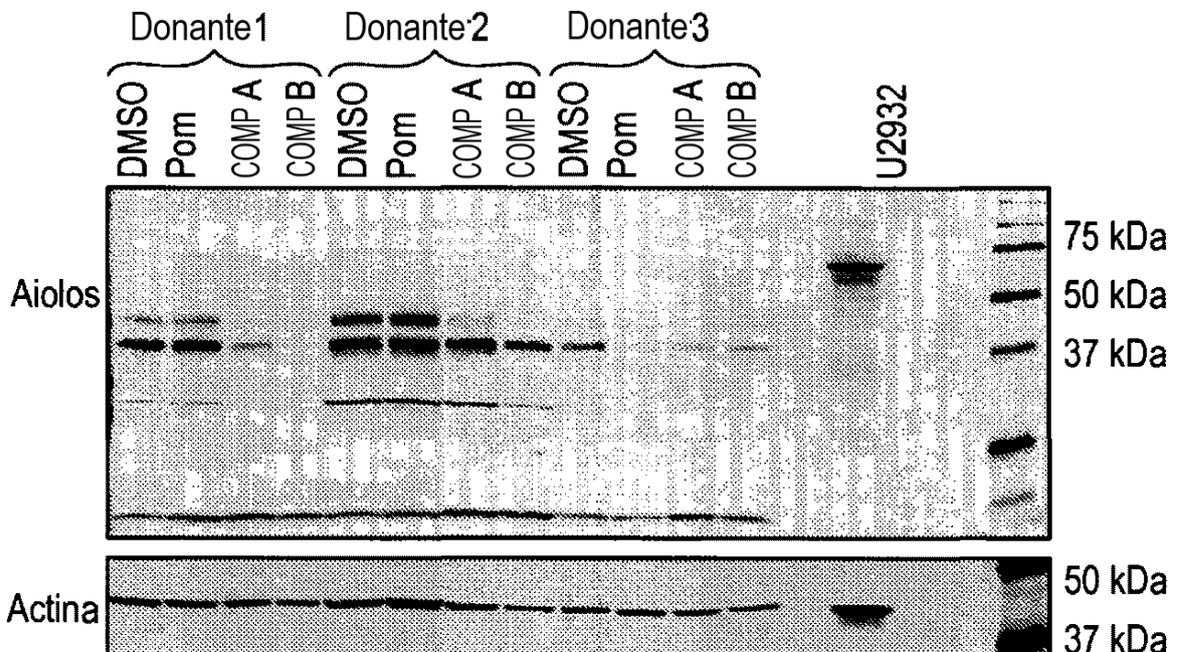
FIG. 6

Transferencia Western de Aiolos en sangre entera humana

hWBC de Bio Reclamation:Lote n°BRH532756

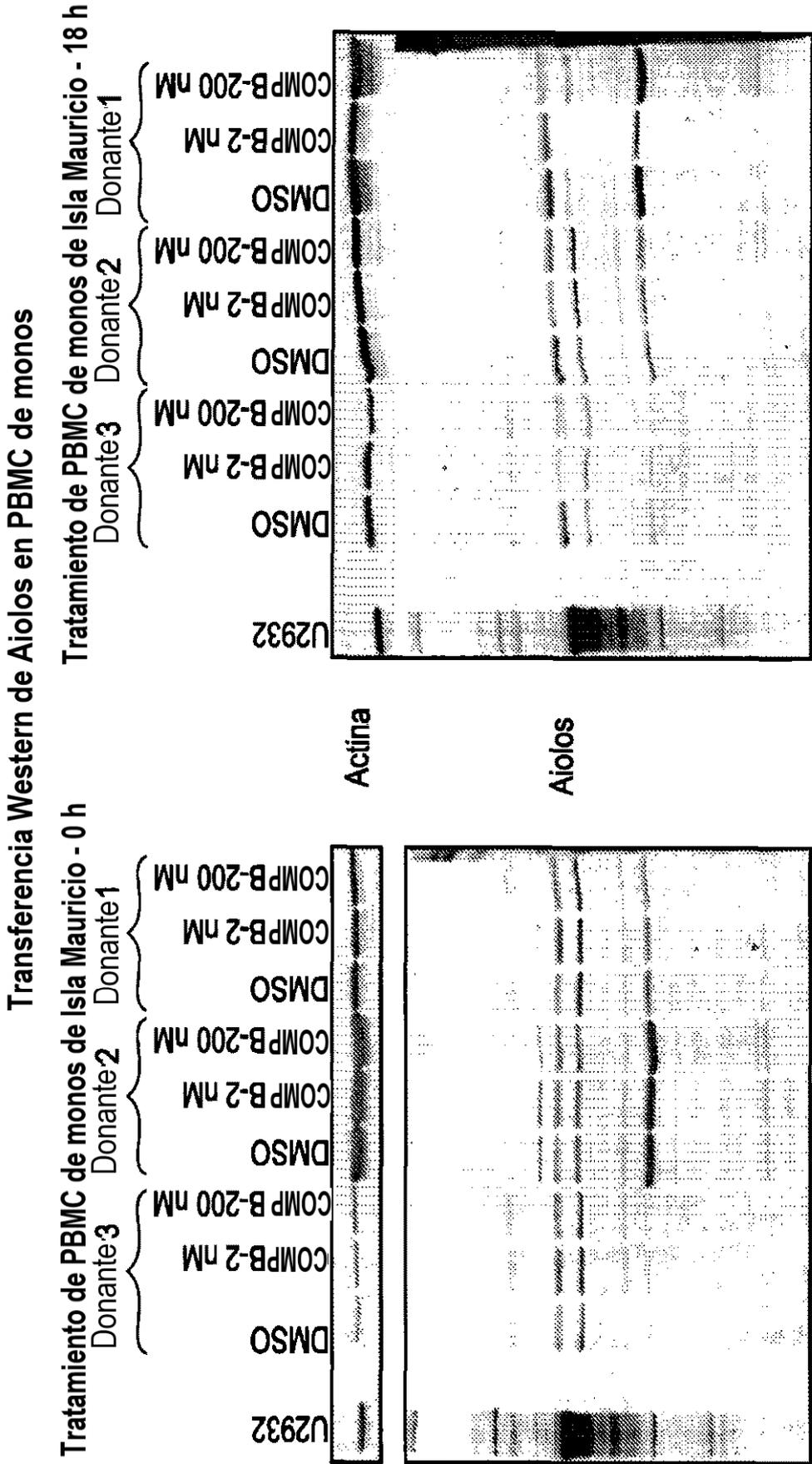
hWBC de Bio Reclamation:Lote n°BRH532757

hWBC de Bio Reclamation:Lote n°BRH532758



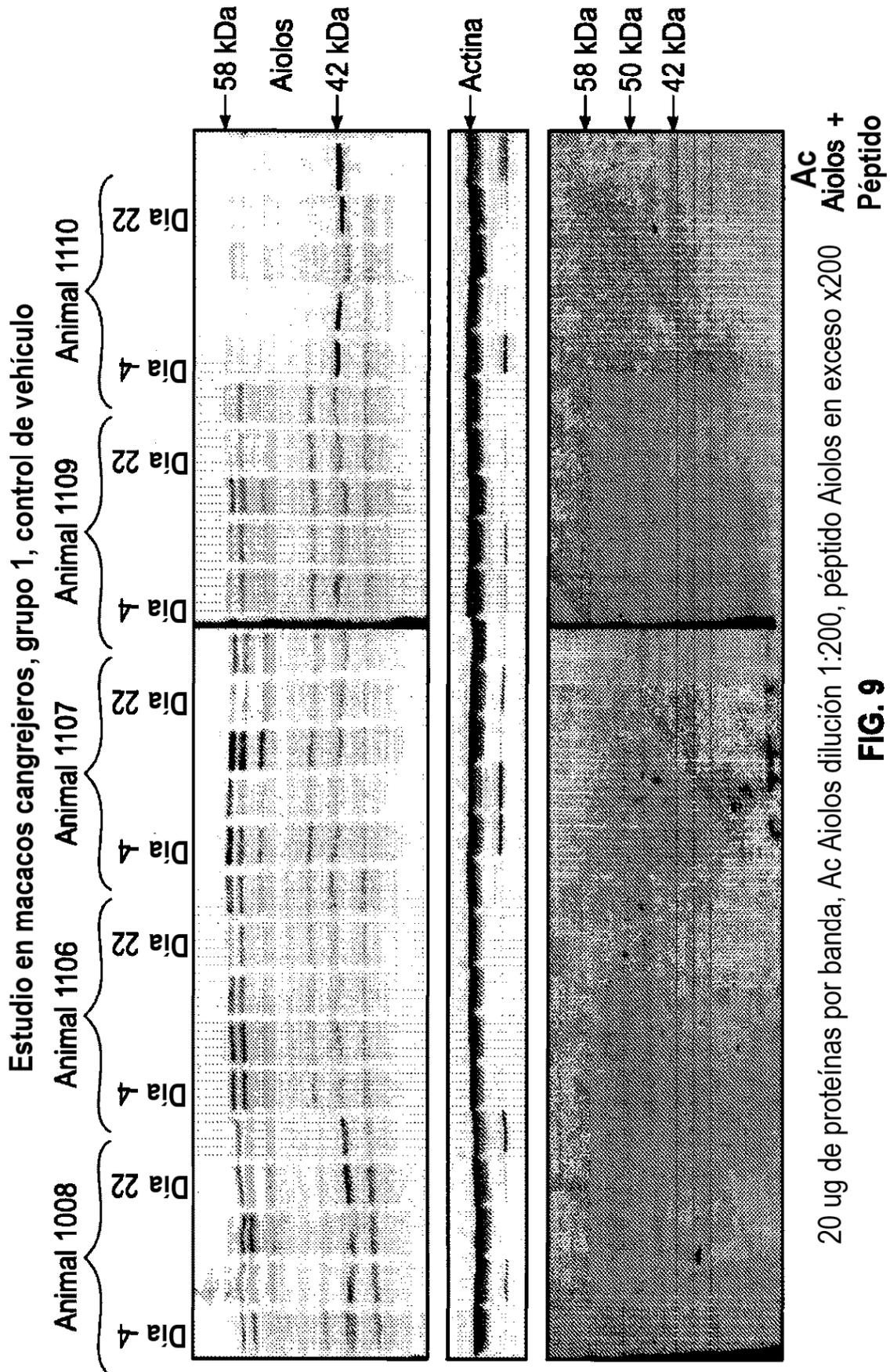
Las muestras de sangre completa se trataron con compuestos 250 nM durante 18 h y después se sometieron a la preparación de PBMC e IB

FIG. 7



~25 ug de proteínas por banda, Ac Aiolos dilución 1:200

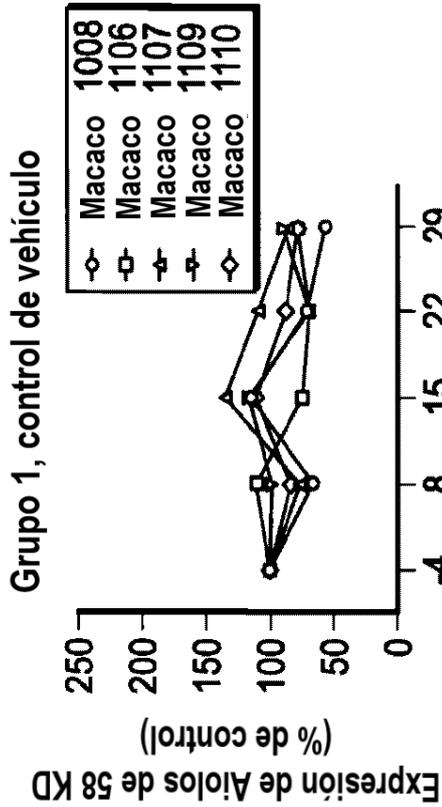
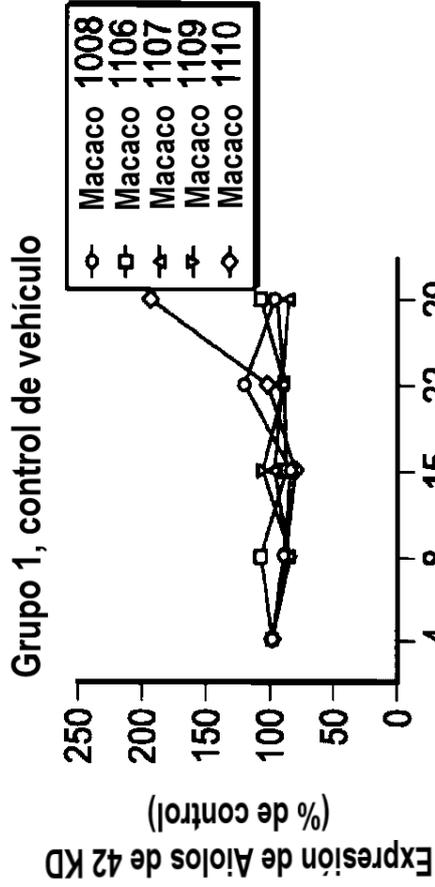
FIG. 8



20 ug de proteínas por banda, Ac Aiolos dilución 1:200, péptido Aiolos en exceso x200

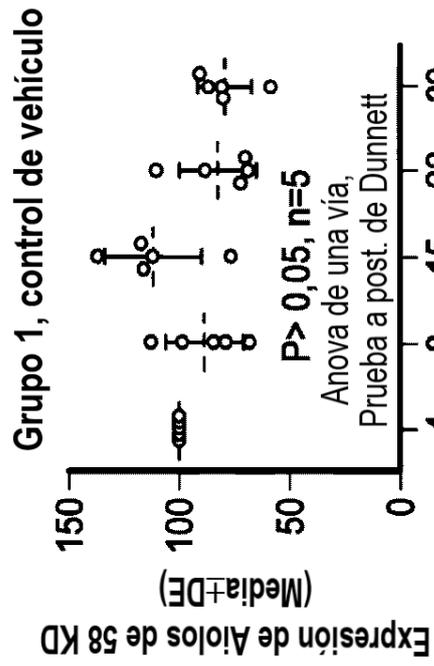
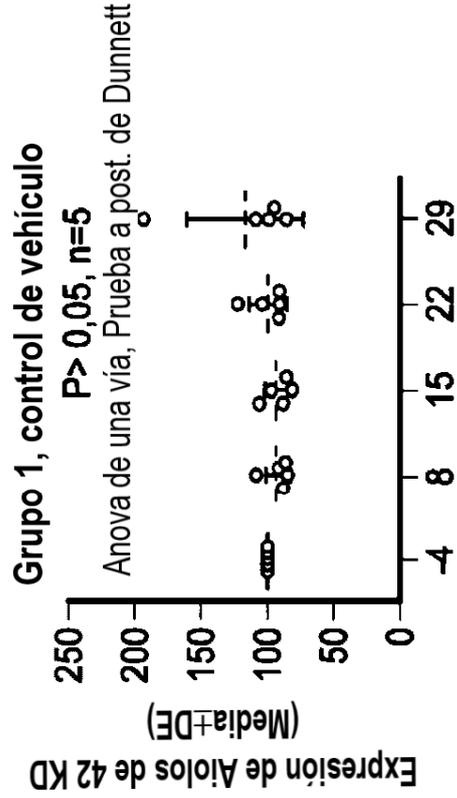
FIG. 9

Estudio en macacos cangrejeros, grupo 1, control de vehiculo



Días de tratamiento con fármaco

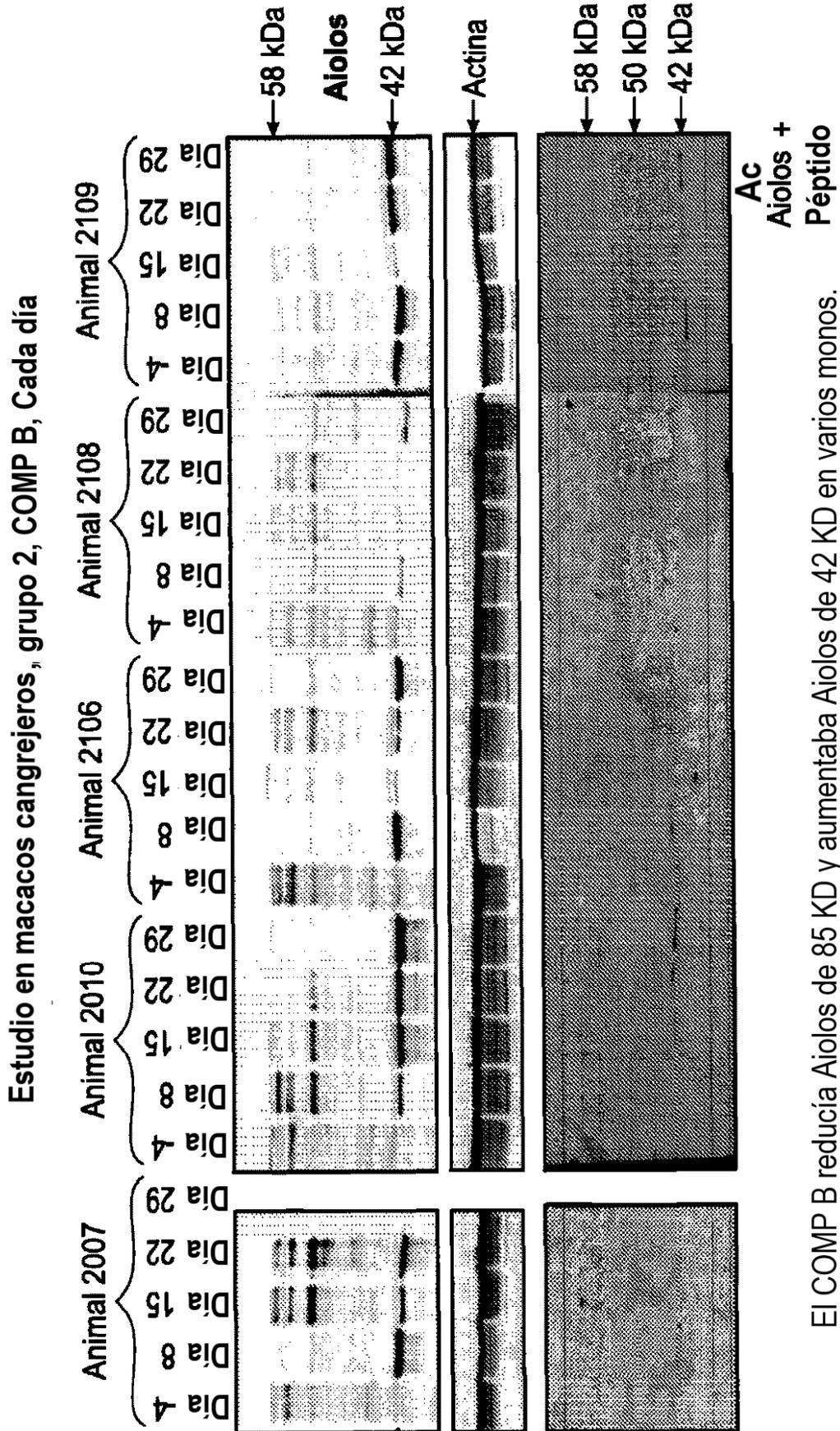
Días de tratamiento con fármaco



Días de tratamiento con fármaco

Días de tratamiento con fármaco

FIG. 10



El COMP B reducía Aiolos de 85 KD y aumentaba Aiolos de 42 KD en varios monos.

FIG. 11

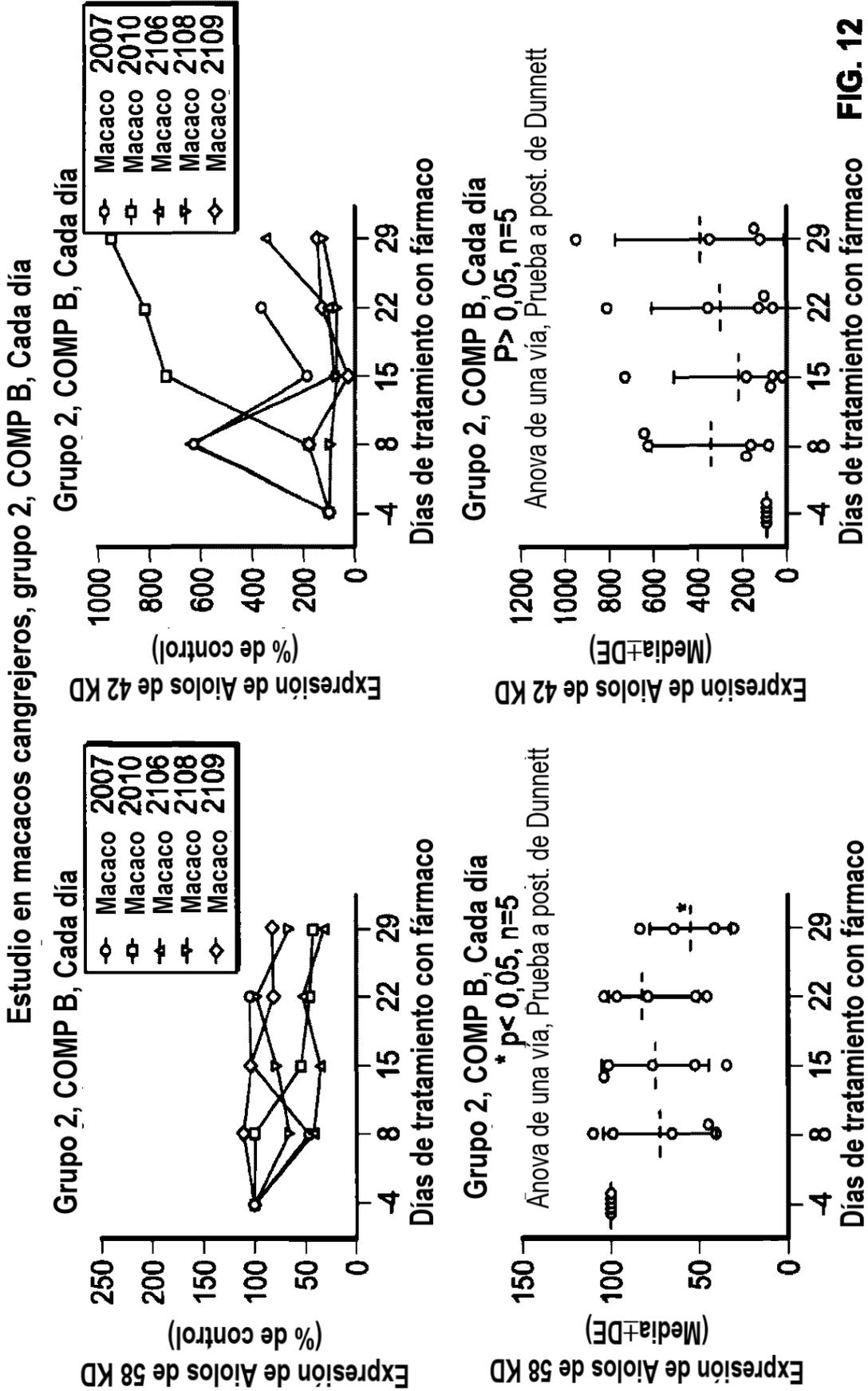
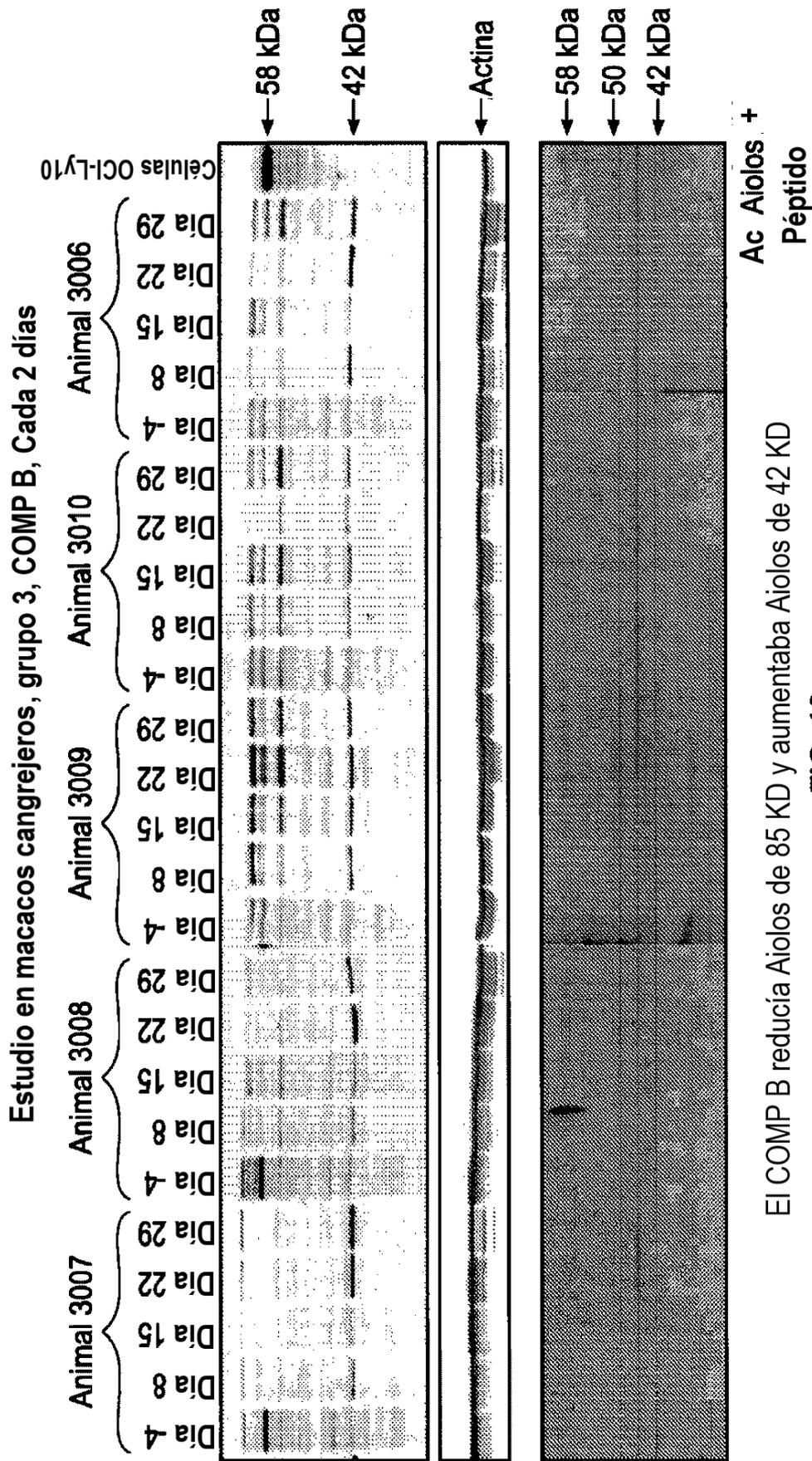


FIG. 12



El COMP B reduce Aiolos de 85 KD y aumentaba Aiolos de 42 KD

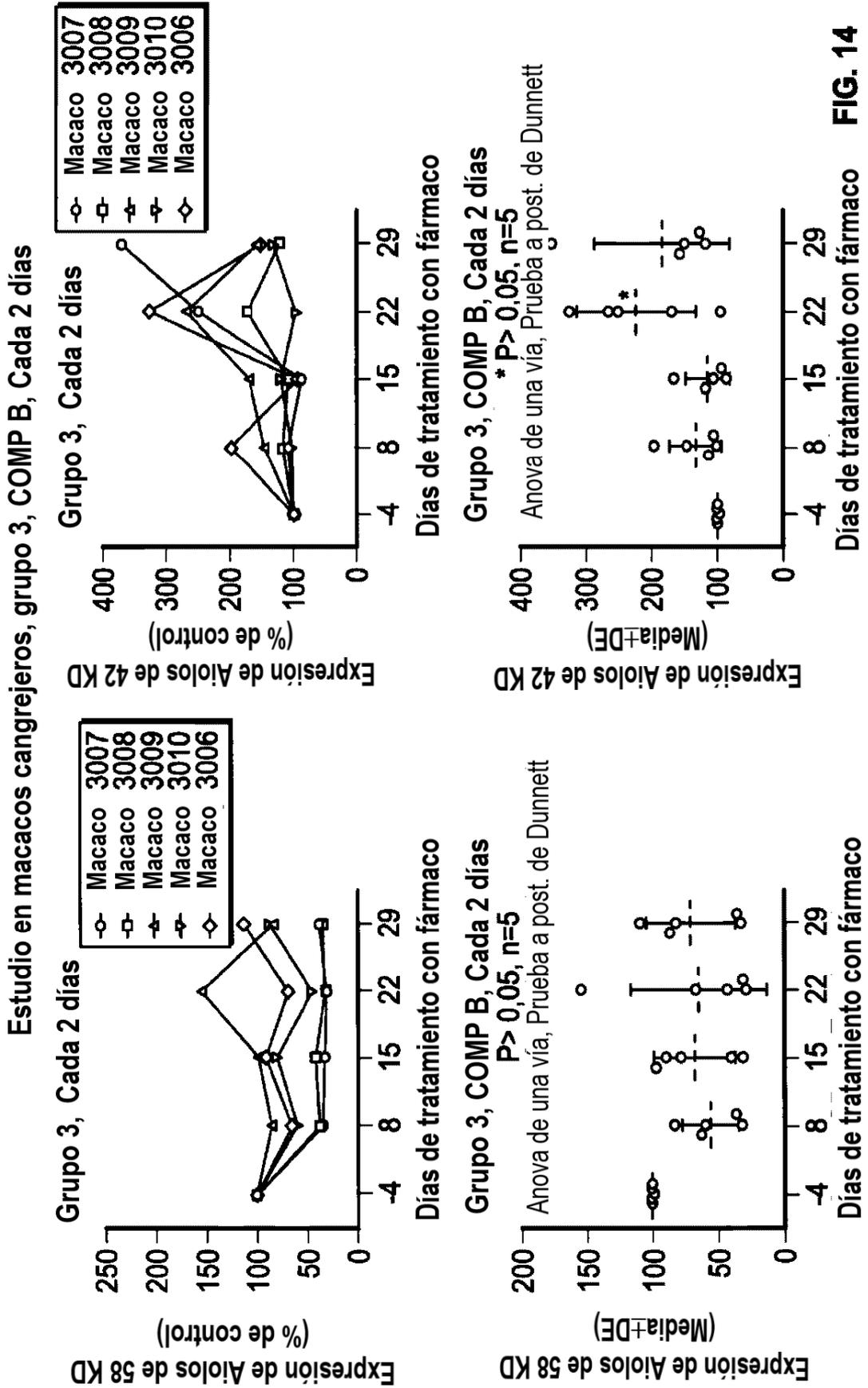
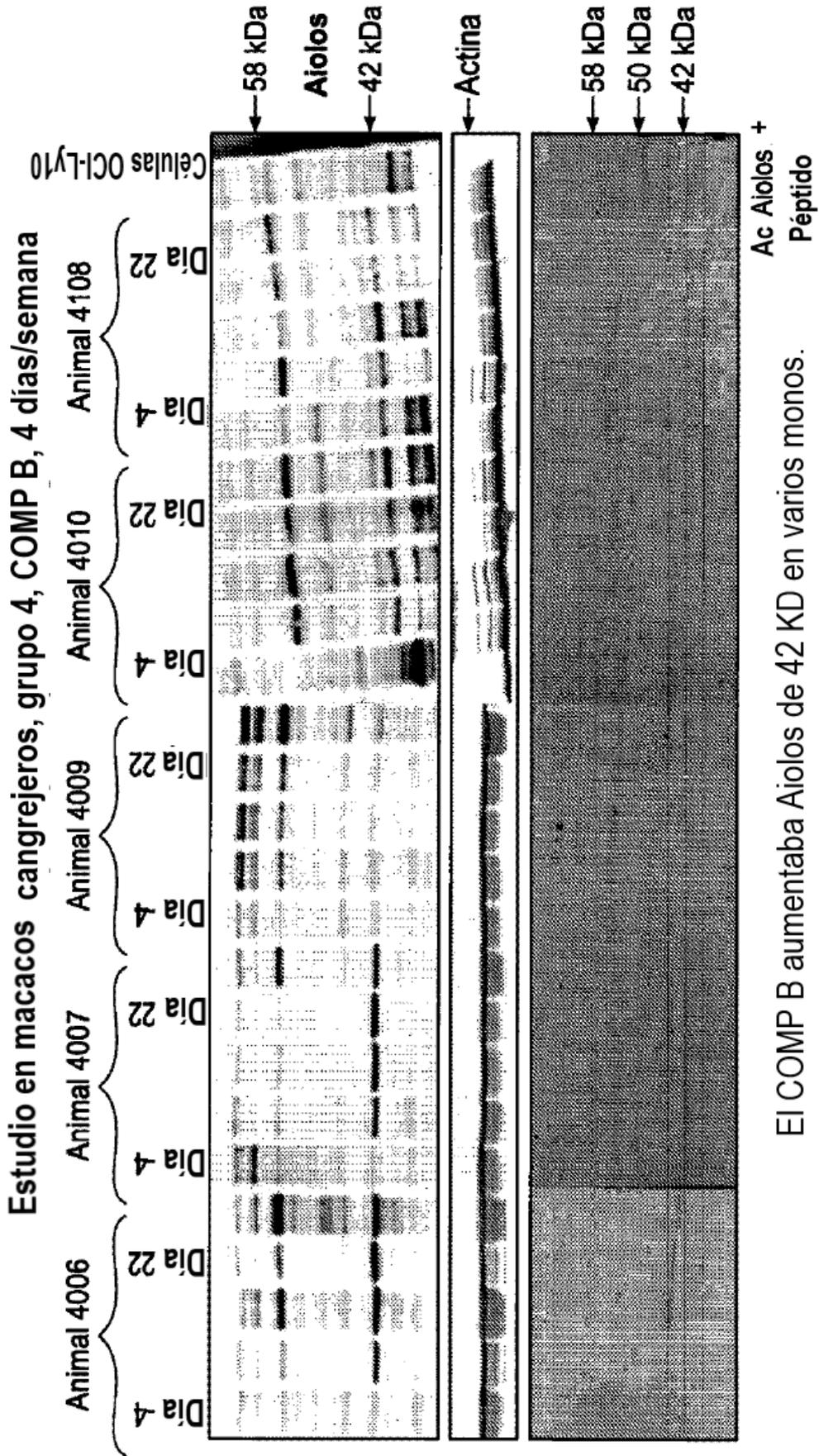


FIG. 14



El COMP B aumentaba Aiolos de 42 KD en varios monos.

FIG. 15

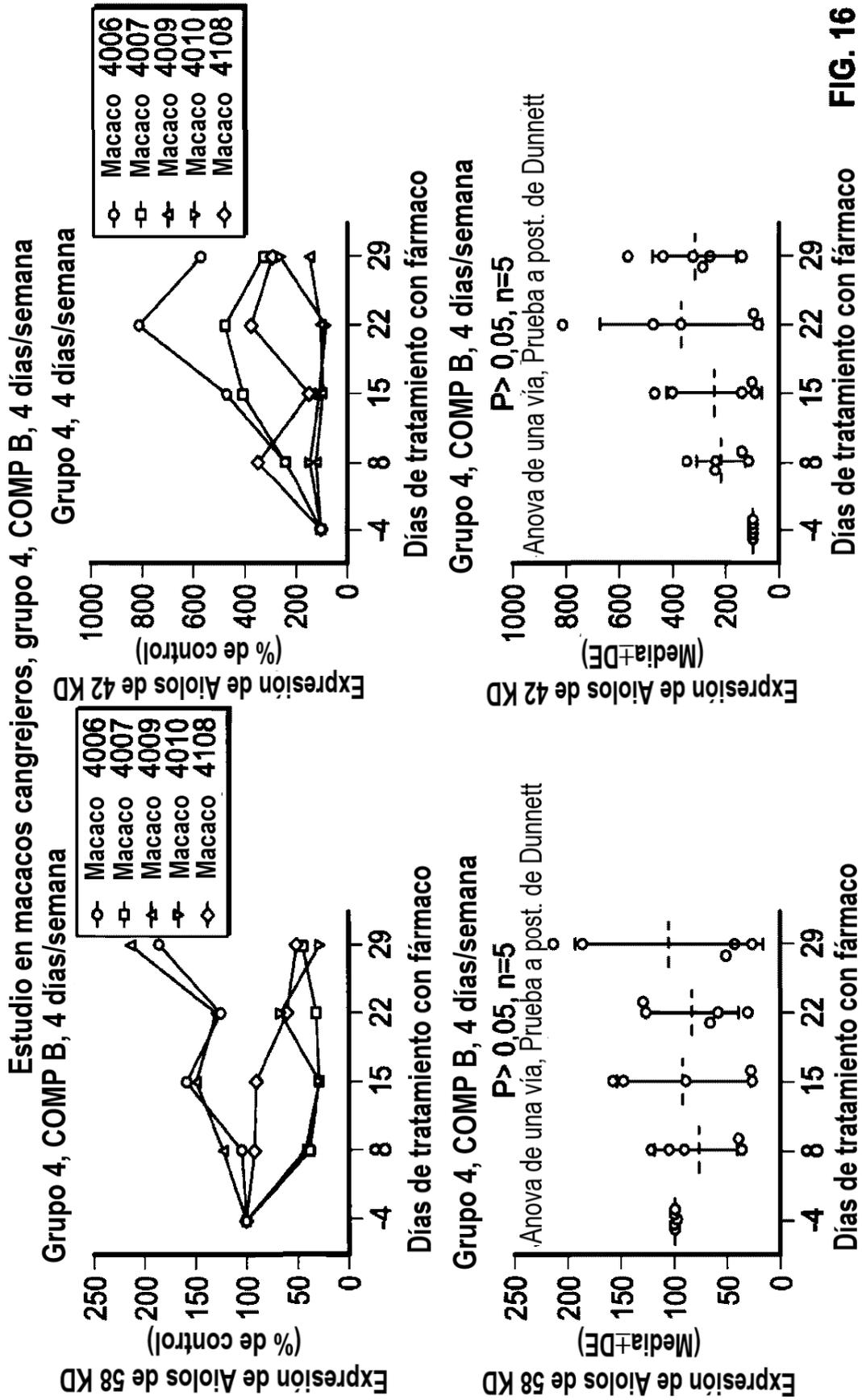
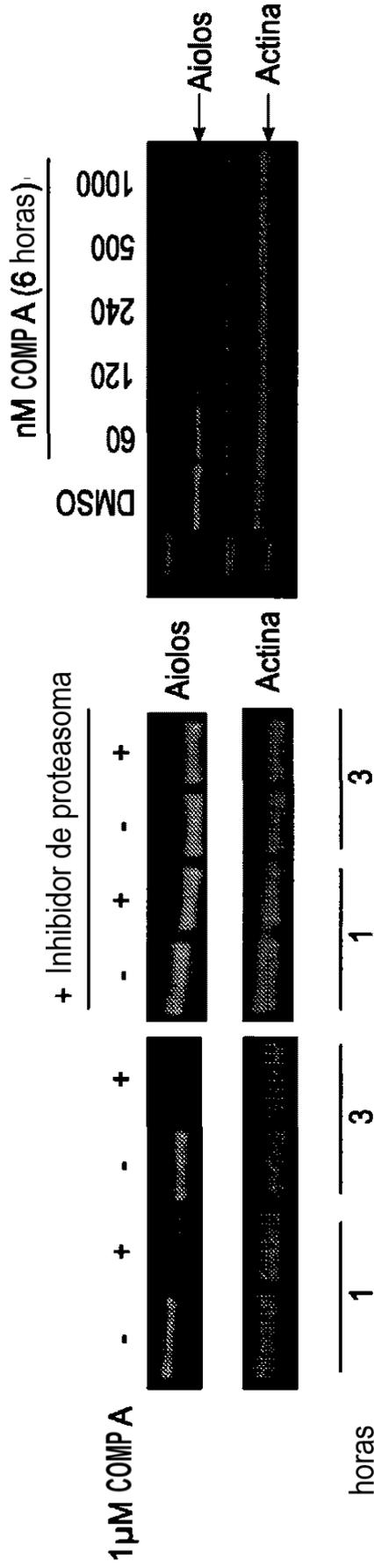


FIG. 16

Los IMiD regulan el factor de transcripción Aiolos a través de la degradación en células T



• El COMP A inhibe la expresión de la proteína Aiolos de una forma dependiente de la concentración en concentraciones clínicamente relevantes

FIG. 17

El efecto diferencial de los IMiD en la proteína Aiolos parece que se correlaciona con la actividad antiproliferativa del compuesto en células de mieloma

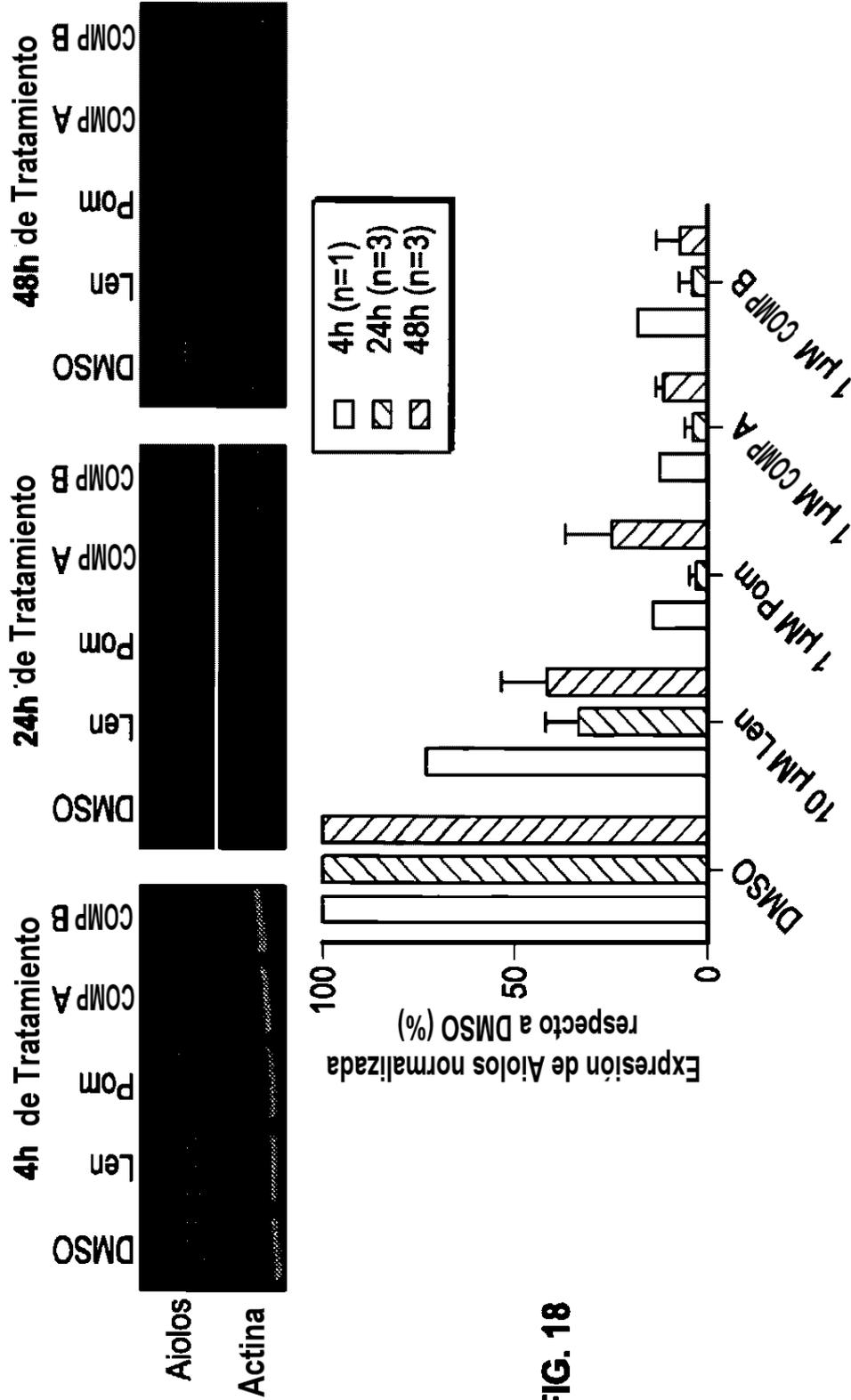


FIG. 18

• Pom, COMP A y COMP B tienen mayor potencia que la Len en la inhibición de la proteína de Aiolos en células de mieloma

La regulación de Aiolos por IMiD es anulada en líneas celulares con expresión baja de CRBN: Respuesta a la dosis con Pom a las 4 h

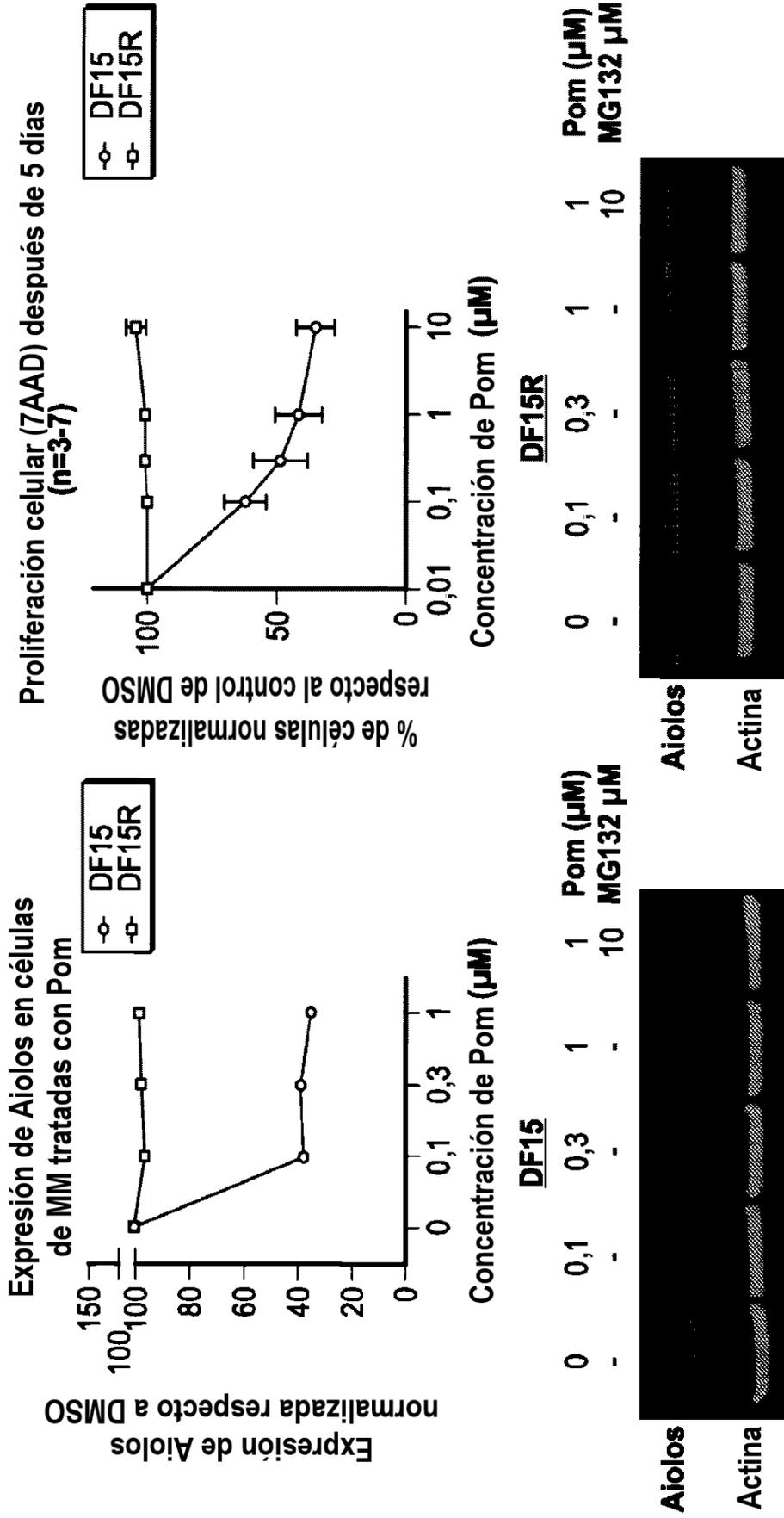
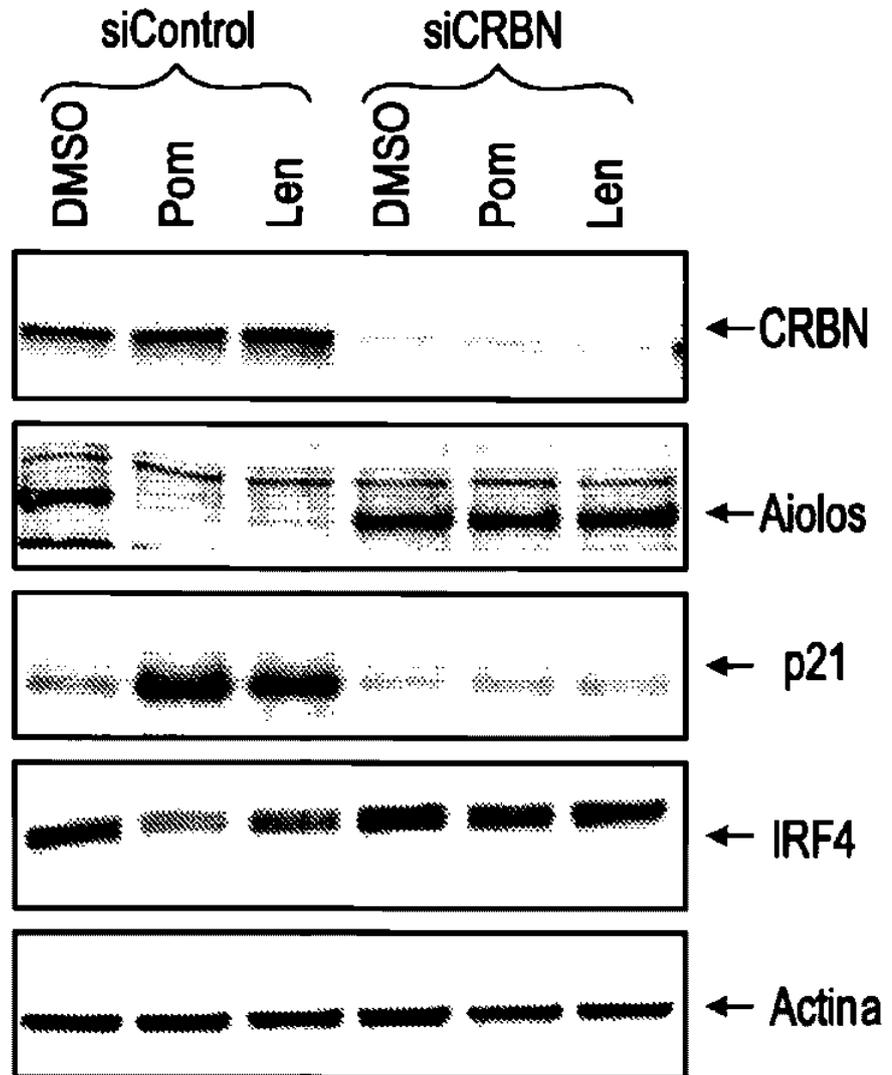


FIG. 19

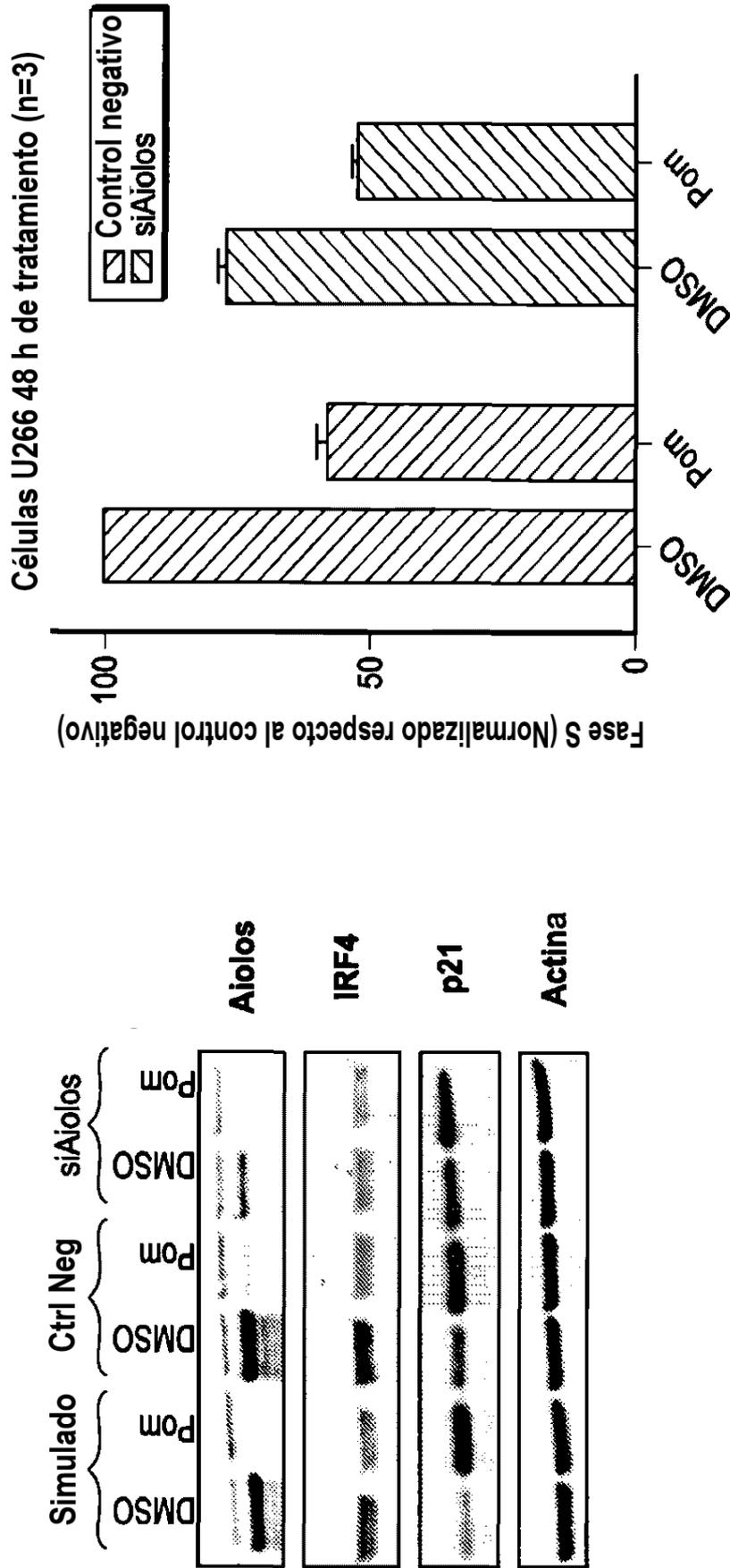
La pérdida de CRBN previene la regulación por disminución de Aiolos por la lenalidomida y pomalidomida



• La disminución de la expresión de Aiolos por lenalidomida o pomalidomida requiere la proteína CRBN

FIG. 20

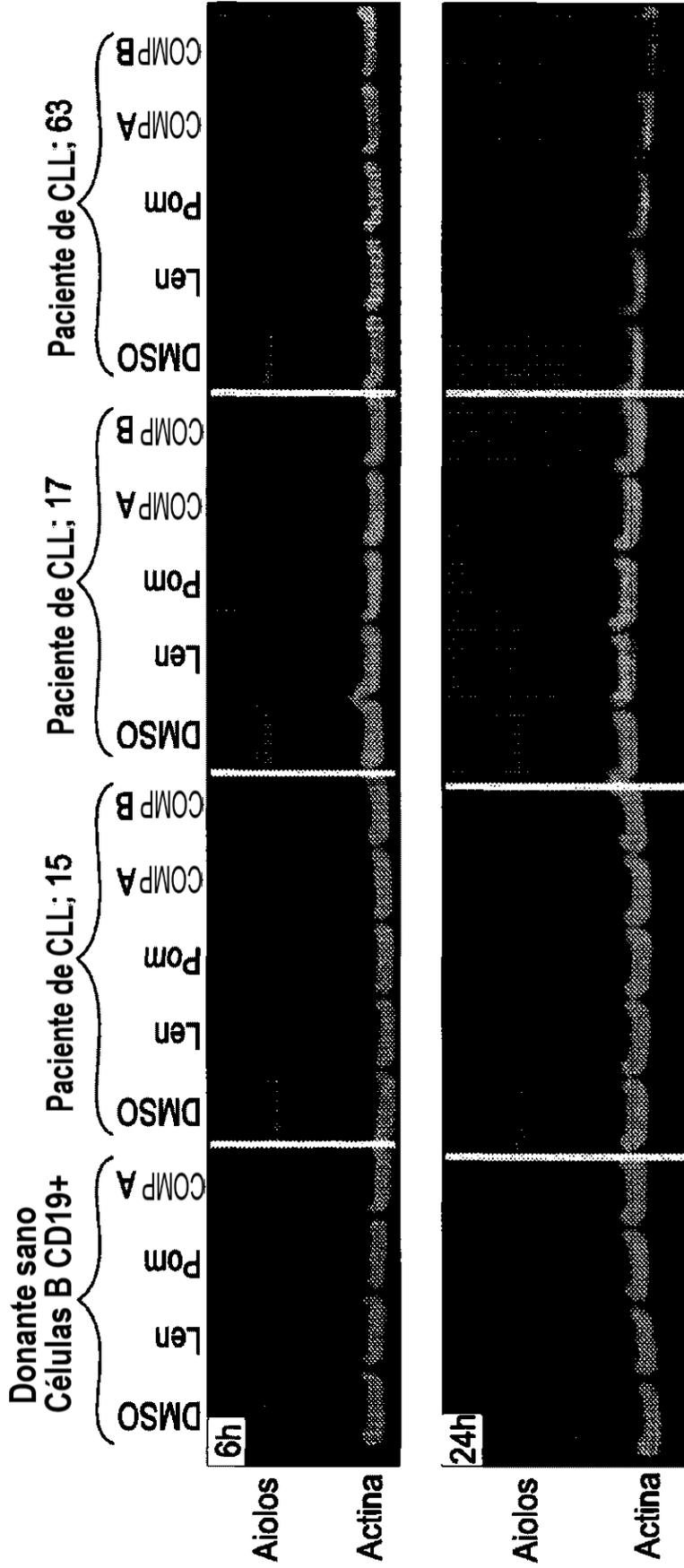
Similar a IMiD, la reducción de la expresión de Aiolos induce la expresión de p21, disminuye IRF4 y disminuye el número de células en fase S



• Aiolos es necesario para la expresión de IRF4 y progresión del ciclo celular en células U266

FIG. 21

Los IMiD afectan a los niveles de proteína Aiolos en células B de donantes sanos y de CLL



- La expresión de Aiolos es mayor en células B-CLL que en células B de donantes sanos
- El tratamiento con IMiD inhibe Aiolos en células B de pacientes de CLL

FIG. 22

Los IMiD inhiben la expresión de la proteína Aiolos en líneas de linfomas MCL y ABC DLBCL sensibles

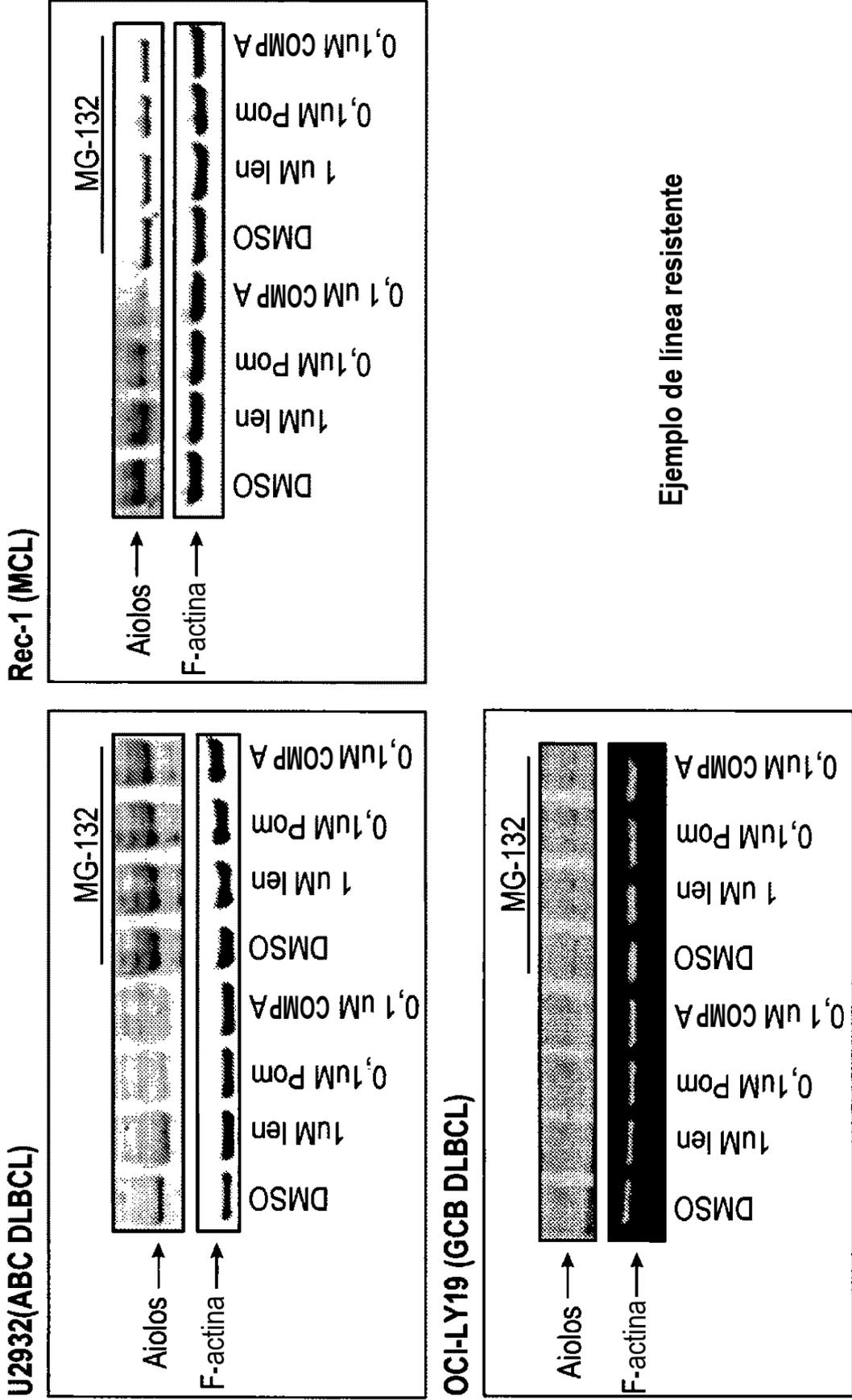


FIG. 23

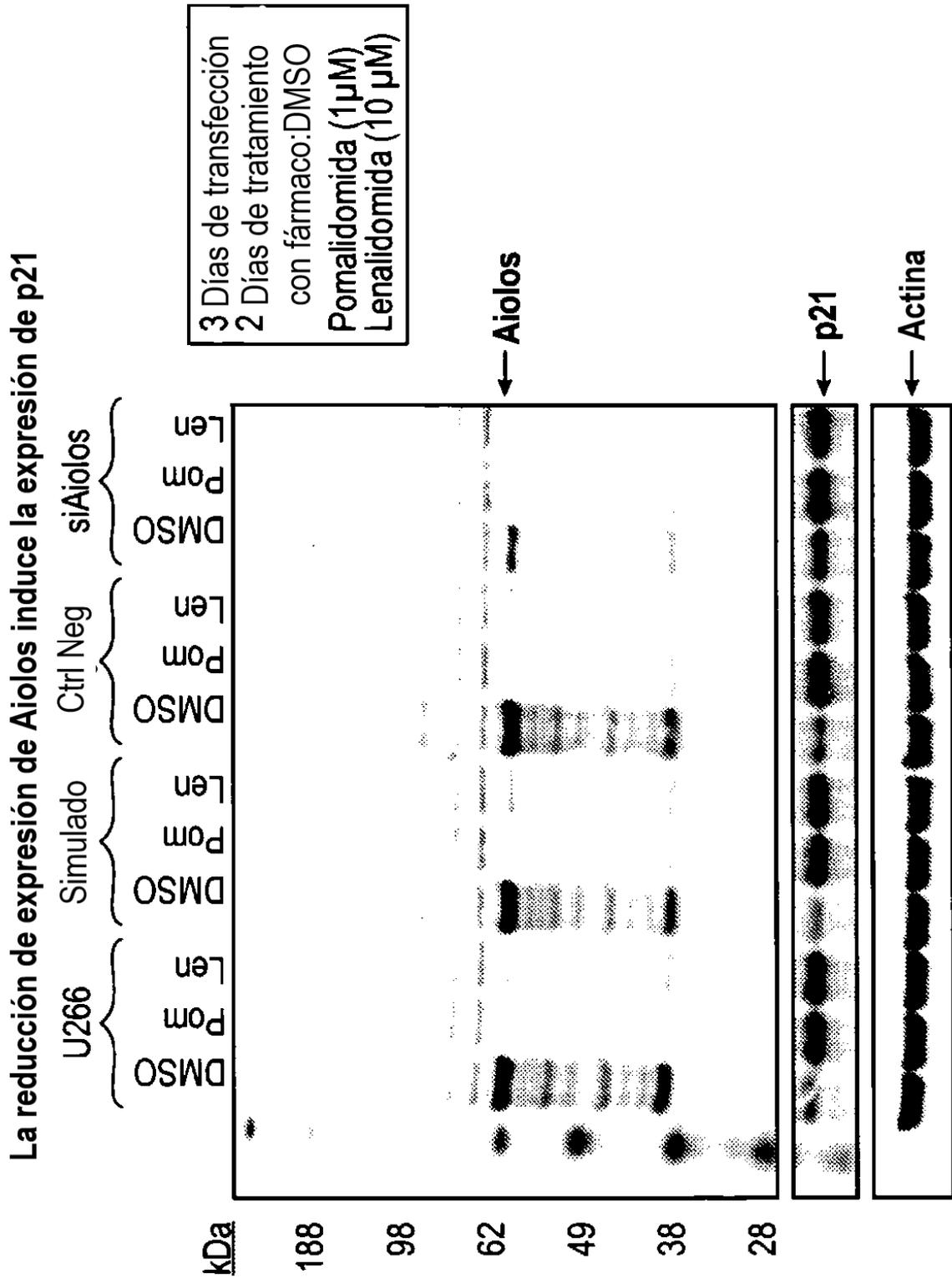


FIG. 24

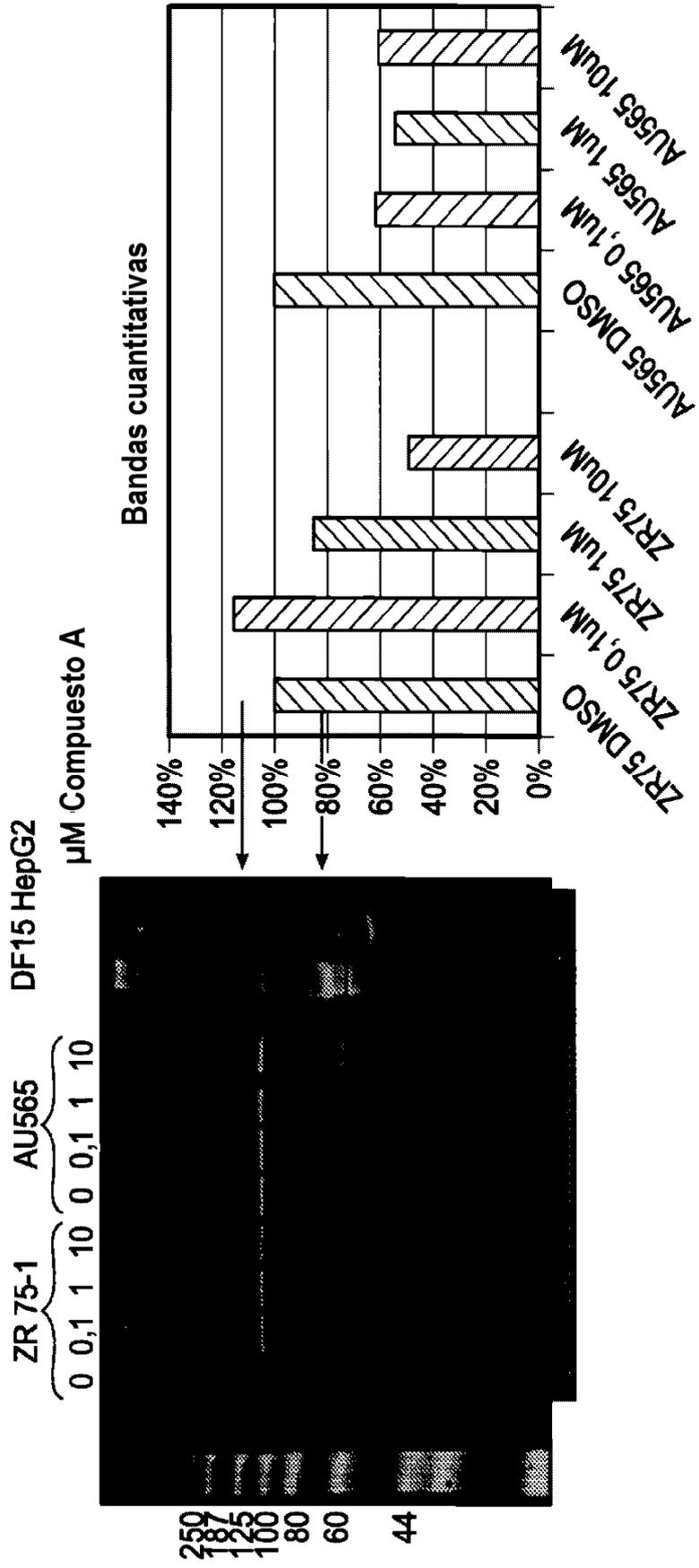


FIG. 25

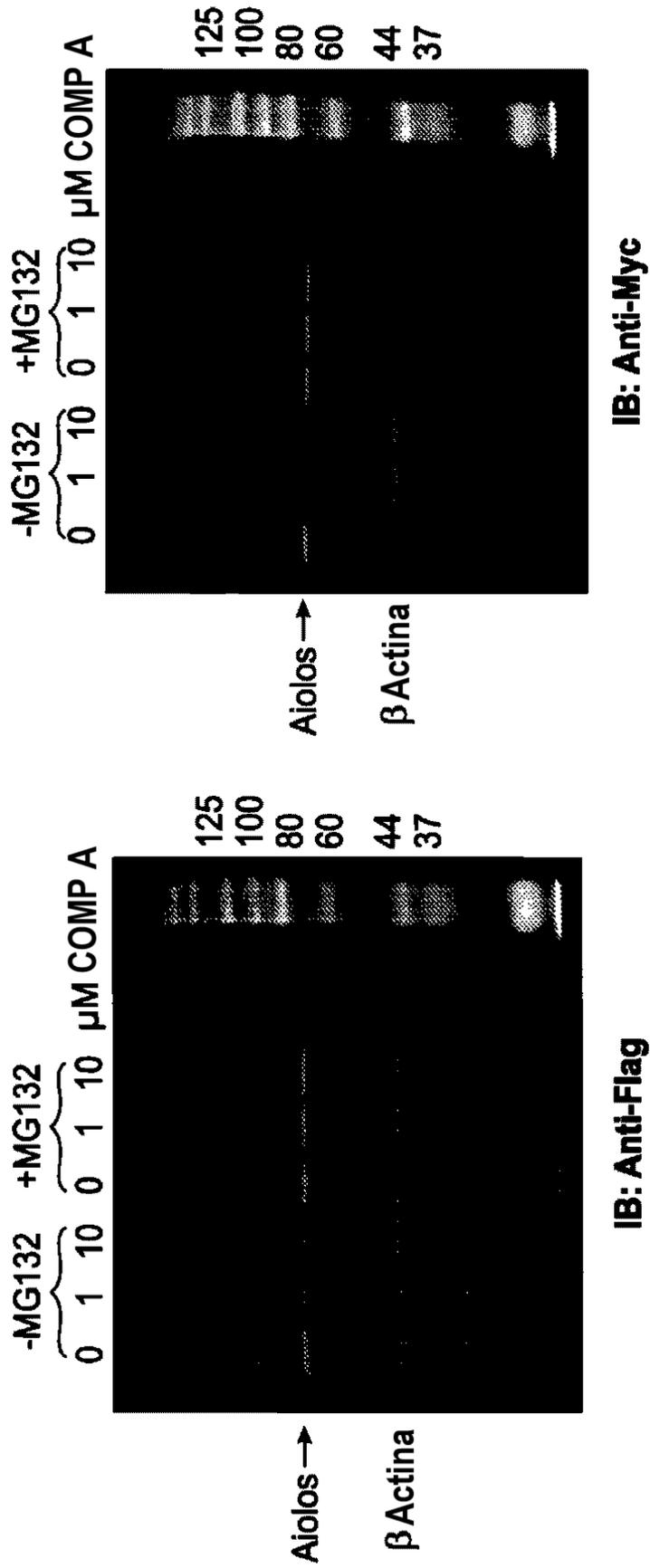
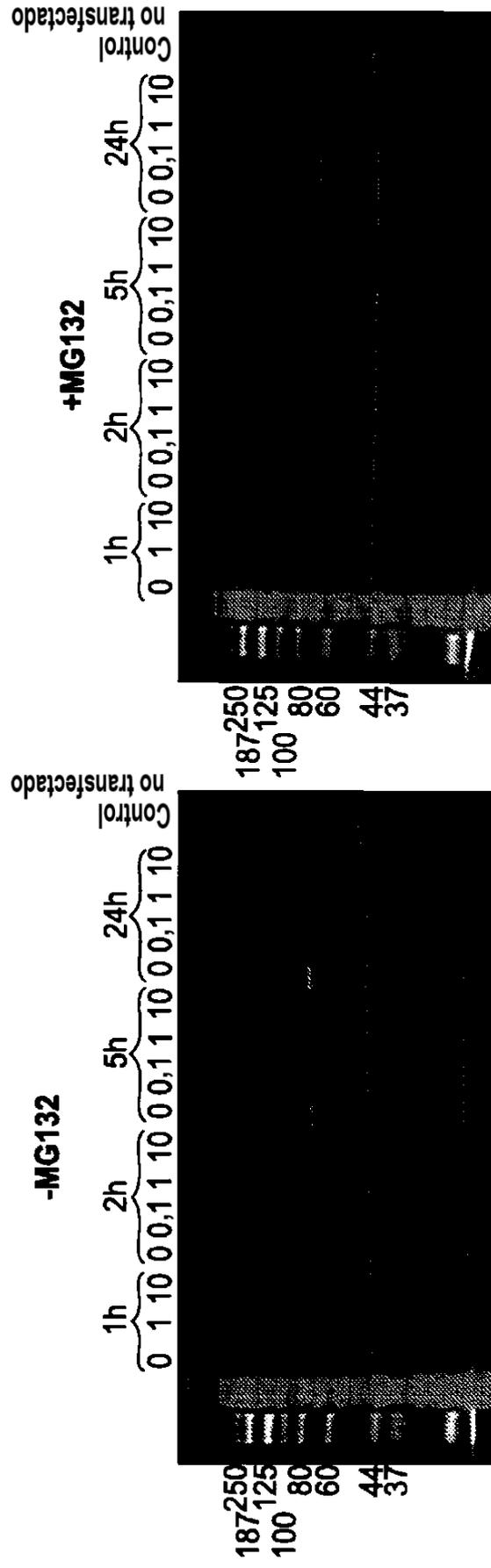


FIG. 26



IB: Anti-Myc

FIG. 27

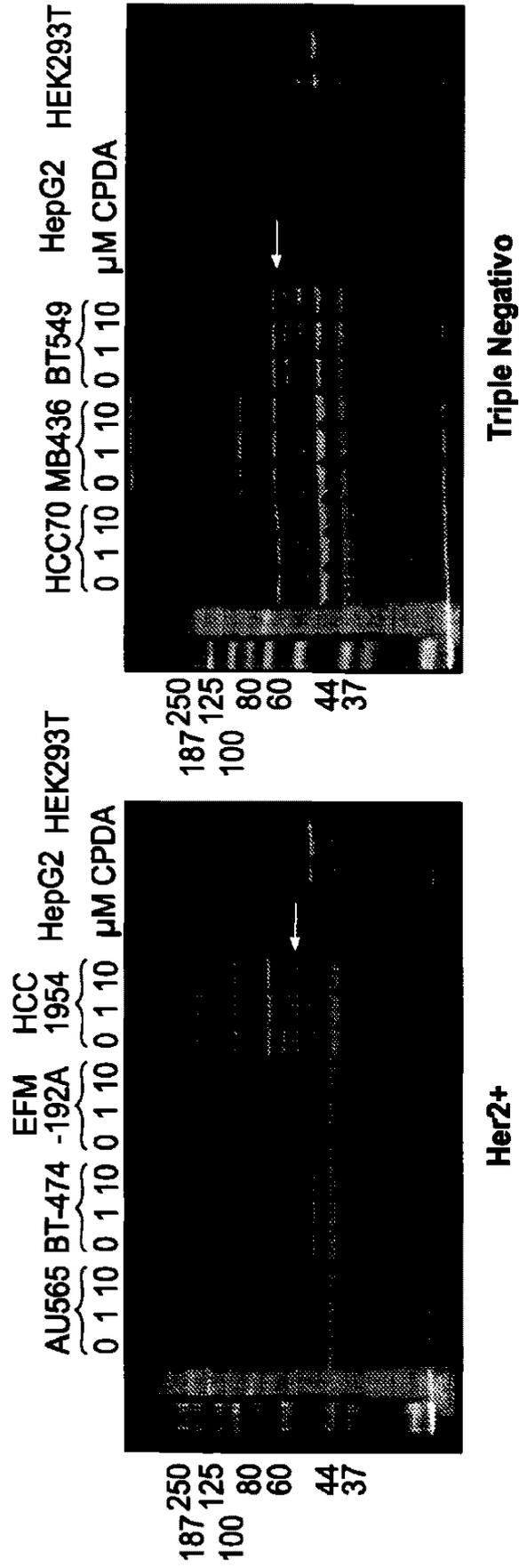


FIG. 28

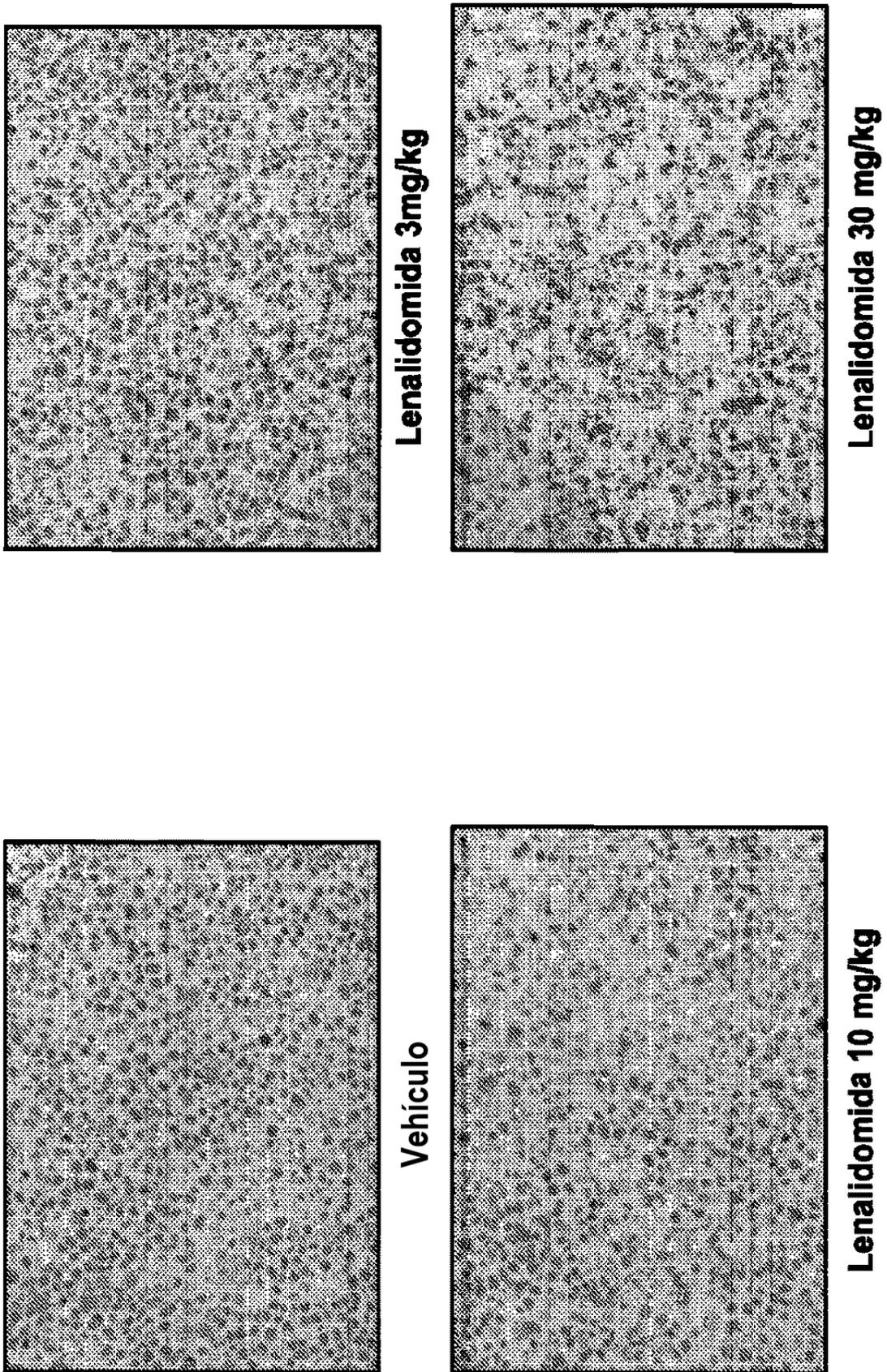
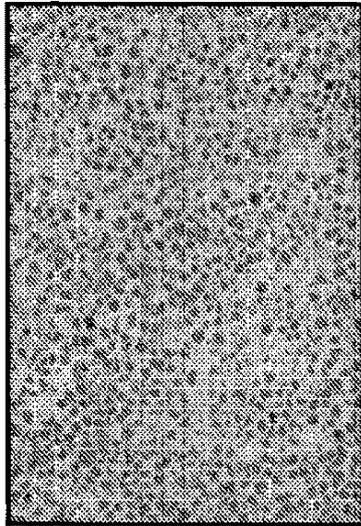
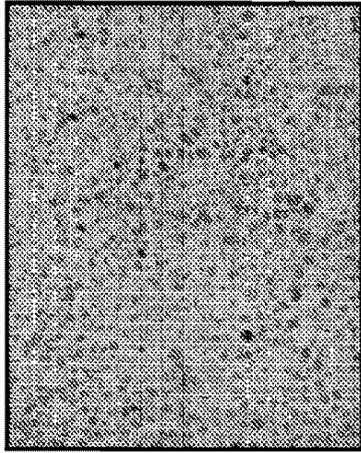


FIG. 29

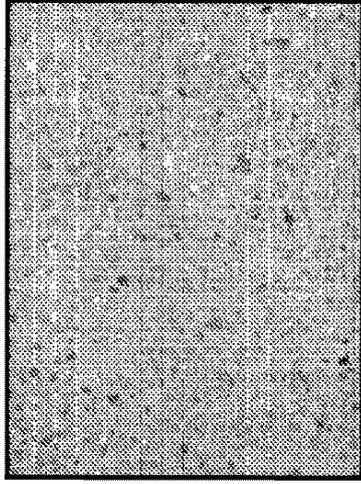


Vehículo

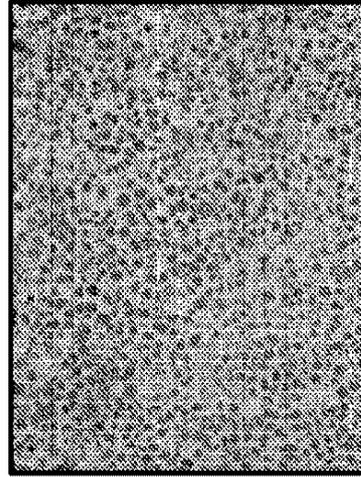


Compuesto A 3 mg/kg

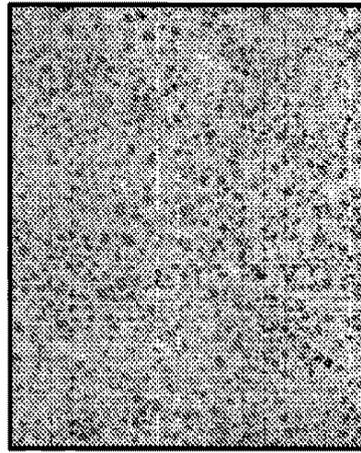
FIG. 30



Compuesto A 30 mg/kg

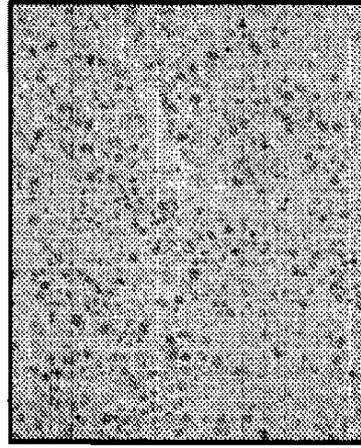


Vehículo

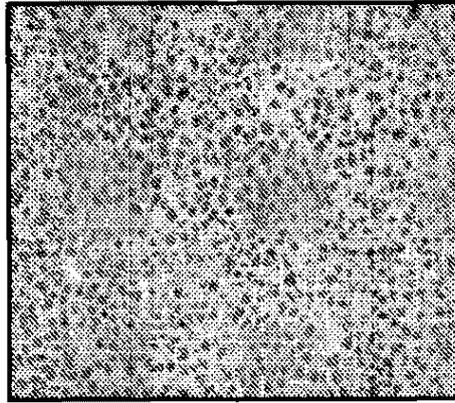


Isómero R del compuesto A 1,5 mg/kg

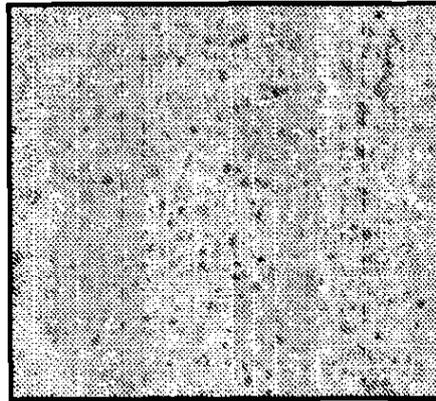
FIG. 31



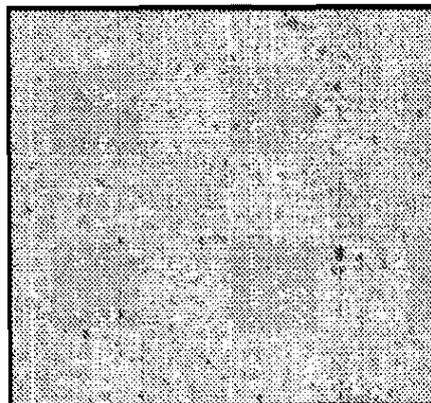
Isómero R del compuesto A 15 mg/kg



Vehículo



Isómero S del compuesto A 1,5 mg/kg



Isómero S del compuesto A 15 mg/kg

FIG. 32

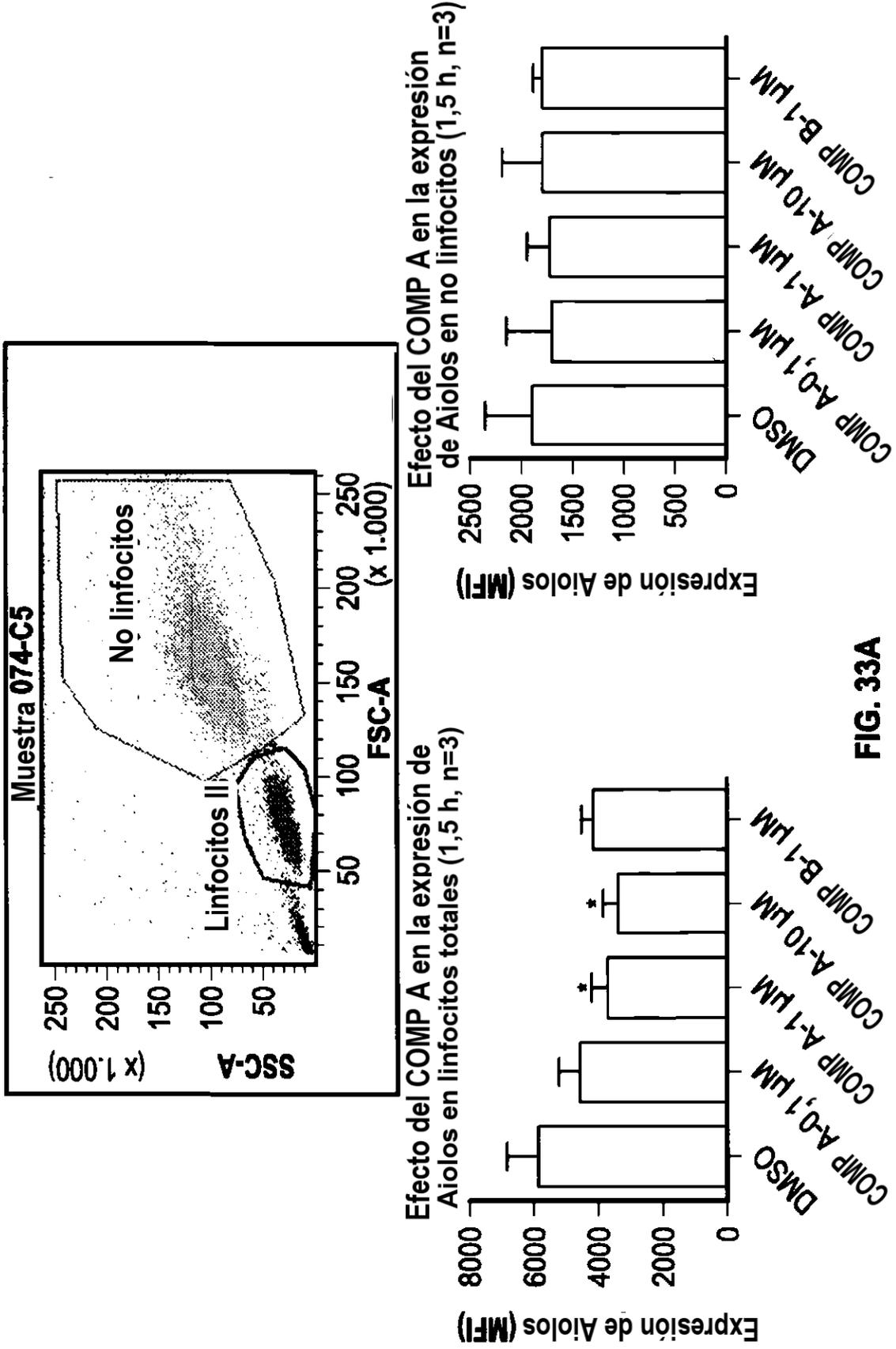
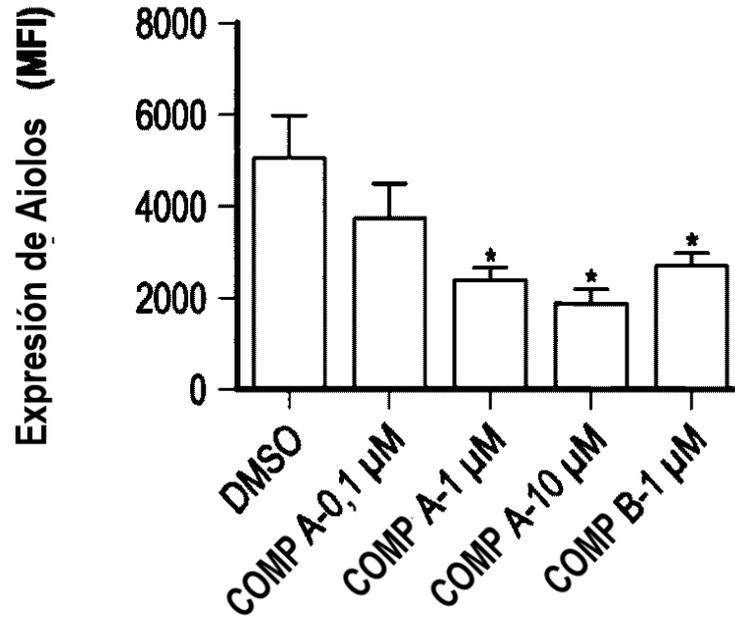


FIG. 33A

Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células T (1,5 h, n=3)



Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células T (1,5 h, n=3)

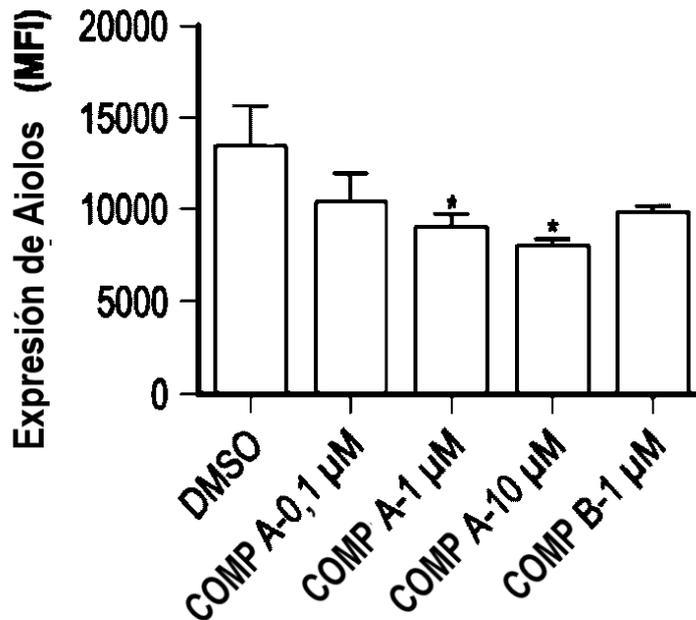


FIG. 33B

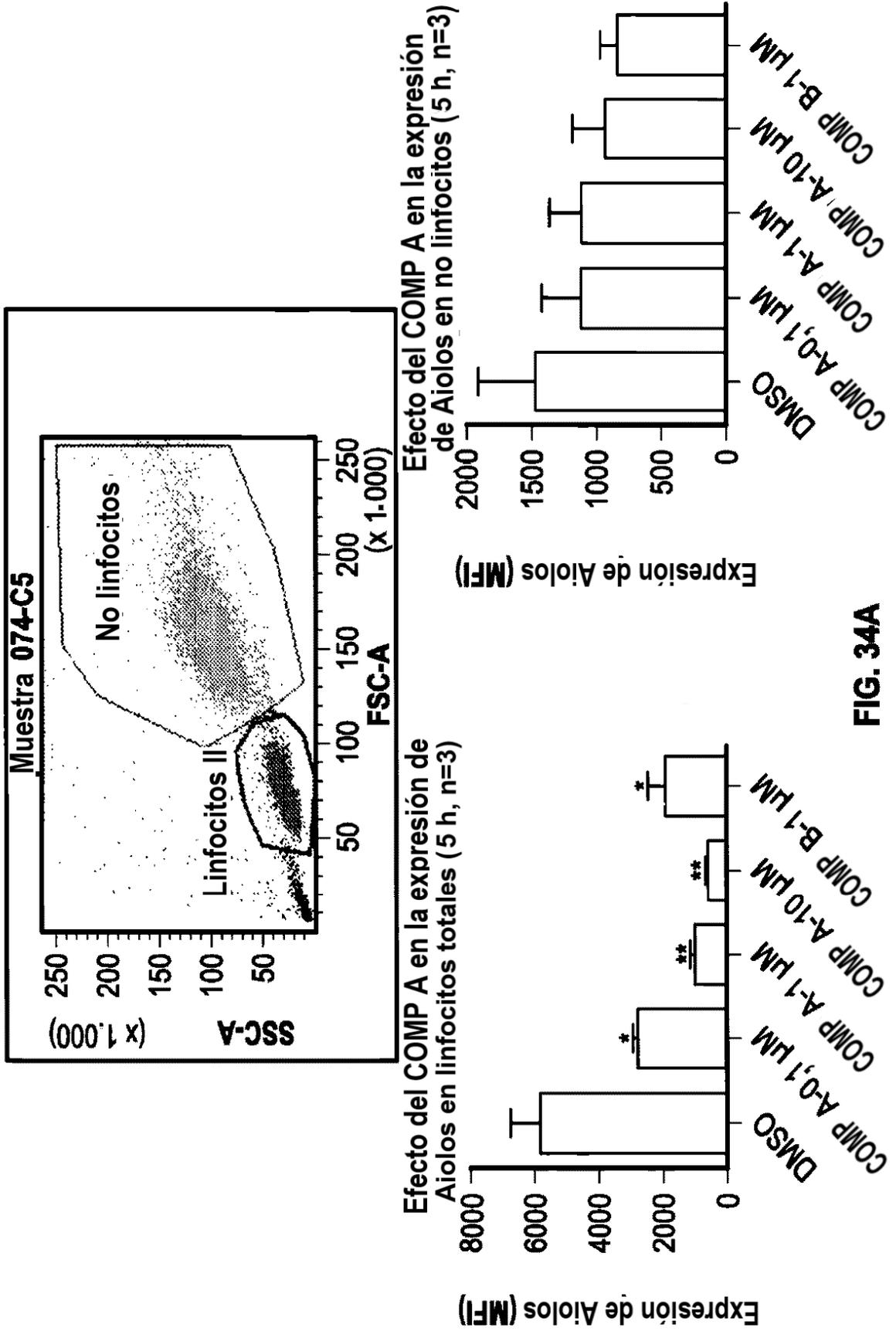
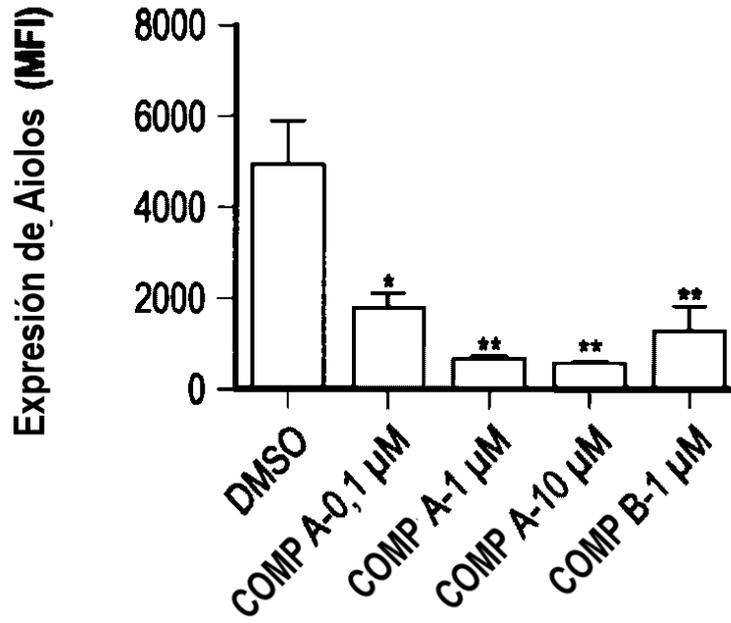


FIG. 34A

Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células T (5 h, n=3)



Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células B (5 h, n=3)

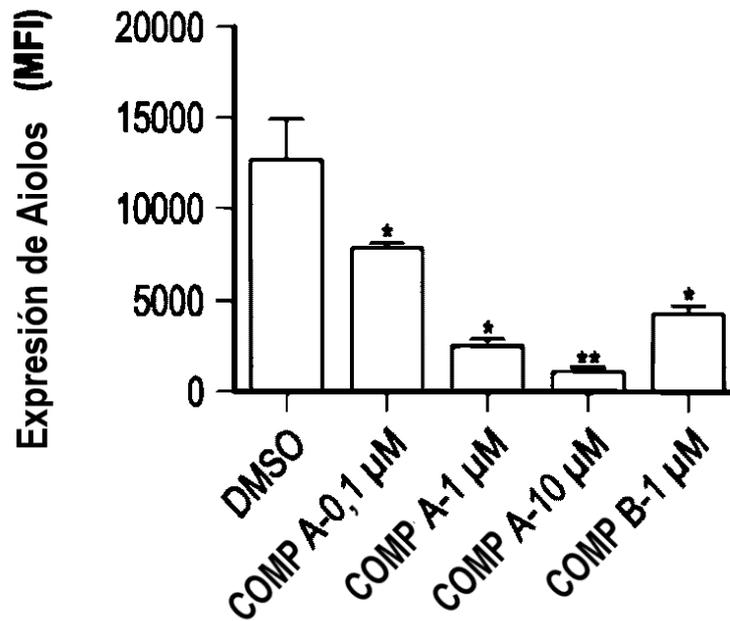


FIG. 34B

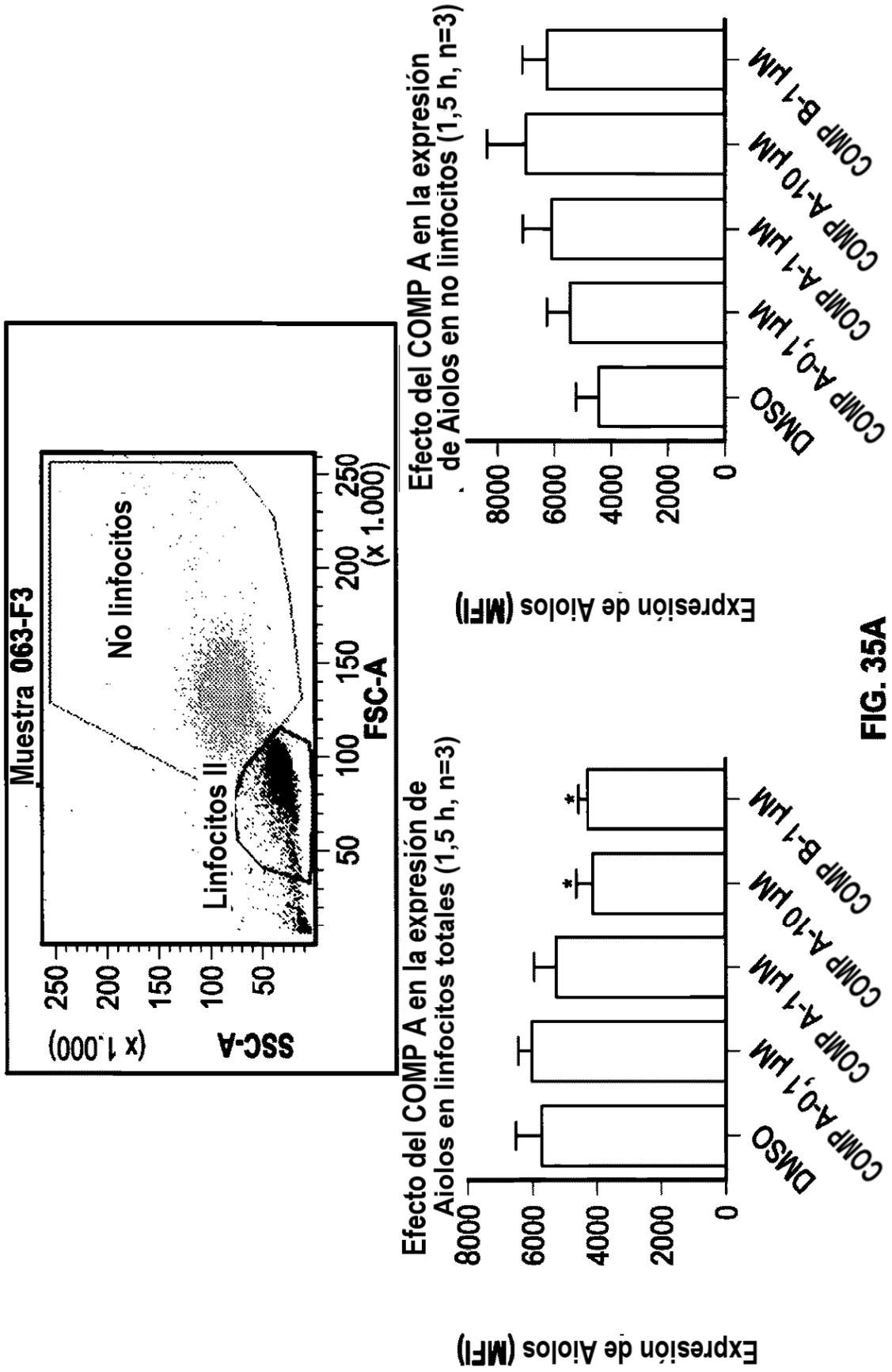
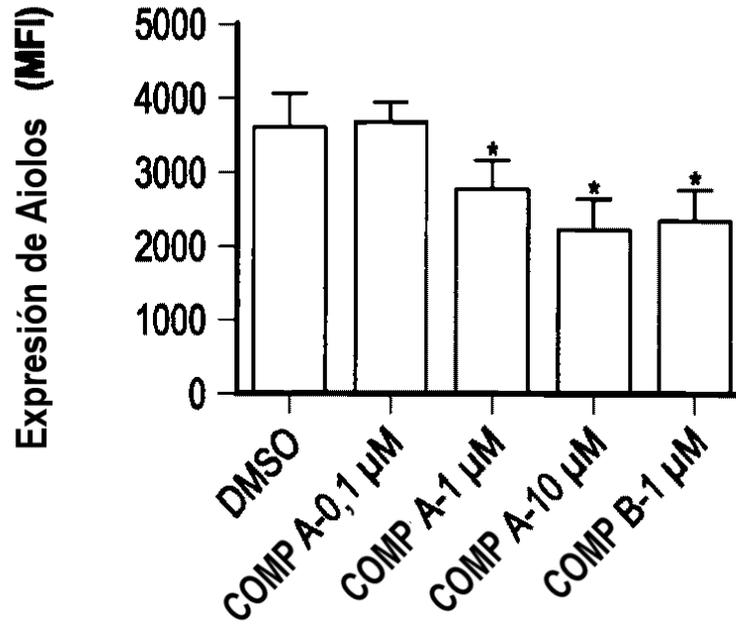


FIG. 35A

Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células T (1,5 h, n=3)



Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células B (1,5 h, n=3)

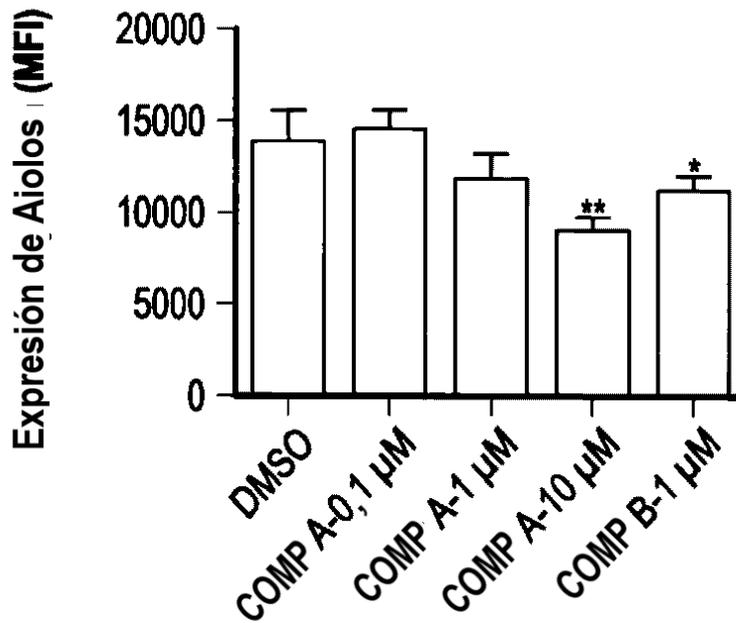


FIG. 35B

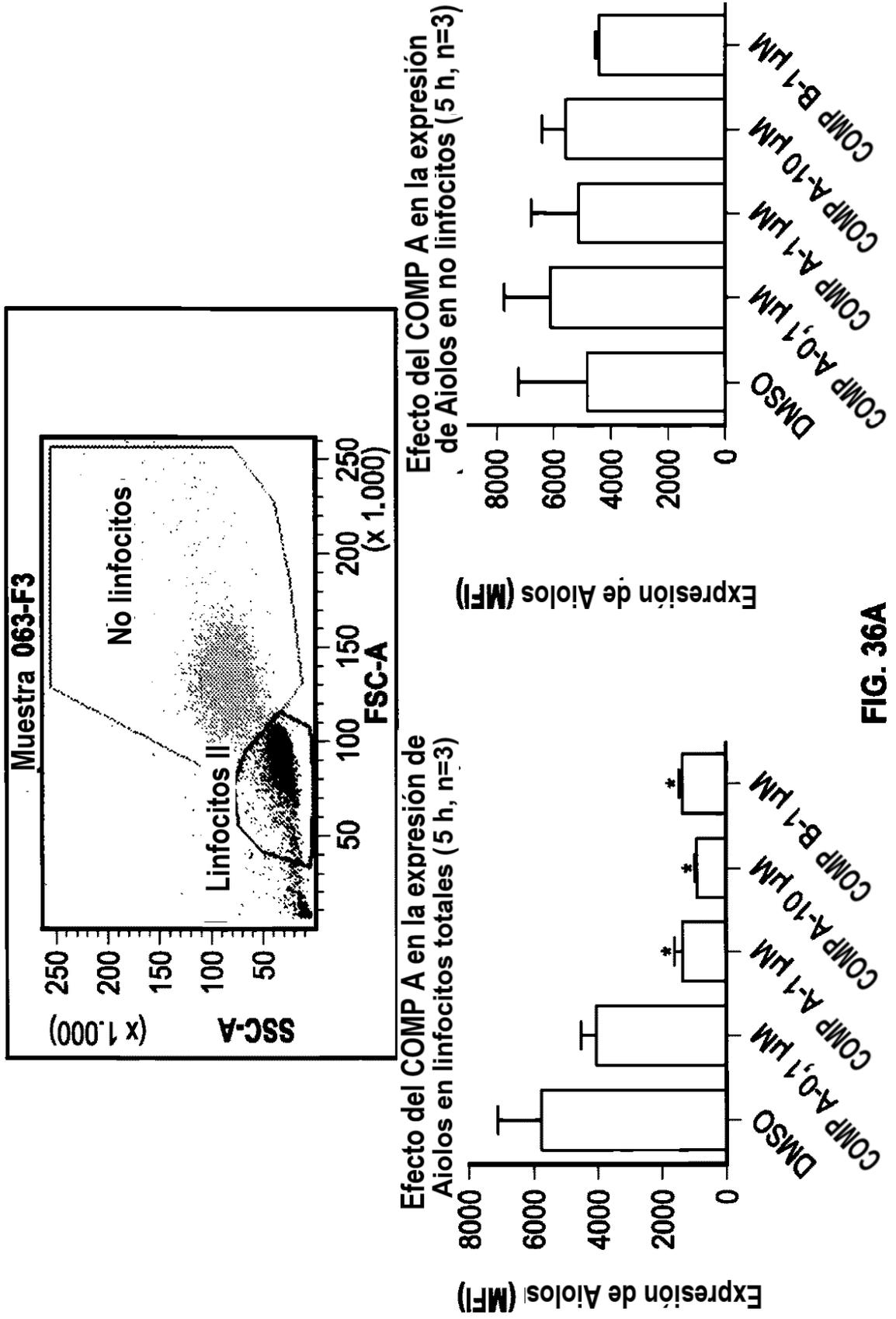
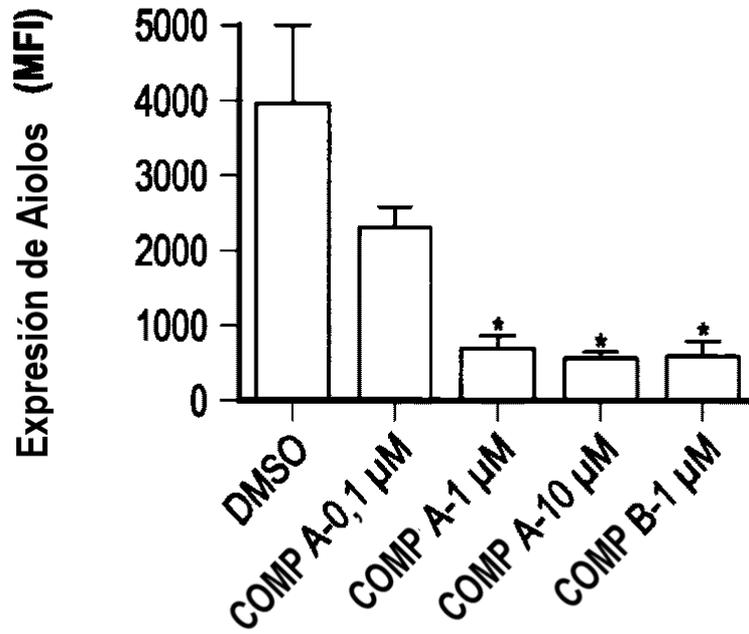


FIG. 36A

Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células T (5 h, n=3)



Efecto del COMP A en la expresión de Aiolos en células B (5 h, n=3)

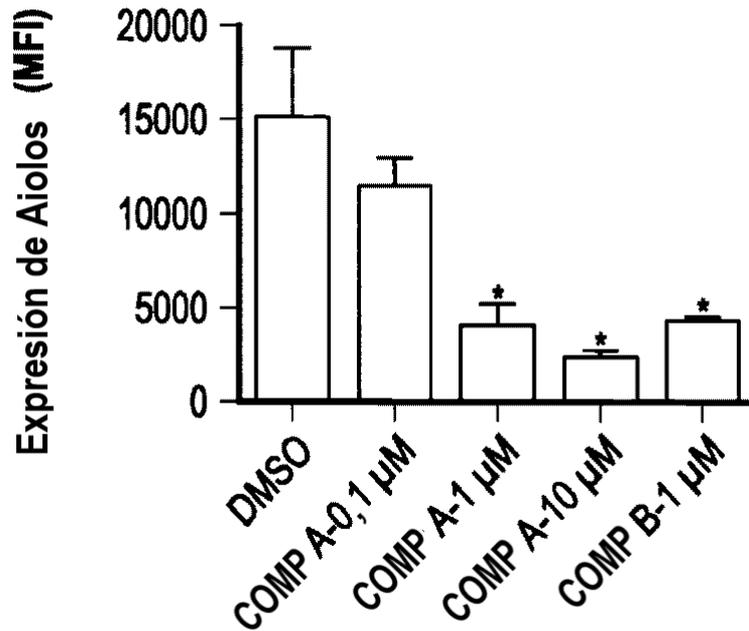


FIG. 36B

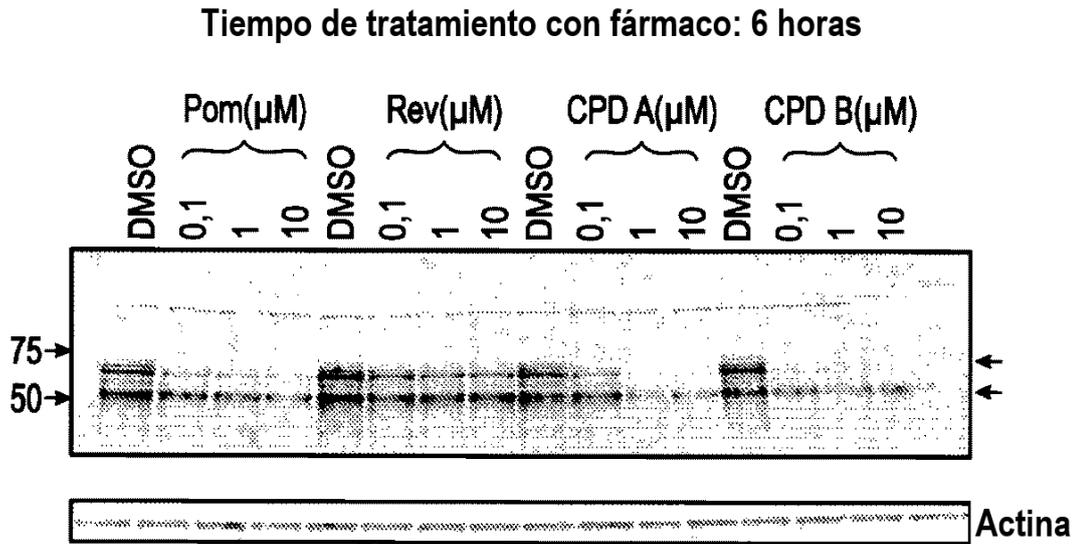


FIG. 37

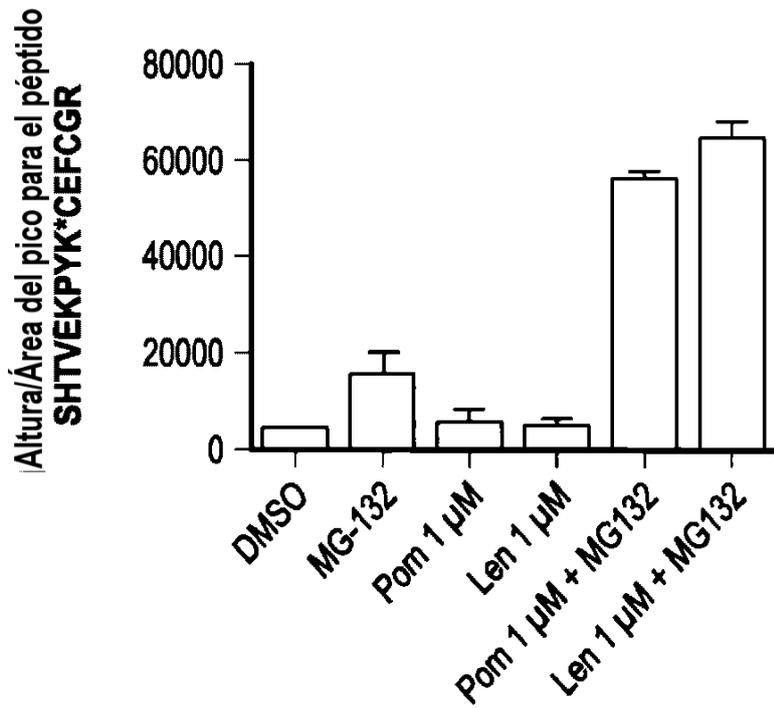


FIG. 38

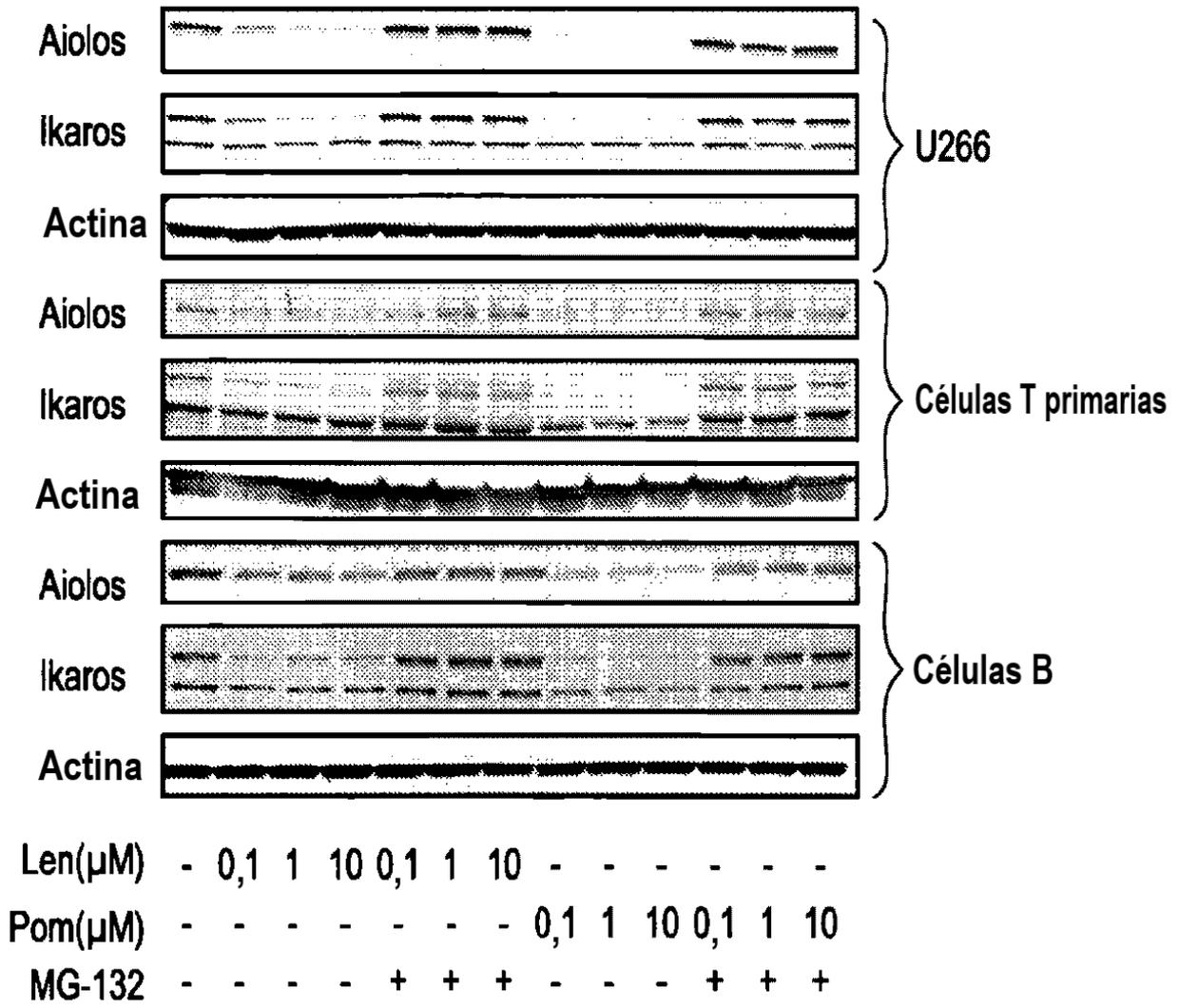


FIG. 39A

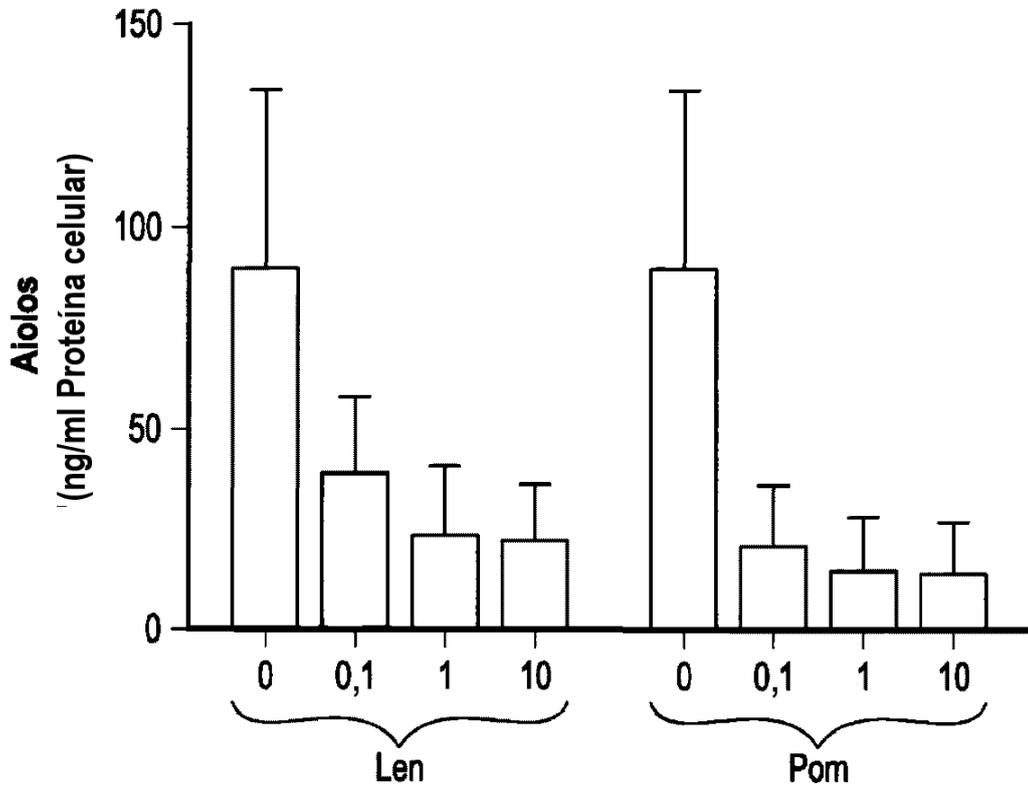


FIG. 39B

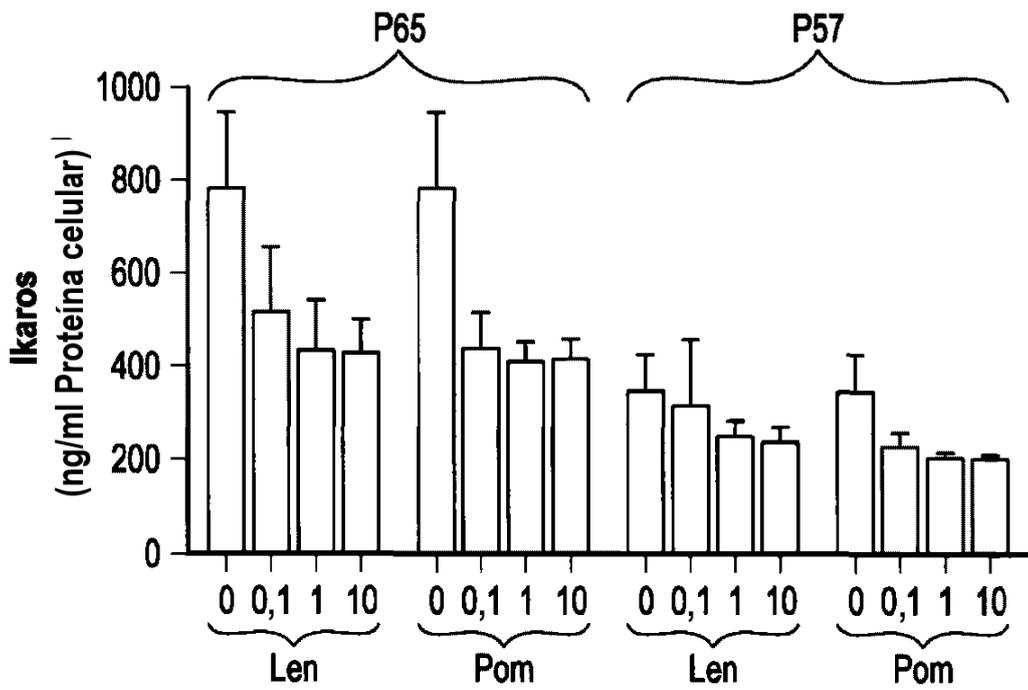


FIG. 39C

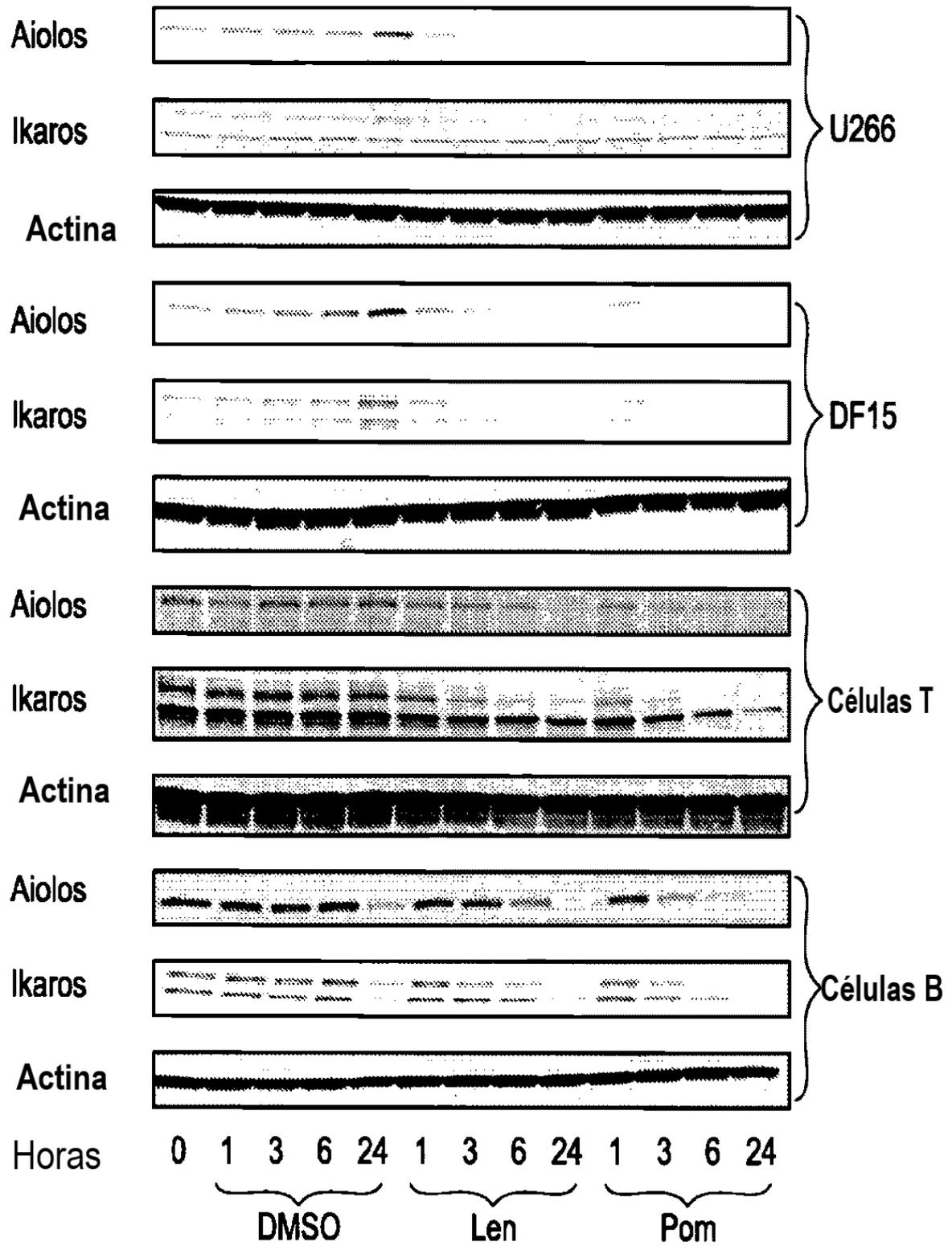


FIG. 40

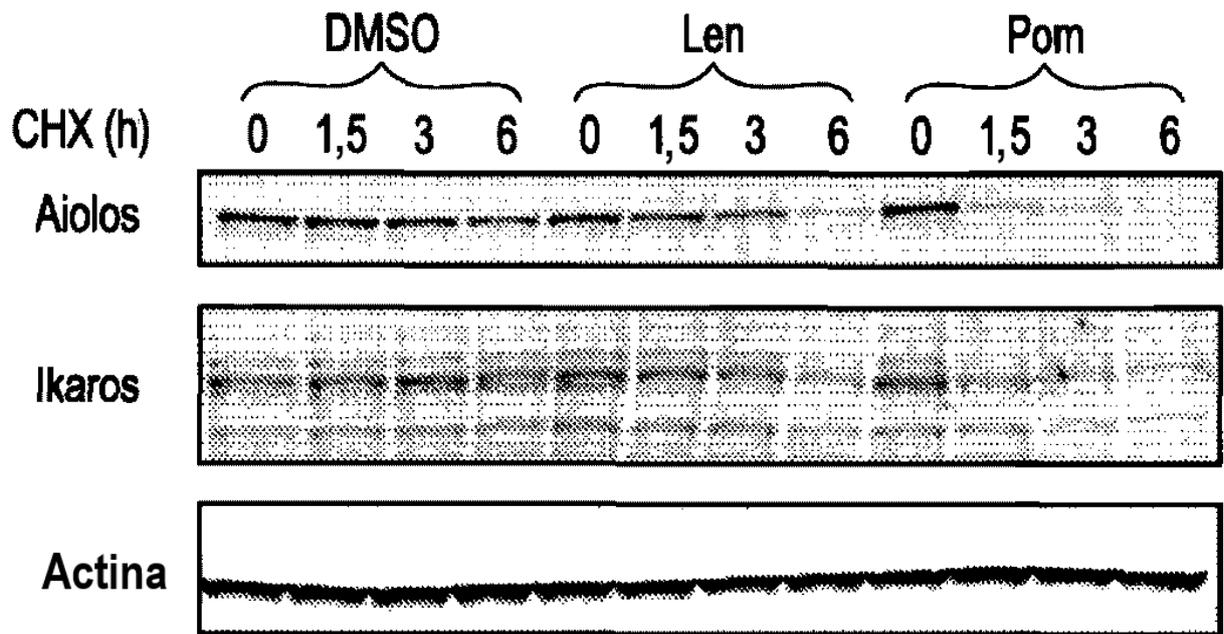


FIG. 41

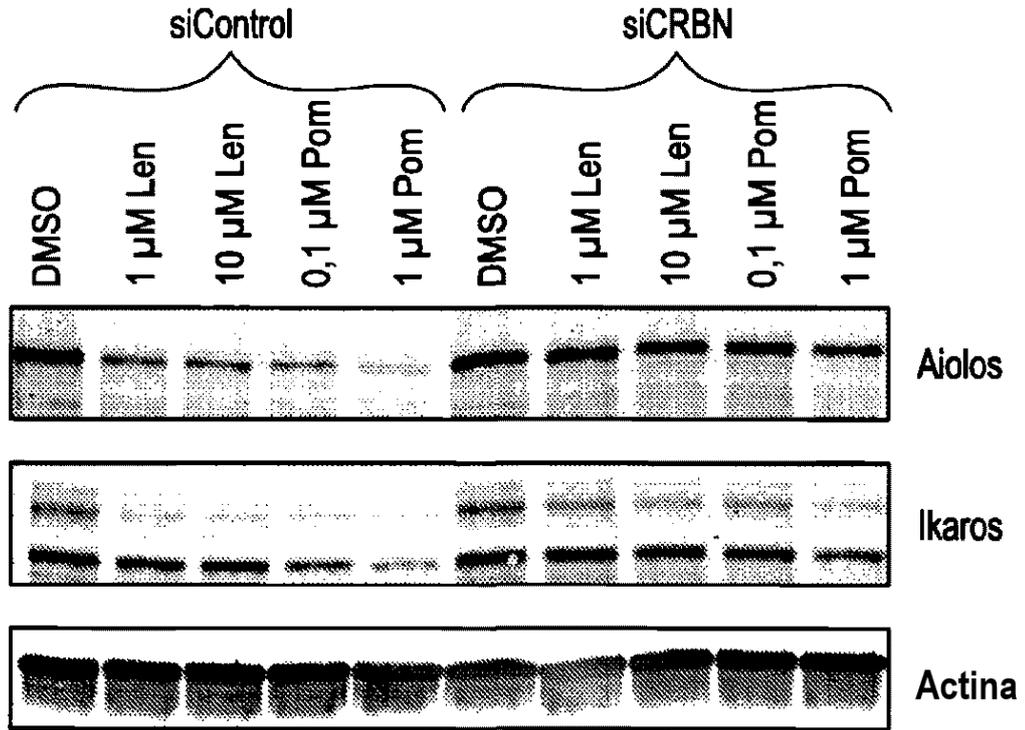


FIG. 42A

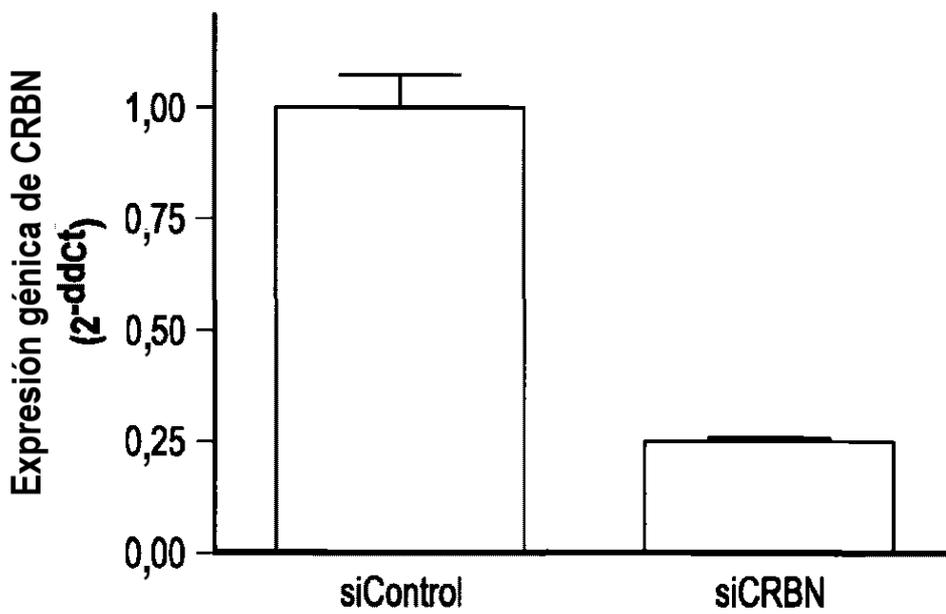


FIG. 42B

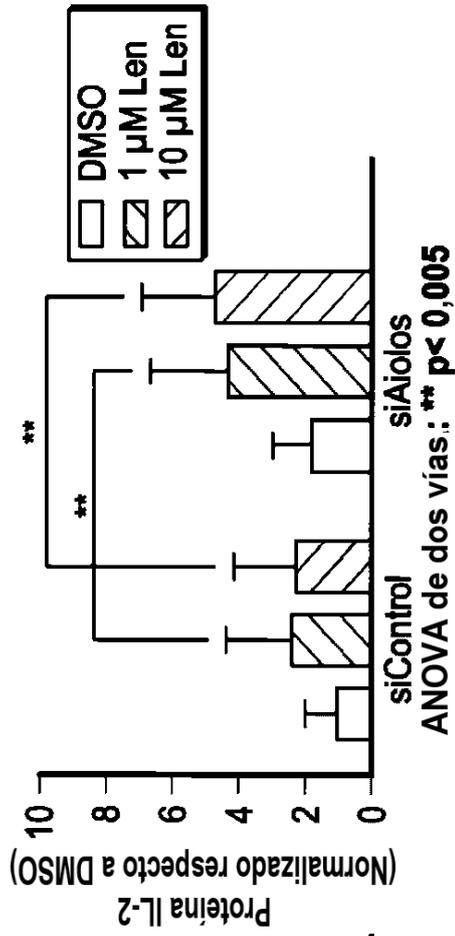
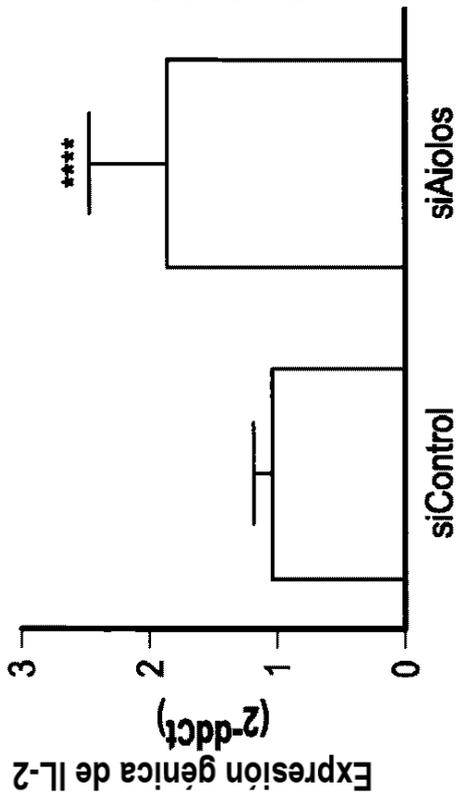


FIG. 43A

FIG. 43B

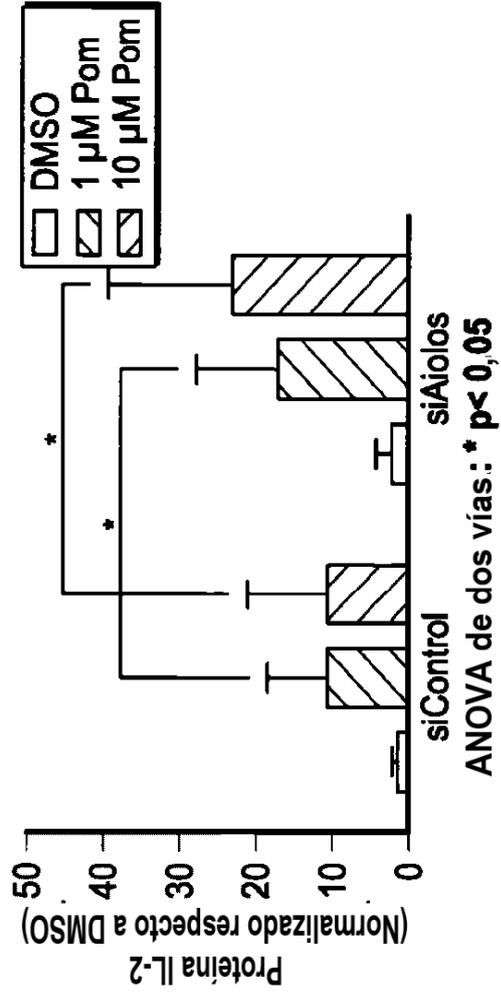
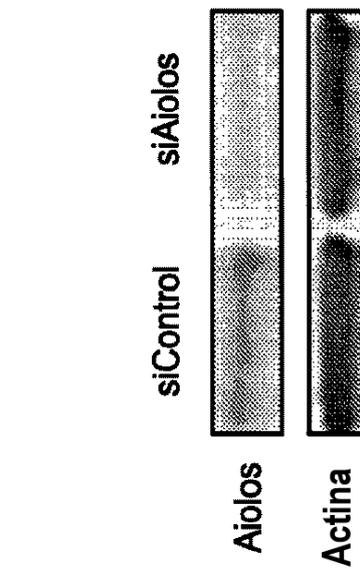


FIG. 43D

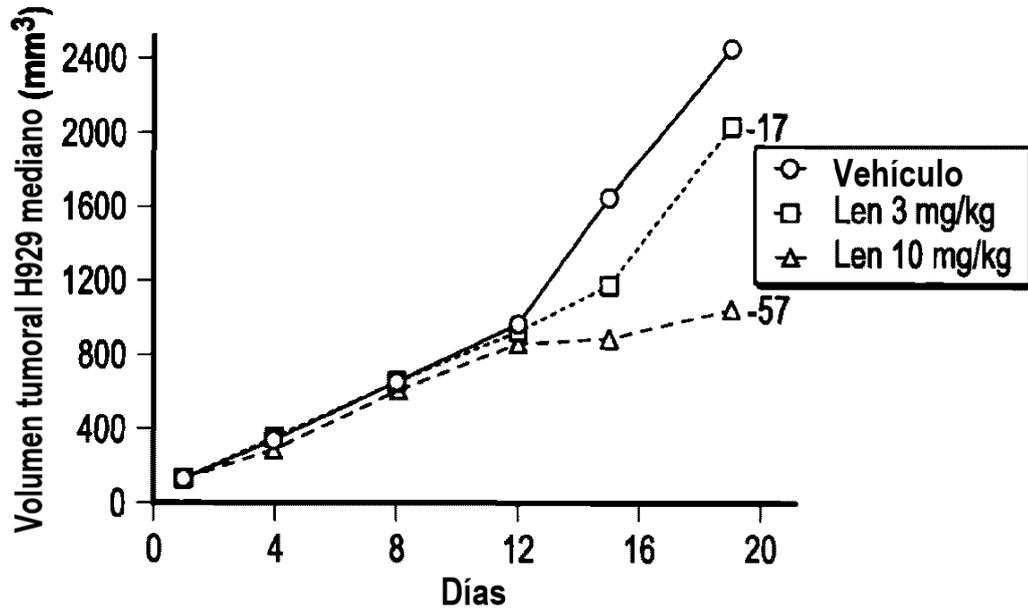


FIG. 44A

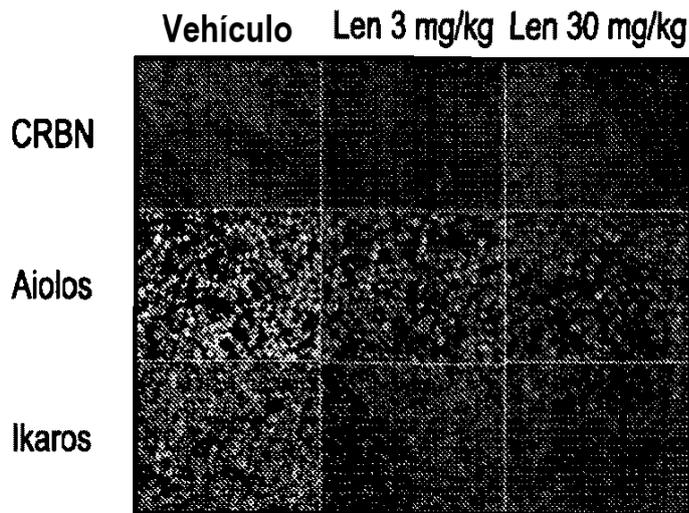


FIG. 44B

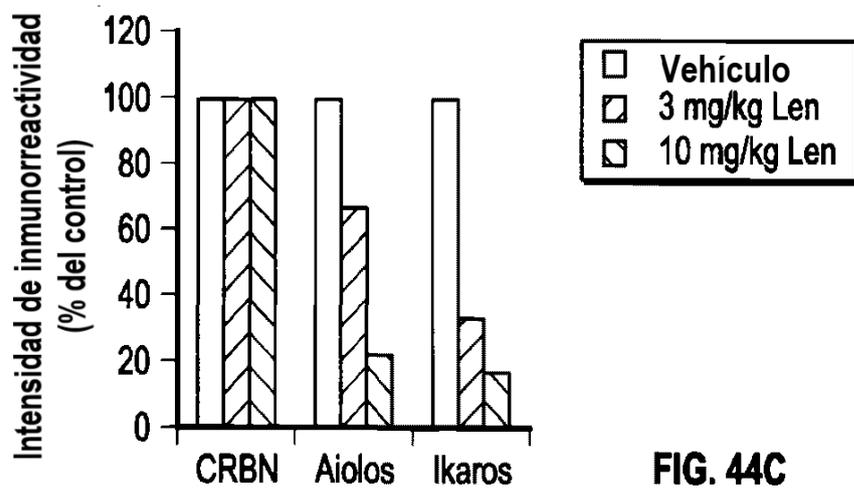


FIG. 44C

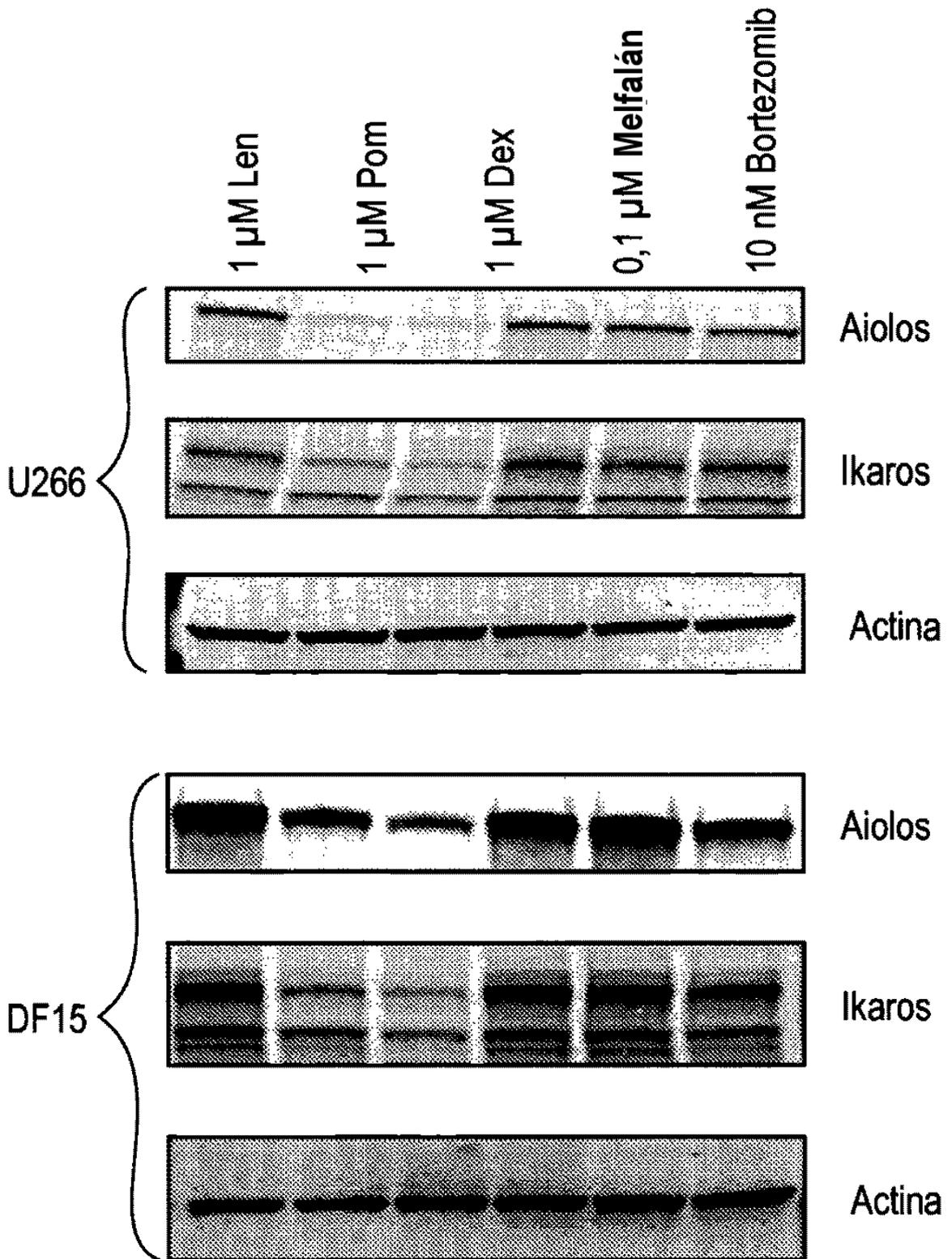
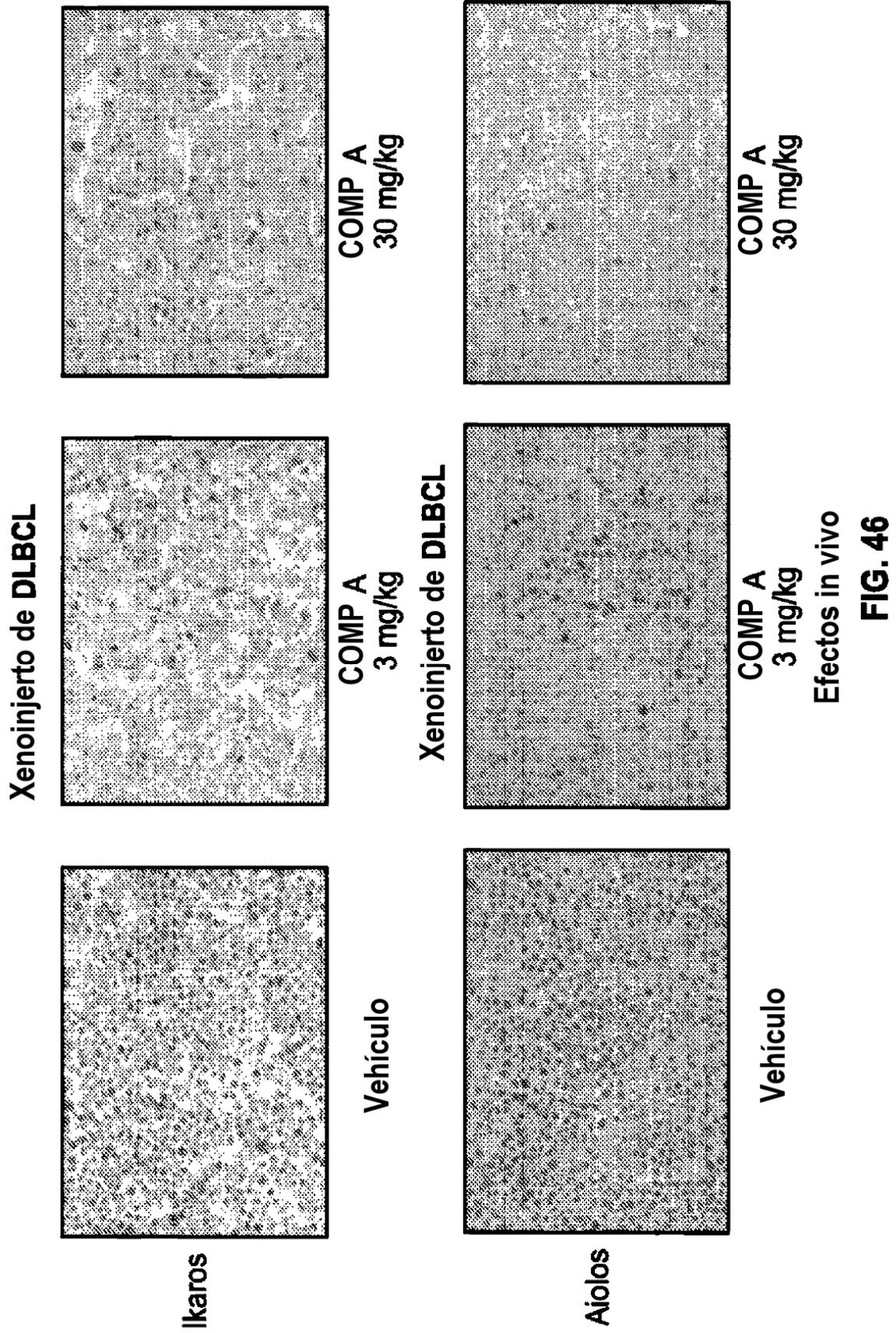


FIG. 45



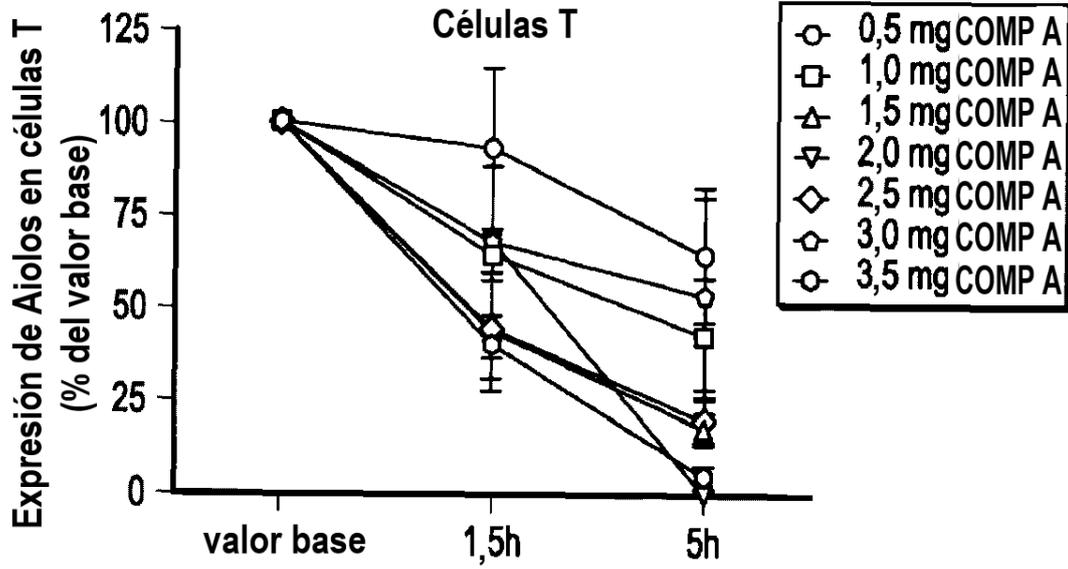


FIG. 47A

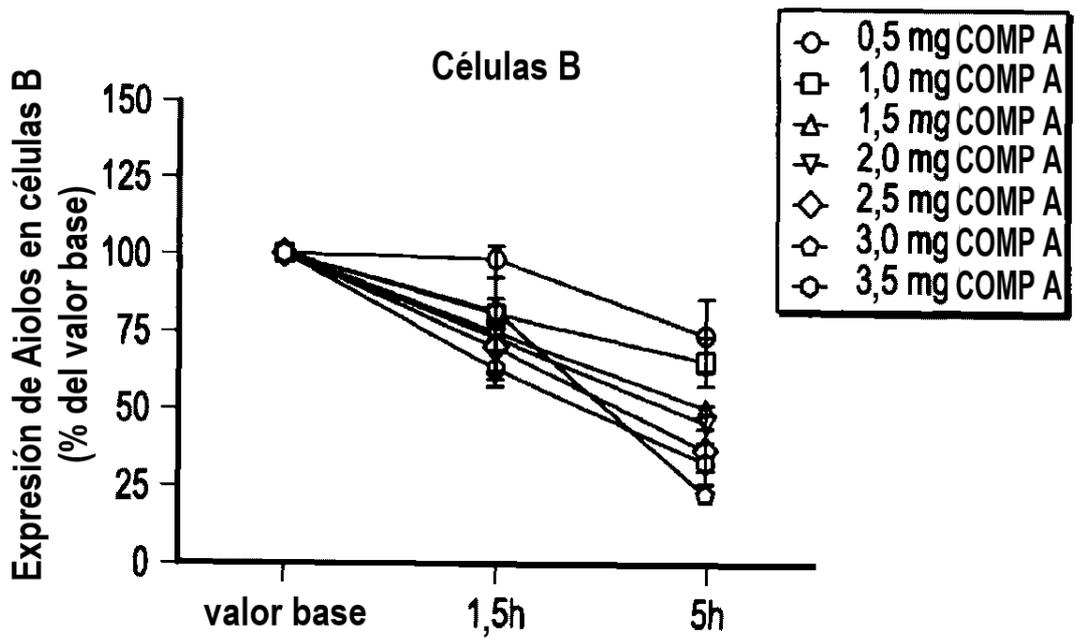


FIG. 47B

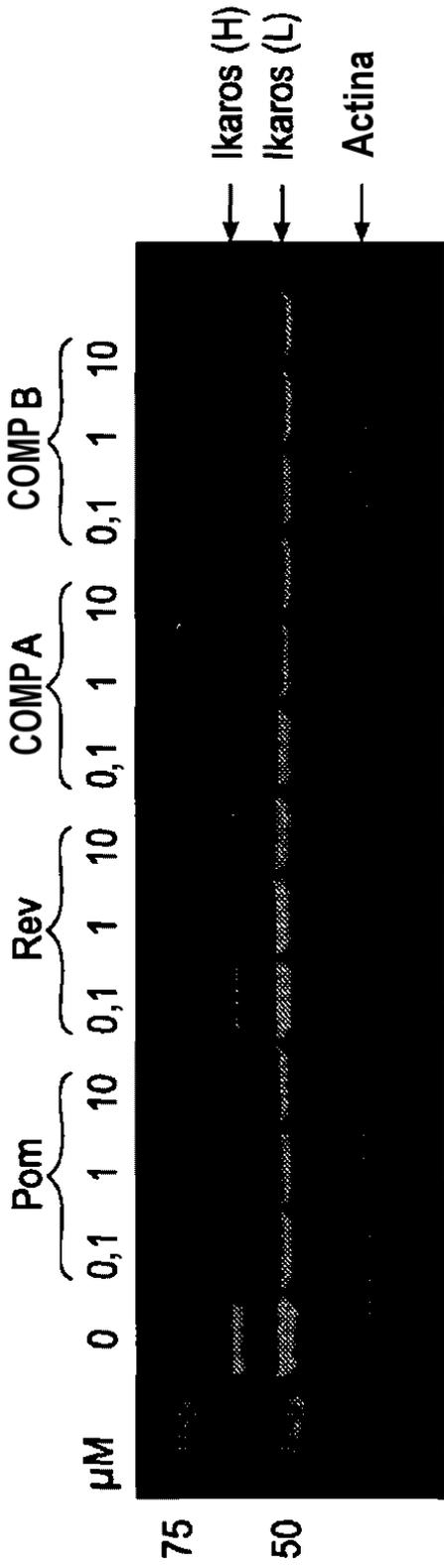
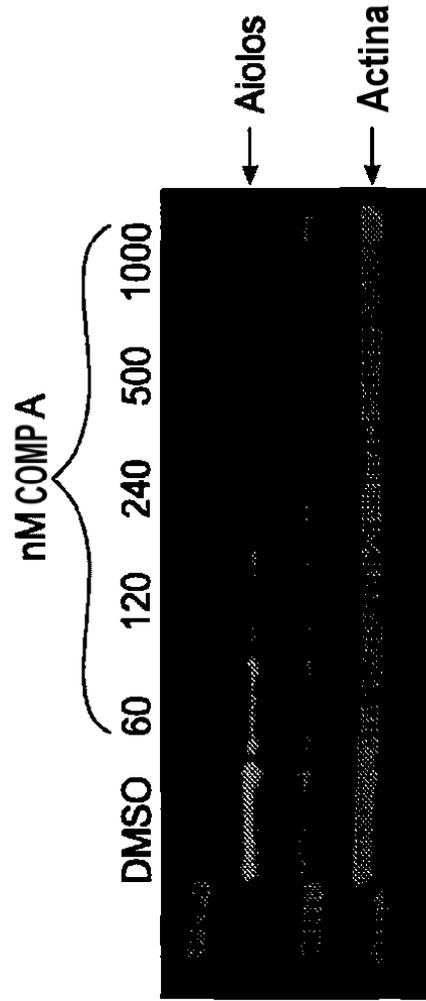


FIG. 48A



Células T primarias

FIG. 48B

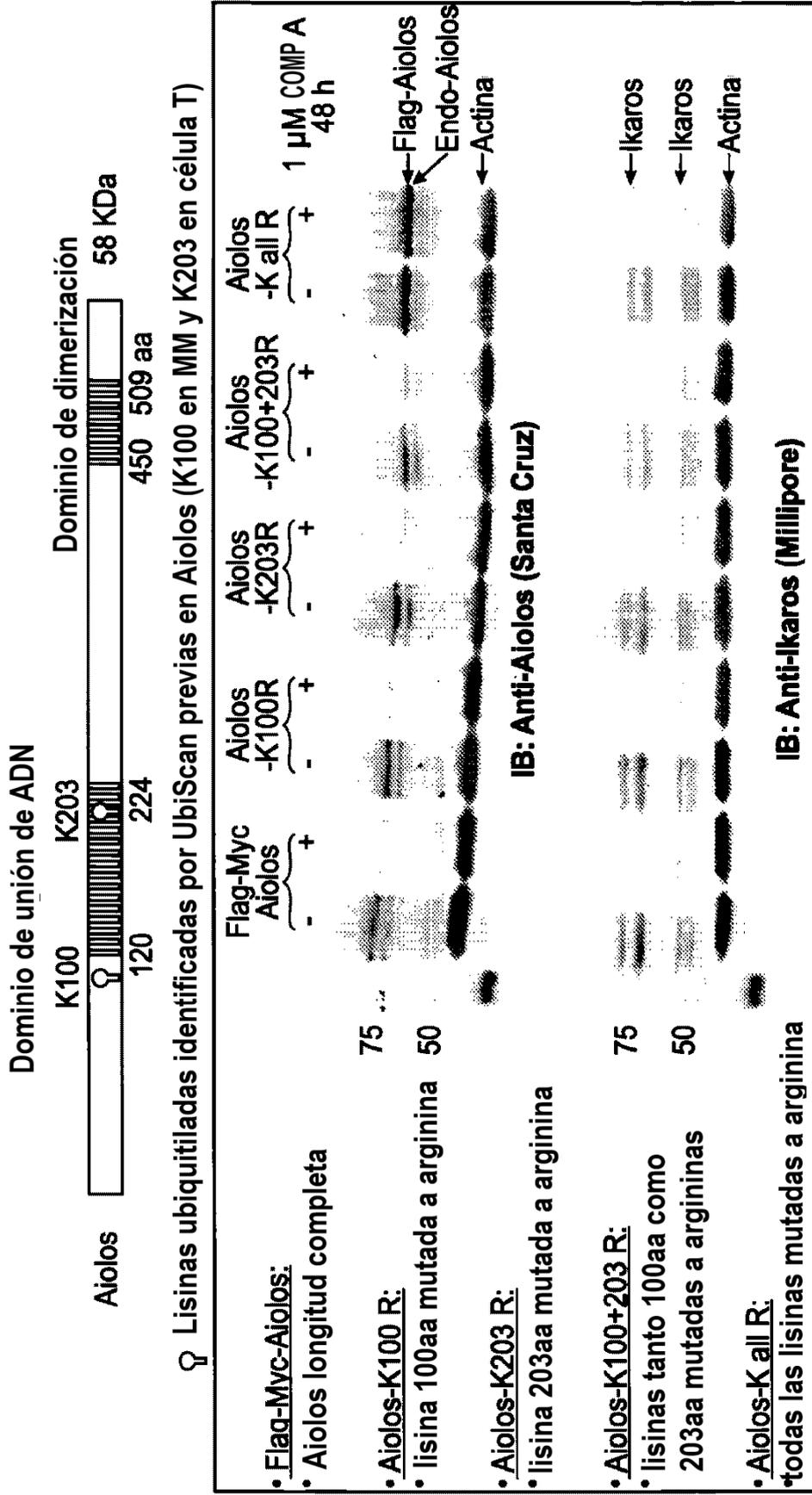


FIG. 49

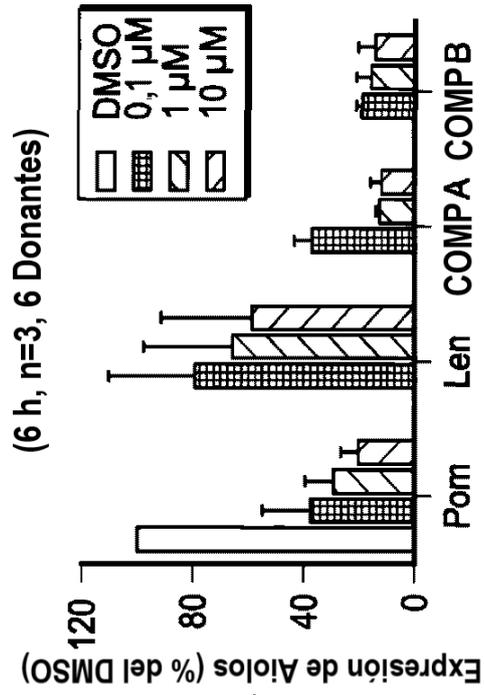
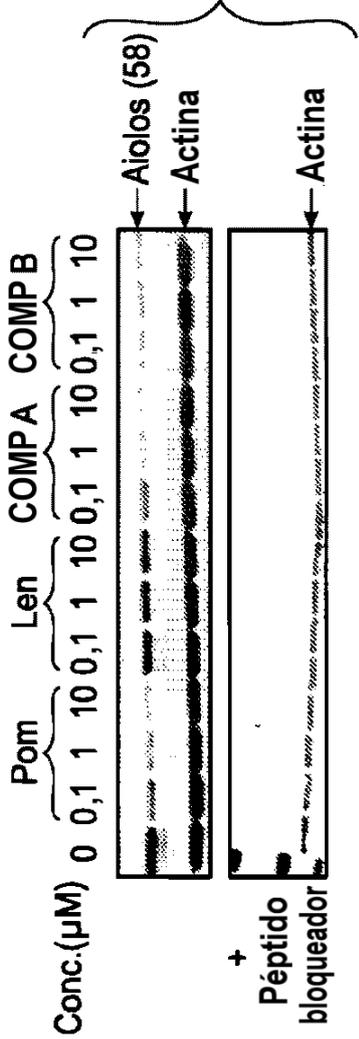


FIG. 50B



IB: anti-Aiolos (Santa Cruz)

FIG. 50A

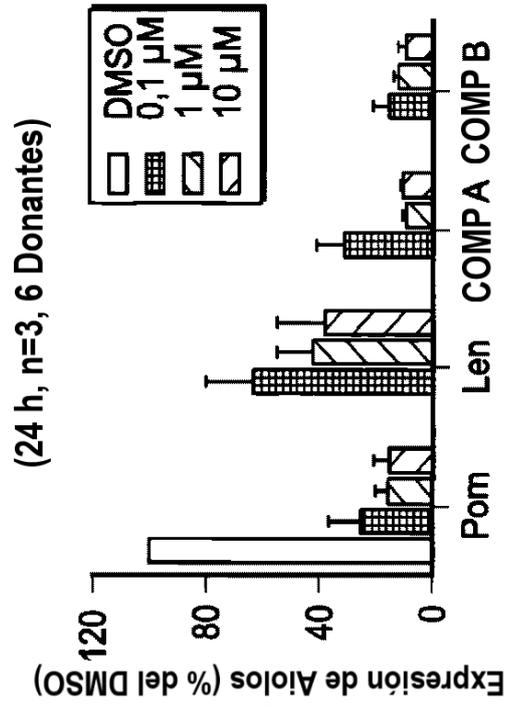


FIG. 50D

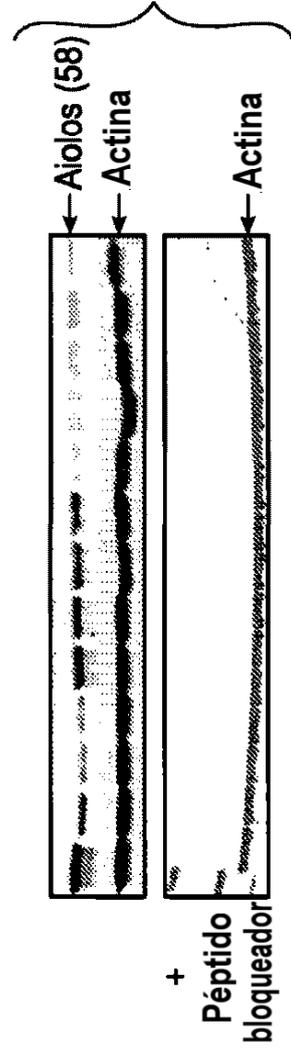


FIG. 50C

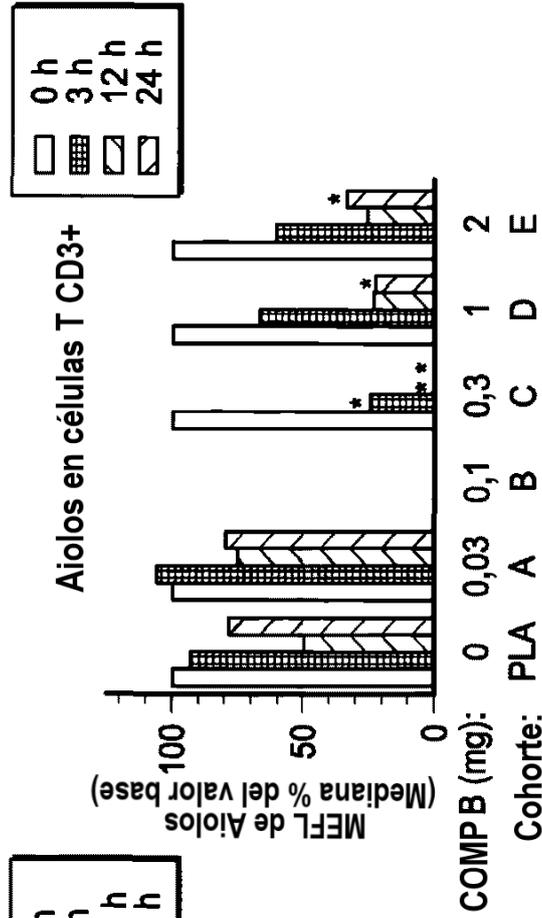


FIG. 51B

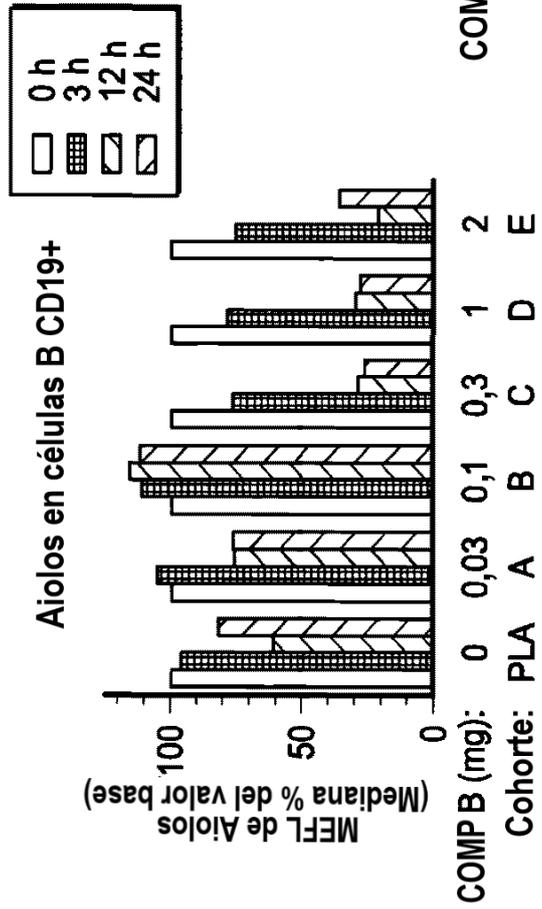
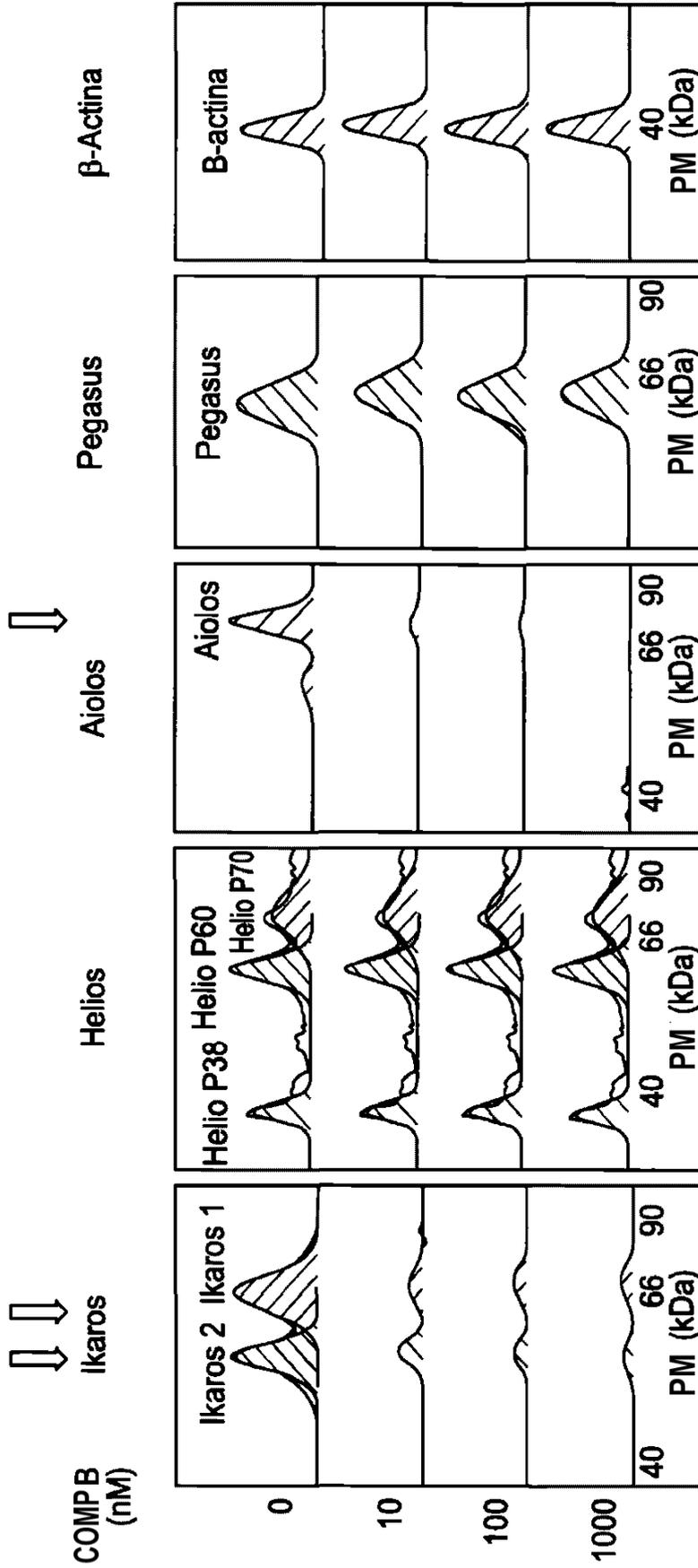


FIG. 51A



Electroferogramas de SimpleWestern de lisados de células de CD19+ humanas normales tratadas con el COMP B durante 1 día. Los resultados son representativos de n=3

FIG. 52

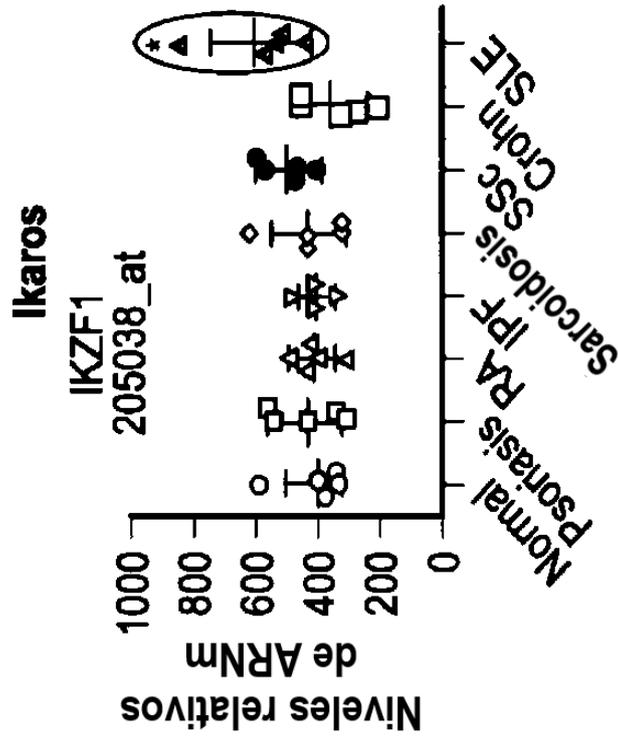


FIG. 53B

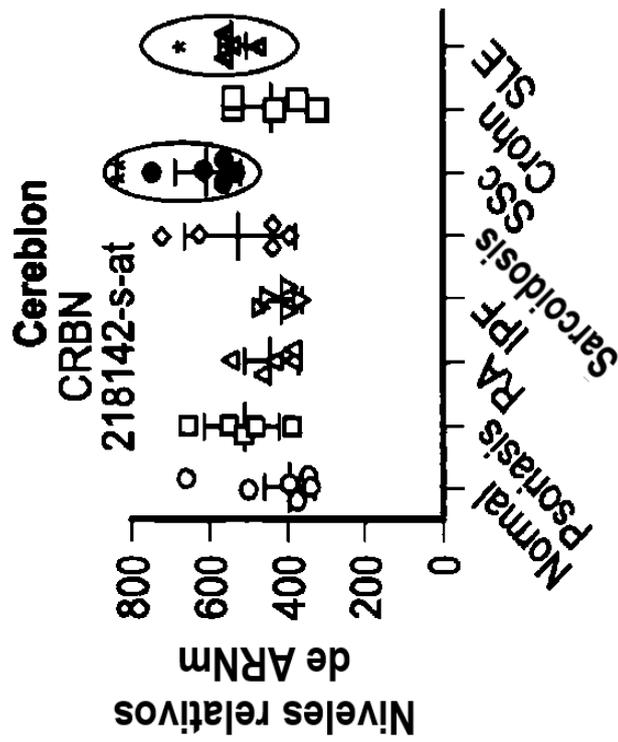


FIG. 53A

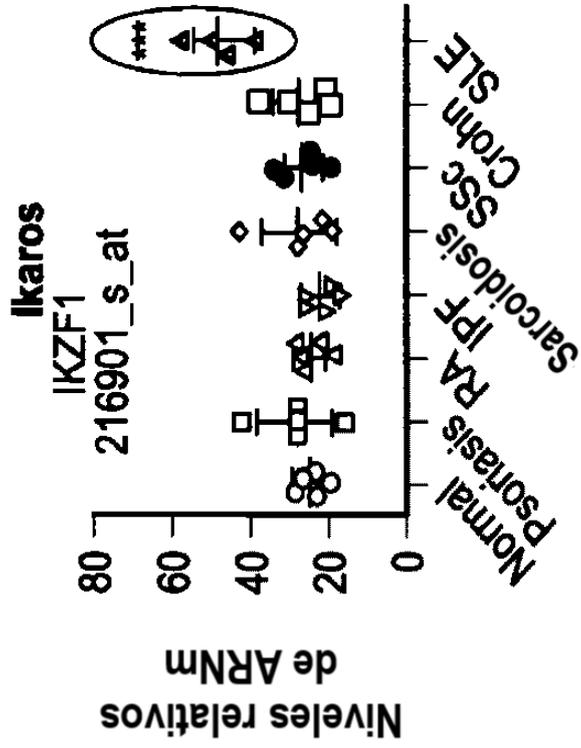


FIG. 53D

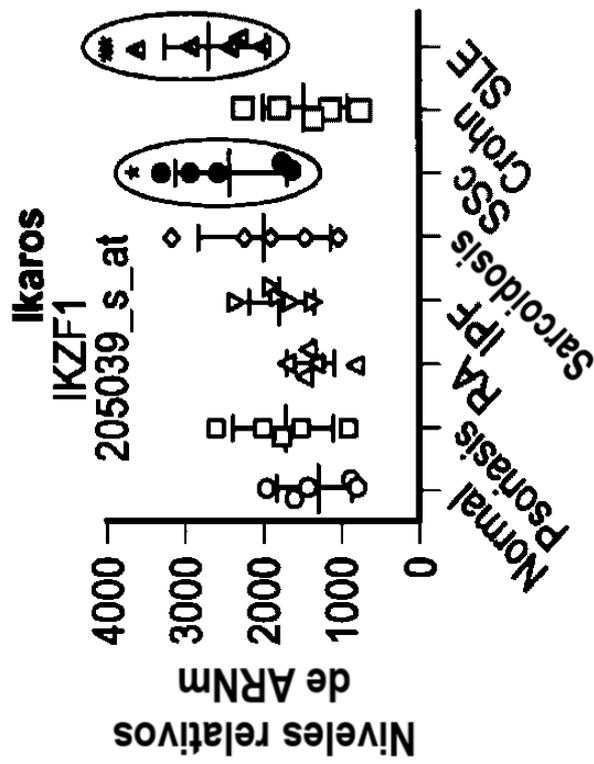


FIG. 53C

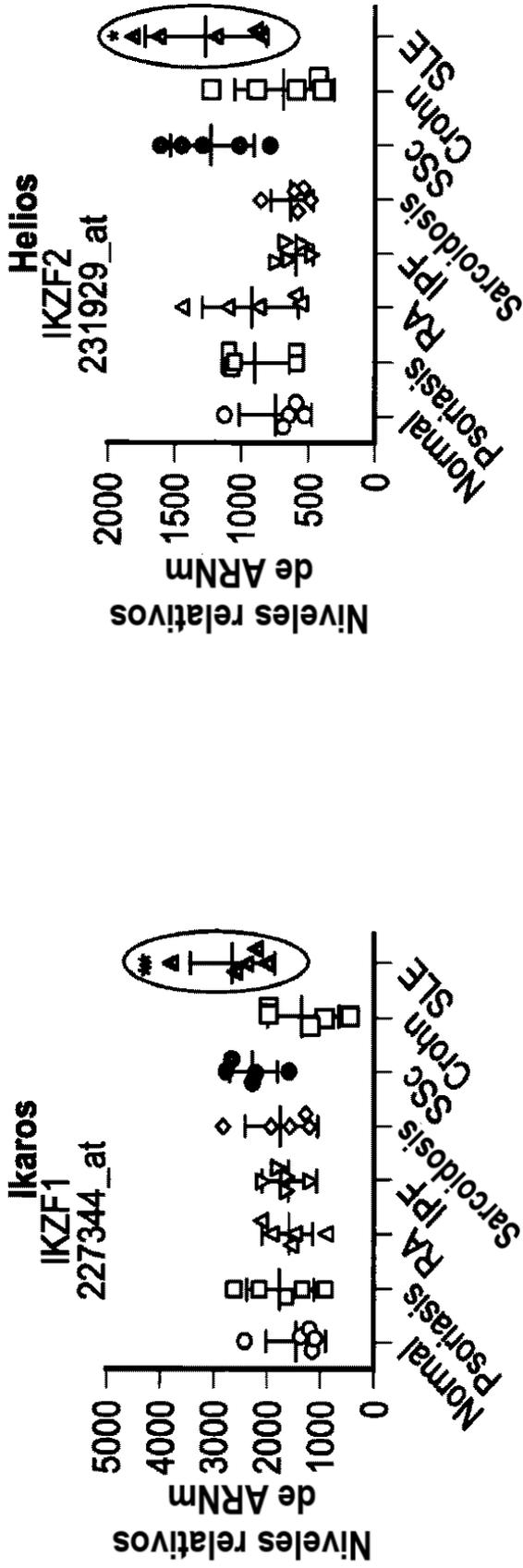


FIG. 53E

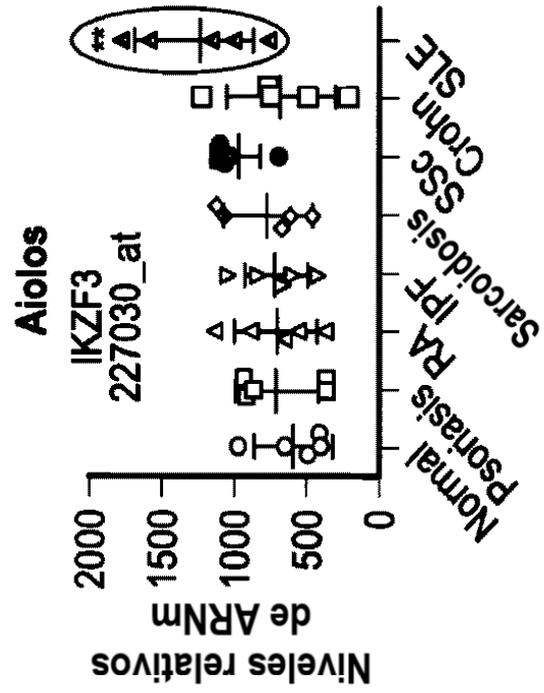


FIG. 53G

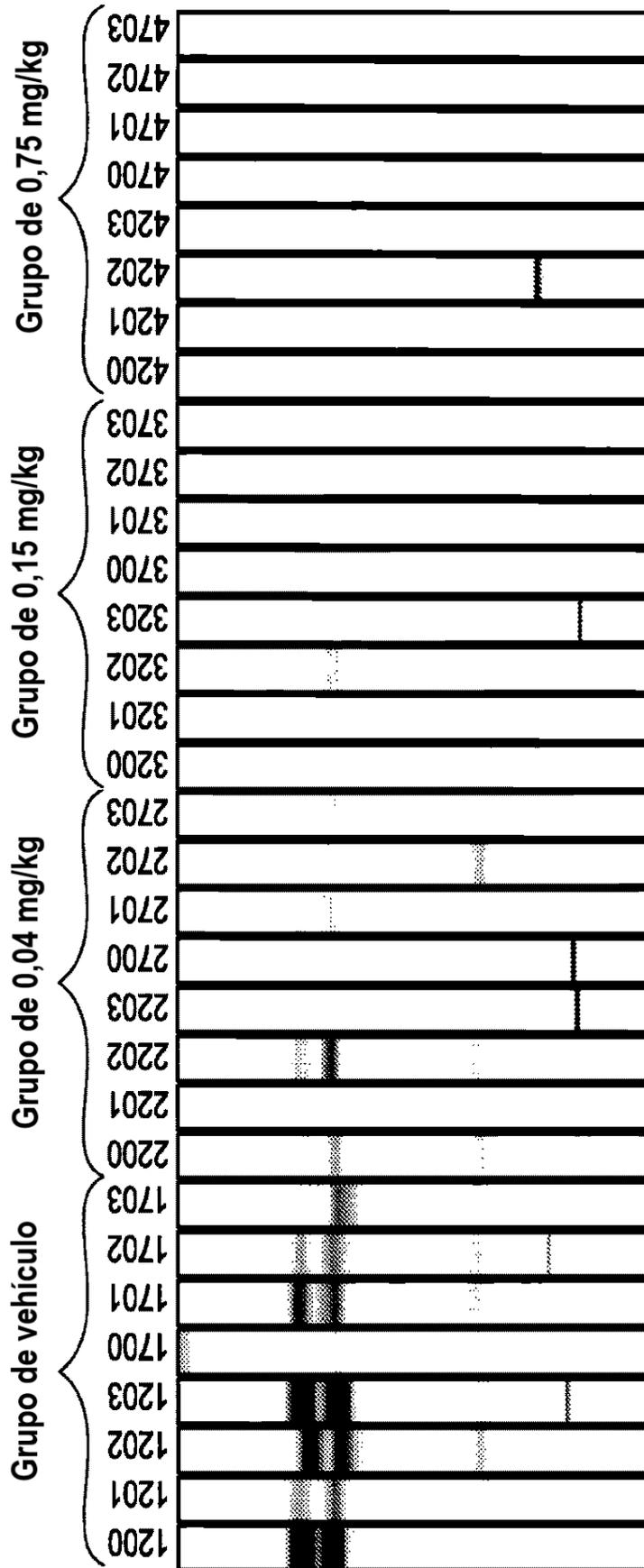
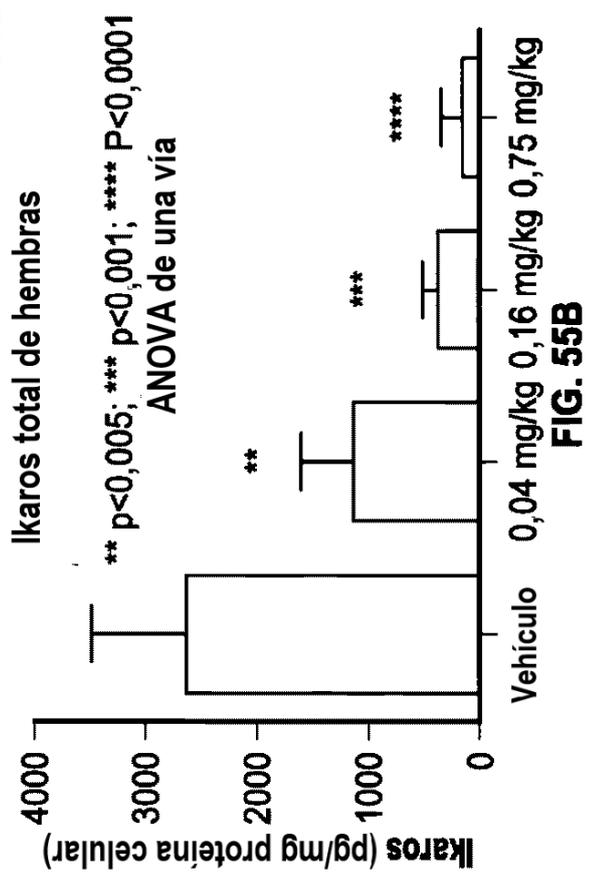
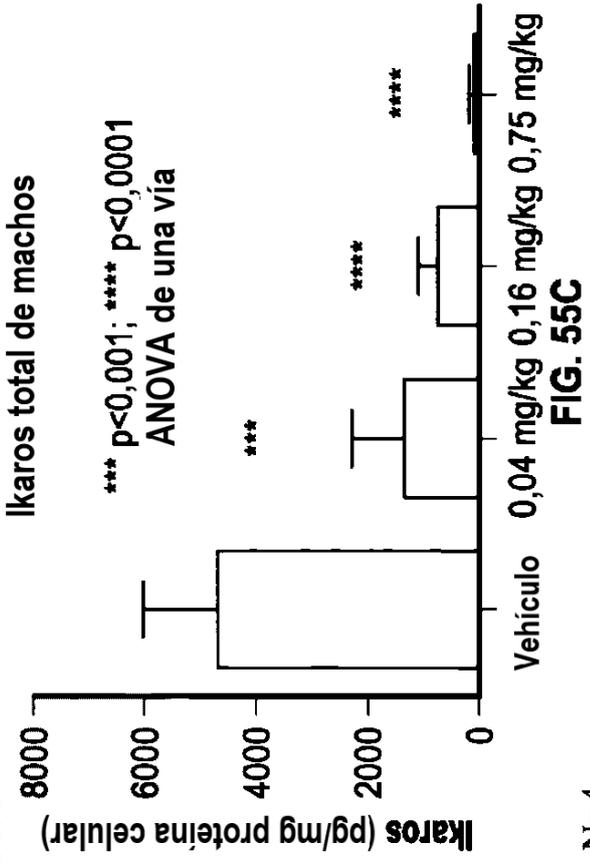
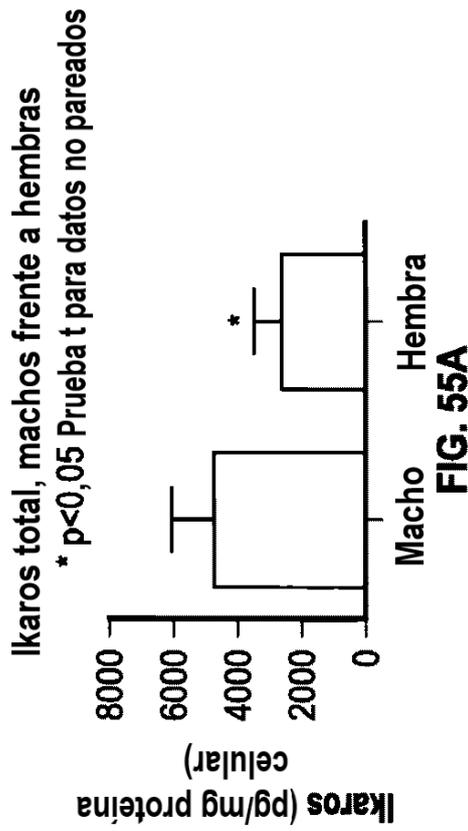


FIG. 54



N=4

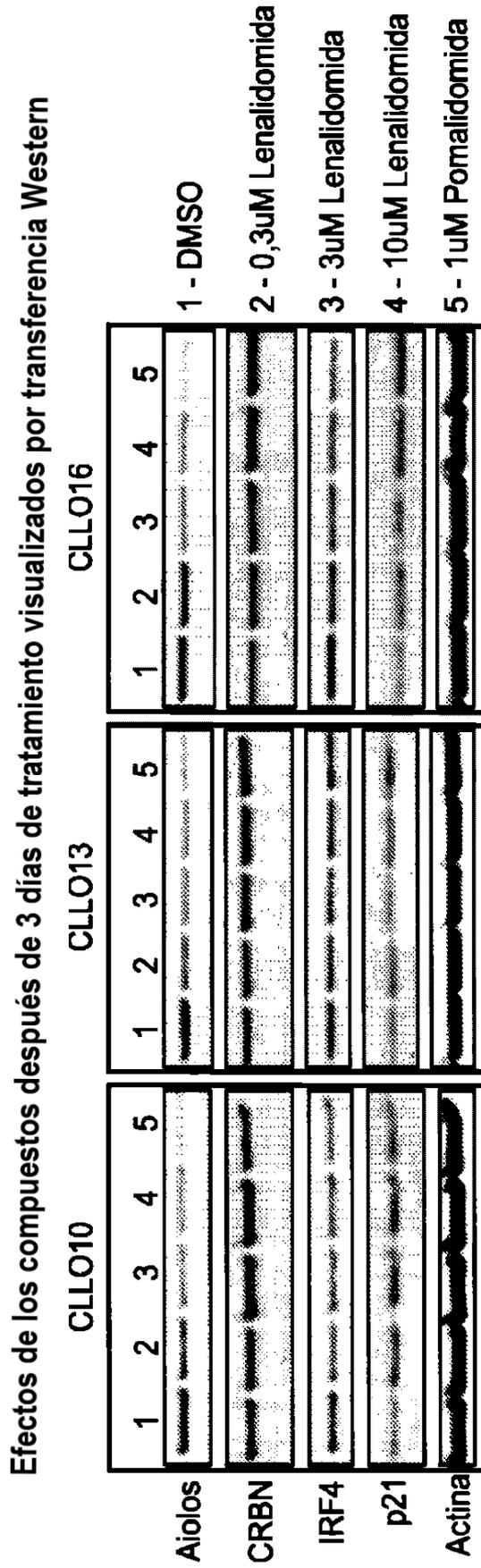


FIG. 56A

Efecto de IMiD en genes seleccionados de interés cuantificados por transferencia Western (Odyssey)

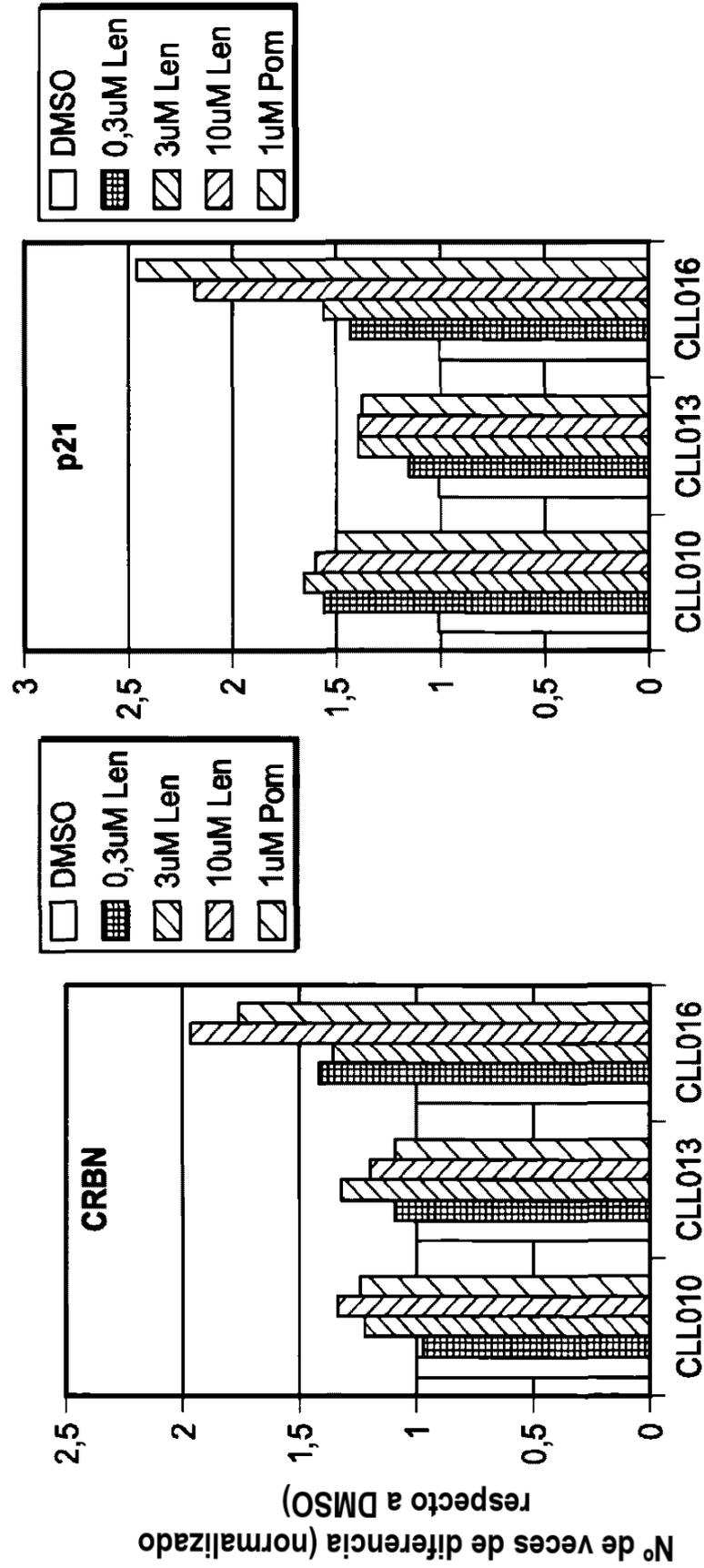


FIG. 56B-1

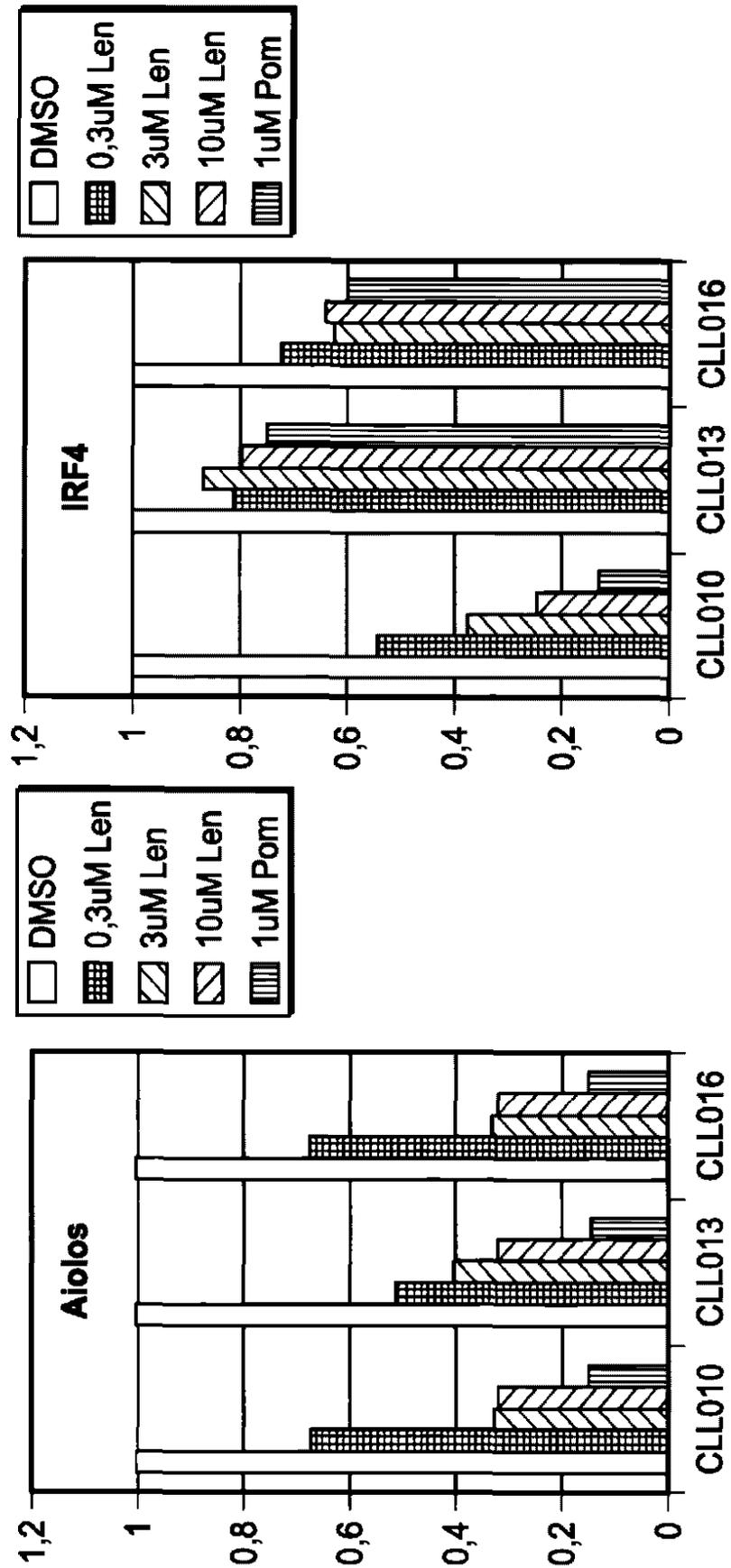


FIG. 56B-2

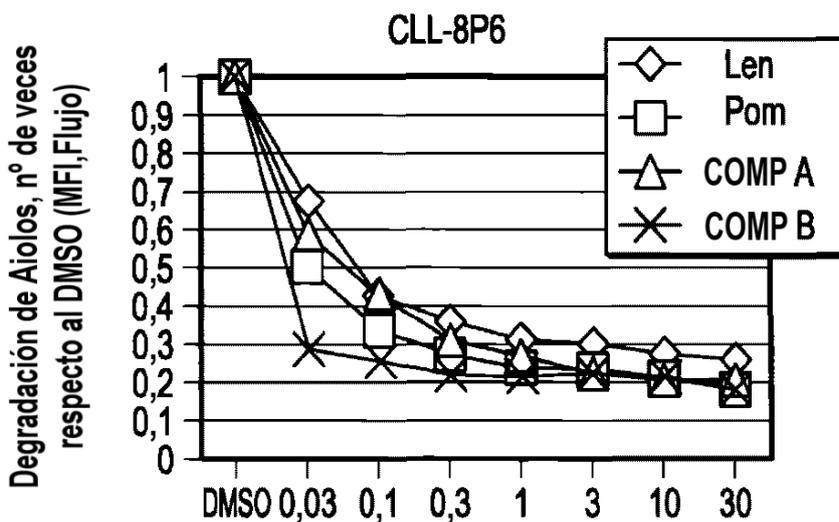
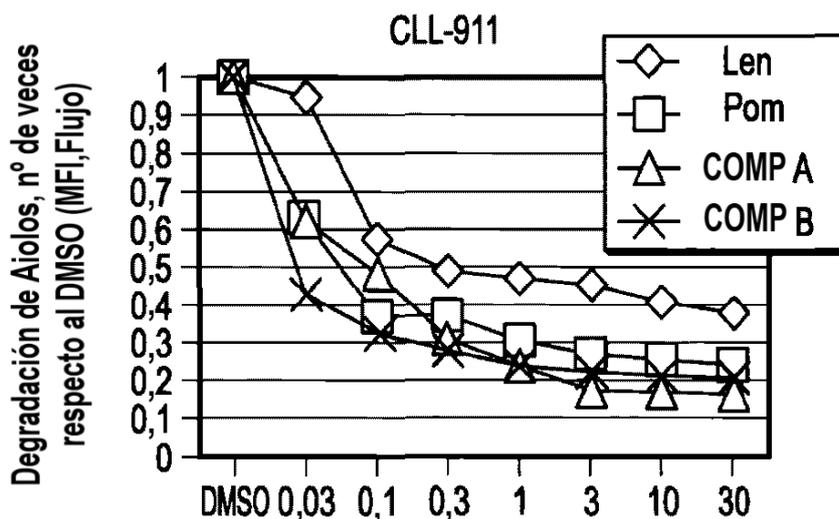
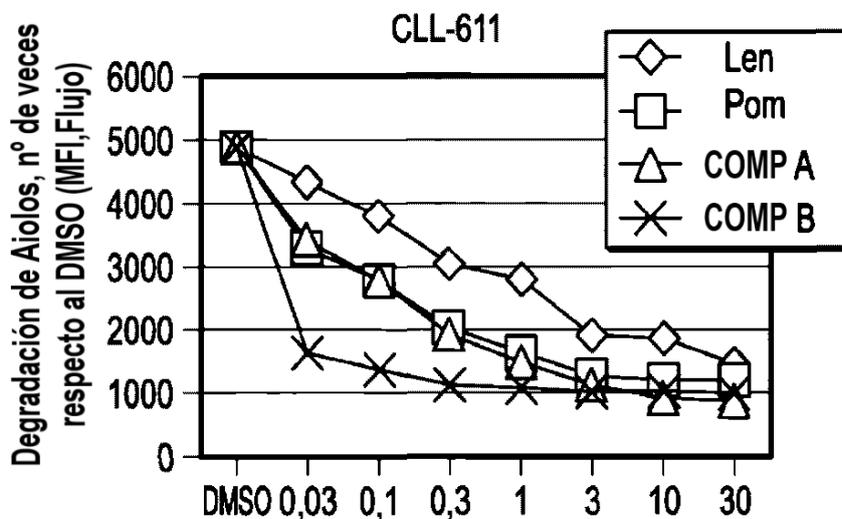


FIG. 56C

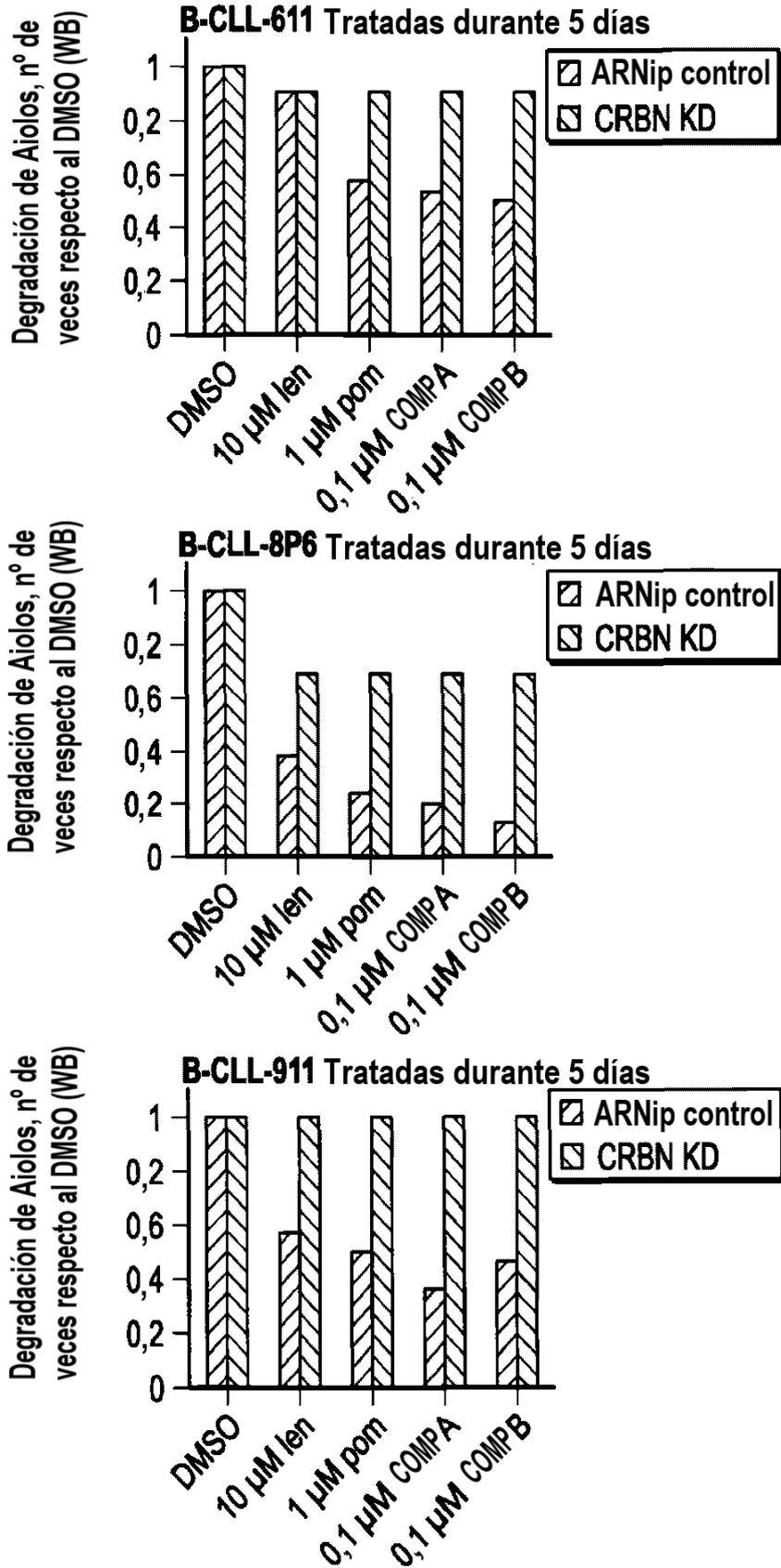


FIG. 57A

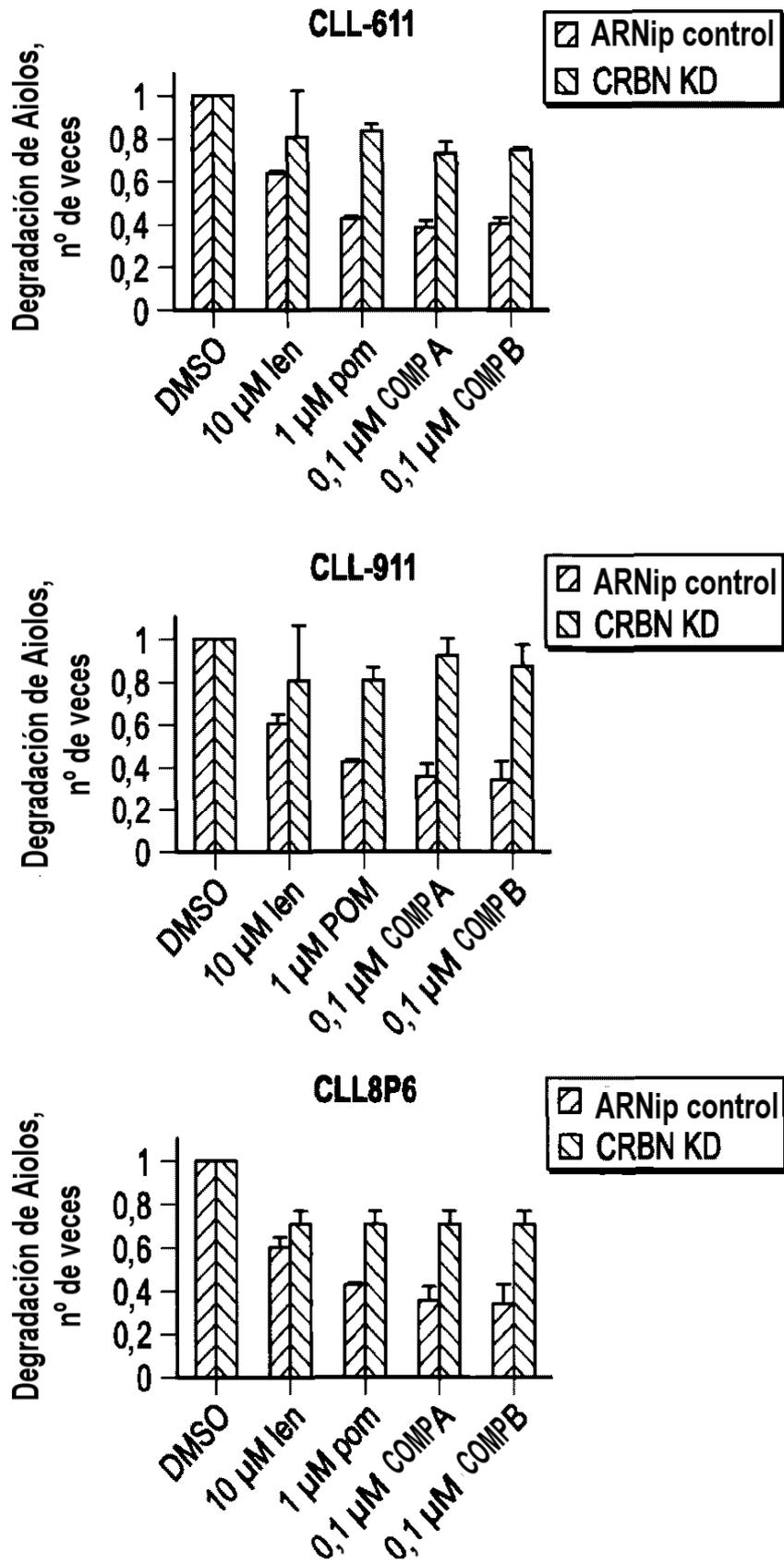


FIG. 57B

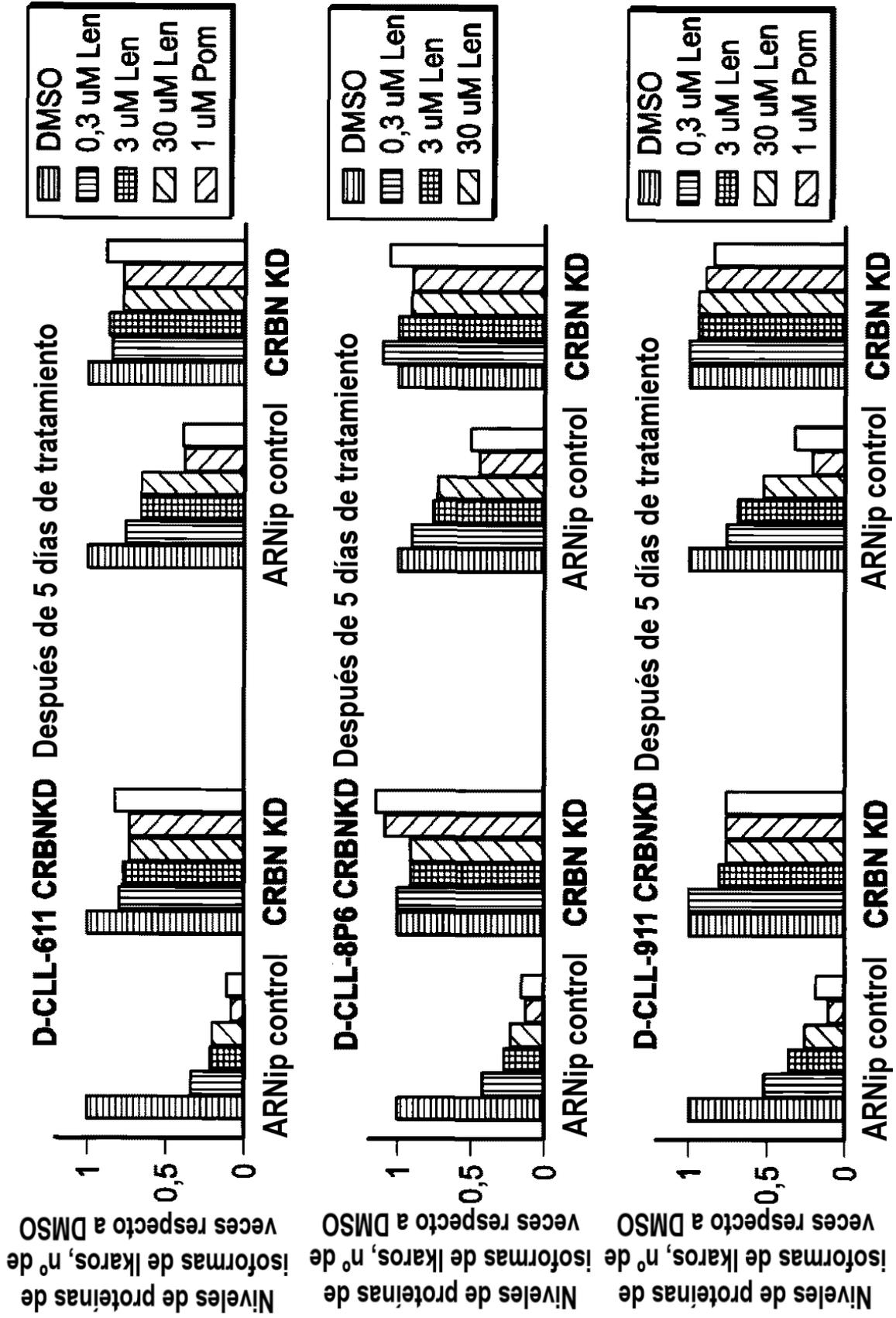


FIG. 57C