

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 537**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2010 PCT/US2010/053624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050211**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10825707 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2525790**

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

30 Prioridad:

21.10.2009 US 253818 P

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

17.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SU, SHIN-SAN MICHAEL;
DANG, LENNY;
GROSS, STEFAN;
JIN, SHENGFANG;
CANTLEY, LEWIS, C.;
SAUNDERS, JEFFREY, O. y
FANTIN, VALERIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 812 537 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para trastornos relacionados con la proliferación celular

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos para evaluar trastornos relacionados con la proliferación celular que tienen una mutación neoactiva en el resto 97 de IDH1, por ejemplo, trastornos proliferativos, tales como cáncer.

10 Antecedentes

La isocitrato deshidrogenasa, también conocida como IDH, es una enzima que participa en el ciclo del ácido cítrico. Cataliza la tercera etapa del ciclo: la descarboxilación oxidativa del isocitrato, produciendo alfa-cetoglutarato (α -cetoglutarato o α -KG) y CO_2 mientras que convierte el NAD^+ en NADH. Este es un proceso en dos etapas, que implica la oxidación del isocitrato (un alcohol secundario) en oxalosuccinato (una cetona), seguida de la descarboxilación del grupo carboxilo beta de la cetona, formando alfa-cetoglutarato. Otra isoforma de la enzima cataliza la misma reacción; sin embargo, esta reacción no está relacionada con el ciclo del ácido cítrico, se lleva a cabo en el citosol así como en las mitocondrias y peroxisomas y usa NADP^+ como cofactor, en lugar de NAD^+ .

20 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular o que se sospecha que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG) o para evaluar la susceptibilidad de un sujeto a un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG, caracterizado por:

- (a) la presencia de una enzima IDH1-G97D mutante que tiene neoactividad de 2HG o
 (b) niveles elevados de 2HG debido a la presencia de la enzima IDH1-G97D mutante que tiene neoactividad de 2HG,

en donde dicho método comprende:

analizar la presencia de 2HG en una muestra seleccionada entre un tejido, producto y fluido corporal de dicho sujeto mediante un método cromatográfico;
 analizar la presencia de una proteína IDH1-G97D mutante o de un ADN o ARN que codifica dicha proteína IDH1-G97D mutante en la muestra;
 en donde la presencia de 2HG es indicativa de que el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG.

Además, la presente invención se refiere a un método para determinar si n cáncer en un sujeto es resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG), comprendiendo el método, analizar la presencia en dicho cáncer de una proteína IDH1-G97D mutante o de un ADN o ARN que codifica dicha proteína IDH1-G97D mutante en una muestra,
 comparar el nivel de 2HG en un tejido, producto o muestra de fluido corporal del sujeto con el nivel de 2HG en una referencia, en donde un nivel aumentado de 2HG en la muestra en relación con la referencia indica que el cáncer es resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG asociada con el cáncer.

Además, la presente invención se refiere a un método para determinar la neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG) en un paciente analizando una muestra de dicho paciente, para determinar la presencia de un ARN o ADN que codifica una proteína IDH1 mutante con una mutación en el resto 97 de la SEQ ID NO: 8, en donde la IDH1 mutante es IDH1-G97D y en donde la presencia de dicho ARN o ADN que codifica dicha proteína IDH1 mutante indica neoactividad de 2HG en dicho paciente.

Los métodos y composiciones divulgados en el presente documento se refieren al papel desempeñado en la enfermedad por los productos neoactivos producidos por un gen de IDH1 que tiene una mutación en el resto 97 o un gen de IDH2 que tiene una mutación neoactiva en el resto 137. Los inventores han descubierto una neoactividad asociada con una mutación en el resto 97 de IDH1 y que el producto de la neoactividad puede estar significativamente aumentado en células cancerosas. En el presente documento se divulgan métodos y composiciones para tratar y métodos para evaluar, a un sujeto que tiene o que se encuentra en riesgo de tener un trastorno, por ejemplo, un trastorno relacionado con la proliferación celular, caracterizado por una mutación somática neoactiva en el resto 97 de IDH1, por ejemplo, una mutación a otro distinto de G en el resto 97, por ejemplo, IDH1-G97D, que confiere neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG, en la proteína IDH1 mutante (dichas mutaciones en ocasiones se citan en el presente documento como mutaciones de IDH1-97^{neo} y los mutantes correspondientes en ocasiones se citan en el presente documento como mutantes de IDH1-97^{neo}). También se divulga una mutación somática neoactiva en el resto 137 de IDH2, por ejemplo, una mutación a otro distinto de G en el resto 137, que confiere neoactividad de

5 alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG, en la proteína IDH2 mutante (dichas mutaciones en ocasiones se citan en el presente documento como mutaciones de IDH2-137^{neo} y los mutantes correspondientes en ocasiones se citan en el presente documento como mutantes de IDH2-137^{neo}). Los trastornos ejemplares incluyen, por ejemplo, trastornos proliferativos, tales como cáncer. Los inventores han descubierto y divulgan en el presente documento nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos, por ejemplo, cánceres, caracterizados por una neoactividad resultante de una mutación en el resto G97 de IDH1 o en G137 de IDH2. En algunas realizaciones, el agente terapéutico reduce los niveles de neoactividad o de producto neoactivo. Los métodos descritos en el presente documento también permiten la identificación de un sujeto o la identificación de un tratamiento para el sujeto, basándose en el genotipo o fenotipo de neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}. Esta evaluación puede permitir el emparejamiento óptimo del sujeto con el tratamiento, por ejemplo, donde la selección del sujeto o el tratamiento (o ambos) es en respuesta a un análisis del genotipo o fenotipo de neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento pueden permitir la selección de un régimen de tratamiento que comprende la administración de un nuevo compuesto, por ejemplo, un nuevo compuesto divulgado en el presente documento o un compuesto conocido, por ejemplo, un compuesto conocido no recomendado previamente para un trastorno relacionado. En algunas realizaciones, el compuesto conocido reduce los niveles de neoactividad o de producto neoactivo de una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}. Esta estrategia puede guiar y proporcionar una base para la selección y administración de un nuevo compuesto o un compuesto conocido o una combinación de compuestos, no recomendada anteriormente para sujetos que tienen un trastorno caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}. En algunas realizaciones, el genotipo o fenotipo neoactivo de una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo} puede actuar como biomarcador, cuya presencia indica que un compuesto, ya sea novedoso o conocido previamente, debe administrarse para tratar un trastorno caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}.

En un aspecto, se divulga un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, un trastorno precanceroso o un cáncer.

Como se usa en el presente documento, la neoactividad es neoactividad de alfa hidroxil y se refiere a la capacidad de una enzima IDH1 mutante codificada por un gen IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante para convertir una alfa cetona en un alfa hidroxil. En algunas realizaciones, la neoactividad de alfa hidroxil se produce con un cofactor reductor, por ejemplo, NADPH o NADH. En algunas realizaciones, la neoactividad de alfa hidroxil es neoactividad de 2HG. Neoactividad de 2HG, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de convertir el alfa-cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (en ocasiones citado en el presente documento como 2HG), por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato (en ocasiones citado en el presente documento como R-2HG). En algunas realizaciones, la neoactividad de 2HG se produce con un cofactor reductor, por ejemplo, NADPH o NADH. En una realización, la enzima codificada por un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, puede actuar en más de un sustrato, por ejemplo, más de un sustrato de alfa hidroxil.

El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor a base de ácido nucleico descrito en el presente documento u otro agente terapéutico de un tipo descrito en el presente documento, para de este modo tratar al sujeto.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D.

El trastorno relacionado con la proliferación celular puede caracterizarse por una mutación IDH2-137^{neo}.

En una realización, el agente terapéutico da como resultado la reducción en el nivel de un producto de neoactividad, por ejemplo, un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

En una realización, el método comprende administrar un agente terapéutico que reduce la neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

En una realización, el método comprende administrar un inhibidor de una enzima codificada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

En una realización, el agente terapéutico comprende un agente terapéutico a base de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNbc descrito en el presente documento.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor, por ejemplo, un polipéptido, péptido o molécula pequeña (por ejemplo, una molécula de menos de 1.000 Dalton) o aptámero, que se une a una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} o una subunidad de tipo silvestre e inhibe la neoactividad, por ejemplo, inhibiendo la formación de un dímero, por ejemplo, un homodímero de subunidades de IDH1 mutantes o un heterodímero de una subunidad mutante y una de tipo silvestre.

En una realización, el inhibidor es un polipéptido. En una realización, el polipéptido actúa como dominante negativo con respecto a la neoactividad de la enzima mutante. El polipéptido puede corresponder a IDH1 de longitud completa

o un fragmento del mismo. No es necesario que el polipéptido sea idéntico con los restos correspondientes de IDH1 de tipo silvestre, pero en algunas realizaciones, tiene al menos un 60, 70, 80, 90 o 95 % de homología con IDH1 de tipo silvestre.

5 En una realización, el agente terapéutico reduce la afinidad de una proteína IDH1-97^{neo} mutante o IDH2-137^{neo} mutante por el NADH, NADPH o un ion de metal divalente, por ejemplo, Mg²⁺ o Mn²⁺ o reduce los niveles o la disponibilidad de NADH, NADPH o ion de metal divalente, por ejemplo, Mg²⁺ o Mn²⁺, por ejemplo, compitiendo por la unión a la enzima mutante. En una realización, la enzima se inhibe reemplazando Mg²⁺ o Mn²⁺ con Ca²⁺.

10 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad de 2HG.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.

15 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que:

inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
 20 inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que se selecciona basándose en que:

25 inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
 inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

30 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína o ARNm de IDH1-G97D mutante.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

35 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D mutante.

40 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de actividad de enzima neoactiva, por ejemplo, interactuando con, por ejemplo, uniéndose a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D mutante. En una realización, el inhibidor es distinto de un anticuerpo.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

45 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, o bien el mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D mutante o interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, el mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

50 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel de una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad de 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante de IDH2-137^{neo}, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.

55 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que:

inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o
 60 inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que se selecciona basándose en que:

65 inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o

inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

5 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de proteína o ARNm de un mutante de IDH2-137^{neo}.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, ARNm de mutante de IDH2-137^{neo}.

10 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, una proteína IDH2-137^{neo} mutante.

15 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de actividad de la enzima neoactiva, por ejemplo, interactuando con, por ejemplo, uniéndose a, una proteína IDH2-137^{neo} mutante. El inhibidor puede ser distinto de un anticuerpo.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se une a, ARNm de mutante de IDH2-137^{neo}.

20 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, o bien la proteína IDH2-137^{neo} mutante o interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, el ARNm del mutante de IDH2-137^{neo}.

25 En una realización, el agente terapéutico es un análogo estructural celular de un producto de neoactividad o un profármaco del mismo, por ejemplo, como se describe en la sección titulada "Análogos estructurales celulares de productos de neoactividad y profármacos de los mismos" en otras partes del presente documento.

En una realización, el agente terapéutico es un agente antiglicolítico, por ejemplo, un agente antiglicolítico descrito en la sección titulada "Compuestos antiglicolíticos" en el presente documento.

30 En una realización, el agente terapéutico es un antioxidante, por ejemplo, un agente antioxidante descrito en la sección titulada "Antioxidantes" en el presente documento.

35 En una realización, el agente terapéutico es un agente hipometilante, por ejemplo, un agente hipometilante descrito en la sección titulada "Agentes hipometilantes" en el presente documento.

40 En una realización, el agente terapéutico hace que el 2HG, por ejemplo, R-2HG, sea más tóxico para las células, por ejemplo, modulando una enzima que da como resultado la conversión de 2HG, por ejemplo, R-2HG, en una sustancia más tóxica, por ejemplo, donde el 2 HG, por ejemplo, R-2HG, actúa como profármaco o un inhibidor que se dirige a 2HG deshidrogenasa o un modulador que da como resultado la conversión de 2HG en otro metabolito que es tóxico para la célula cancerosa.

45 Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden comprender evaluar el genotipo o fenotipo de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Los métodos para obtener y analizar muestras y el análisis en sujetos *in vivo*, descritos en otra parte del presente documento, por ejemplo, en la sección titulada, "Métodos para evaluar muestras y/o sujetos", pueden combinarse con este método.

En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye evaluar el crecimiento, tamaño, peso, invasividad, estadio u otro fenotipo del trastorno relacionado con la proliferación celular.

50 En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye evaluar el genotipo o fenotipo de la neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, el genotipo o fenotipo de neoactividad de 2HG de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La evaluación del genotipo de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG puede comprender determinar si está presente una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, que tenga neoactividad de 2HG. El fenotipo de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, fenotipo de 2HG, por ejemplo, R-2HG, como se usa en el presente documento, se refiere al nivel de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, al nivel de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG o al nivel de una enzima mutante codificada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} (o el ARNm correspondiente). La evaluación puede ser mediante cualquier método descrito en el presente documento. El genotipo de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, se refiere a la secuencia en el resto 97 de IDH1 o el resto 137 en IDH2 (que puede determinarse, por ejemplo, consultando directamente el nucleótido que codifica el resto 97 o 137 o mediante análisis de SNP).

55 En una realización, puede evaluarse al sujeto, antes o después del tratamiento, para determinar si el trastorno relacionado con la proliferación celular se caracteriza por un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

60 En una realización, puede analizarse un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D

o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, un glioma o tumor cerebral en un sujeto, por ejemplo, mediante obtención de imágenes y/o análisis espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, IRM y/o ERM, por ejemplo, antes o después del tratamiento, para determinar si se caracteriza por la presencia de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

5 En una realización, el método comprende evaluar, por ejemplo, mediante examen o evaluación directa del sujeto o una muestra del sujeto o recibir dicha información acerca del sujeto, el genotipo o fenotipo mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} del sujeto, por ejemplo, de una célula, por ejemplo, una célula cancerosa, caracterizada por el trastorno relacionado con la proliferación celular. (Como se describe en más detalle en otras partes del presente documento, la evaluación puede ser, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN del resto 97 de IDH1, inmunoanálisis, evaluación de la presencia, distribución o nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, mediante análisis espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, medición por IRM y/o ERM, análisis del fluido espinal, análisis de orina, análisis de materia fecal (por ejemplo, en el caso del cáncer colorrectal) o mediante análisis de material quirúrgico, por ejemplo, mediante espectroscopia de masas). En algunas realizaciones, esta información se usa para determinar o confirmar que un trastorno relacionado con la proliferación, por ejemplo, un cáncer, se caracteriza por un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En algunas realizaciones, esta información se usa para determinar o confirmar que un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un cáncer, se caracteriza por una enzima codificada por un gen mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

En una realización, antes y/o después de que haya comenzado el tratamiento, se evalúa o monitoriza al sujeto mediante un método descrito en el presente documento, por ejemplo, el análisis de la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar al sujeto, para seleccionar un inhibidor o para evaluar la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, cáncer de próstata, cáncer colorrectal o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} y la evaluación es: evaluación de la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG; o evaluación de la presencia, la distribución o el nivel de una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, neoactividad de 2HG, de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante.

En una realización, la presencia de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, se determina, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN genómico o ADNc, de una célula afectada.

En una realización, el trastorno es distinto de un tumor sólido. En una realización, el trastorno es un tumor que, en el momento del diagnóstico o el tratamiento, no tiene una porción necrótica. En una realización, el trastorno es un tumor en el que al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % de las células tumorales se caracterizan por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, en el momento del diagnóstico o el tratamiento.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D (la secuencia de IDH1 se proporciona en la (SEQ ID NO:8)) o IDH2-137^{neo}.

En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma, caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, en donde el tumor se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización, el tumor se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

- 5 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 10 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 15 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 20 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 25 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 30 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer hematológico, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, en donde el cáncer hematológico se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 35 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, una forma de adulto o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia linfoblástica aguda (en ocasiones citada en el presente documento como ALL) se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La ALL puede ser, por ejemplo, B-ALL o T-ALL. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad 2 alfa hidroxil, por ejemplo, HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 40 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, SEQ ID NO:8 o una mutación IDH2-137^{neo}.
- 45 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 50 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 55 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia mielógena aguda (por ejemplo, una forma de adulto o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia mielógena aguda (en ocasiones citada en el presente documento como AML) se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 60 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, SEQ ID NO:8 o una mutación IDH2-137^{neo}.
- 65 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

- En una realización, el método comprende además evaluar la presencia en el sujeto de una mutación en el gen NRAS o NPMc.
- 5 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, por ejemplo, en donde la mielodisplasia o el síndrome mielodisplásico se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el trastorno se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxí, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 10 En una realización, comprendiendo el método seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el trastorno se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 15 En una realización, comprendiendo el método seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el trastorno se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 20 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxí, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 25 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer colorrectal, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxí, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.
- 30 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.
- 35 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxí, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
- 40 En una realización, un producto de la neoactividad es 2HG (por ejemplo, R-2HG) que actúa como un metabolito. En otra realización, un producto de la neoactividad es 2HG (por ejemplo, R-2HG) que actúa como una toxina, por ejemplo, un carcinógeno.
- 45 En una realización, el sujeto no tiene o no se ha diagnosticado que tenga, aciduria 2-hidroxiglutarica.
- En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden dar como resultado efectos secundarios reducidos en relación con otros métodos conocidos de tratamiento del cáncer.
- 50 Pueden combinarse los agentes y los métodos terapéuticos de la presente evaluación descrita en el presente documento con otras modalidades terapéuticas, por ejemplo, con tratamientos conocidos en la técnica.
- En una realización, el método comprende proporcionar un segundo tratamiento, al sujeto, por ejemplo, eliminación quirúrgica, irradiación o administración de un agente quimioterapéutico, por ejemplo, una administración de un agente alquilante. La administración (o la determinación de niveles terapéuticos) del segundo tratamiento puede: comenzar antes del comienzo o el tratamiento con (o antes de la determinación de los niveles terapéuticos de) el inhibidor; comenzar antes del comienzo o el tratamiento con (o después de la determinación de los niveles terapéuticos de) el inhibidor o puede administrarse concurrentemente con el inhibidor, por ejemplo, para lograr niveles terapéuticos de ambos al mismo tiempo.
- 55 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma y la segunda terapia comprende la administración de uno o más de: radiación; un agente alquilante, por ejemplo, temozolomida, por ejemplo, Temoader® o BCNU; o un inhibidor de HER1/EGFR tirosina cinasa, por ejemplo, erlotinib, por ejemplo, Tarceva®.
- 60 La segunda terapia, por ejemplo, en el caso del glioma, puede comprender el implante de BCNU o carmustina en el cerebro, por ejemplo, implante de una oblea Gliadel®.
- 65

La segunda terapia, por ejemplo, en el caso del glioma, puede comprender la administración de imatinib, por ejemplo, Gleevec®.

5 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer de próstata y la segunda terapia comprende uno o más de: supresión de andrógenos; administración de un estabilizante de microtúbulos, por ejemplo, docetaxel, por ejemplo, Taxotere®; o la administración de un inhibidor de topoisomerasa II, por ejemplo, mitoxantrona.

10 EN una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL y la segunda terapia comprende uno o más de:

15 tratamiento de fase de inducción que comprende la administración de uno o más de: un esteroide; un inhibidor del ensamblaje de microtúbulos, por ejemplo, vincristina; un agente que reduce la disponibilidad de la asparagina, por ejemplo, asparaginasa; una antraciclina; o un antimetabolito, por ejemplo, metotrexato, por ejemplo, metotrexato intratecal o 6-mercaptopurina;

20 tratamiento de fase de consolidación que comprende la administración de uno o más de: un fármaco listado anteriormente para la fase de inducción; un antimetabolito, por ejemplo, un análogo de guanina, por ejemplo, 6-tioguanina; un agente alquilante, por ejemplo, ciclofosfamida; un antimetabolito, por ejemplo, AraC o citarabina; o un inhibidor de topoisomerasa I, por ejemplo, etopósido; o

tratamiento de fase de mantenimiento que comprende la administración de uno o más de los fármacos listados anteriormente para el tratamiento de la fase de inducción o de consolidación.

25 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es AML y la segunda terapia comprende la administración de uno o más de: un inhibidor de topoisomerasa II, por ejemplo, daunorrubicina, idarrubicina, topotecán o mitoxantrona; un inhibidor de topoisomerasa I, por ejemplo, etopósido; un antimetabolito, por ejemplo, AraC o citarabina; o un agente hipometilante, por ejemplo, decitabina (5-aza-desoxicitidina) o azacitidina (5-azacitidina).

30 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico y la segunda terapia comprende la administración de uno o más de: un inhibidor de topoisomerasa II, por ejemplo, daunorrubicina, idarrubicina, topotecán o mitoxantrona; un inhibidor de topoisomerasa I, por ejemplo, etopósido; un antimetabolito, por ejemplo, AraC o citarabina; o un agente hipometilante, por ejemplo, decitabina (5-aza-desoxicitidina) o azacitidina (5-azacitidina).

35 Como se ha analizado anteriormente, los inventores han descubierto que los mutantes de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tienen, por ejemplo, neoactividad de 2HG, pueden dar como resultado aumentos significativos en el nivel de producto de neoactividad celular de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En algunas realizaciones, el método incluye proporcionar un tratamiento al sujeto que tiene un trastorno caracterizado por un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, en donde el tratamiento comprende:

40 i) proporcionar un tratamiento que reduce la capacidad de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, para competir con un análogo estructural celular del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, para su interacción con, por ejemplo, unión, a un componente celular;

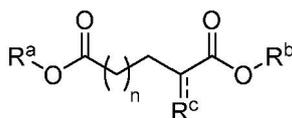
45 ii) administrar al sujeto, un análogo estructural celular del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o un profármaco del mismo; o

50 iii) administrar un compuesto que reduce los niveles celulares del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, degradando o metabolizando el producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, tratando de este modo a dicho sujeto.

55 En una realización, reducir la capacidad de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado para competir con un análogo estructural celular del producto de neoactividad de alfa hidroxilado significa aumentar la concentración celular del análogo estructural del producto de neoactividad de alfa hidroxilado en relación con la concentración del producto de neoactividad de alfa hidroxilado.

60 En una realización, un análogo estructural del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, es una sustancia que compite, en condiciones fisiológicas, con el producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por la unión a un componente celular, por ejemplo, una enzima, por ejemplo, prolil hidroxilasa, una dioxigenasa, una histona desmetilasa, tal como un miembro de la familia JHDM (las proteínas JHDM usan alfa cetoglutarato y hierro (Fe) como cofactores para hidroxilar el sustrato metilado). La afinidad del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por el sustrato es al menos de la misma magnitud que la afinidad del análogo estructural del producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, para una o más de las enzimas nombradas.

65 En una realización, el análogo estructural celular del producto de neoactividad de alfa hidroxilado es un compuesto de la siguiente fórmula:



en donde;

5 cada R^a y R^b son independientemente H, un ion metálico o una carga negativa;
 R^c es un donante o aceptor de enlace de hidrógeno y puede estar unido a la cadena de carbono mediante un
 enlace sencillo o doble, como se indica mediante la línea discontinua; y
 n es 0, 1 o 2.

10 Los donantes de enlace de hidrógeno ejemplares incluyen grupos hidroxilo y amino. Un aceptor de enlace de hidrógeno
 ejemplar es un carbonilo.

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

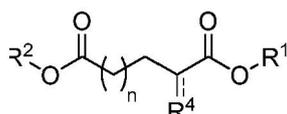
20 En una realización, la competición comprende competición entre el producto de neoactividad de alfa hidroxilo, por
 ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG y un análogo estructural celular del producto de neoactividad de alfa hidroxilo, por
 ejemplo, alfa cetoglutarato, por la interacción con un componente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

30 En realizaciones, el nivel aumentado del producto de neoactividad de alfa hidroxilo, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-
 2HG, altera la función celular, por ejemplo, el metabolismo celular o la función mitocondrial, compitiendo con
 componentes celulares que son estructuralmente similares al producto de neoactividad de alfa hidroxilo, por ejemplo,
 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, por el acceso a los sustratos.

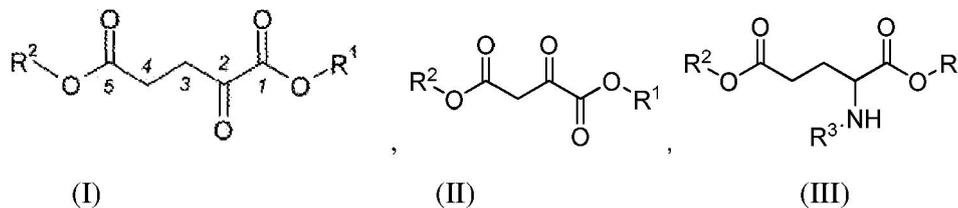
35 En una realización, el tratamiento comprende administrar un compuesto, por ejemplo, un compuesto descrito en el
 presente documento, que es un análogo estructural celular de origen natural de 2HG, por ejemplo, R-2HG o un
 profármaco del análogo estructural celular de origen natural.

40 Los compuestos adecuados comprenden, por ejemplo, un metabolito, por ejemplo, glutamato o alfa cetoglutarato o un
 profármaco del mismo. En una realización, el compuesto compite con 2HG, por ejemplo, R-2HG, por la unión a una
 enzima. Las enzimas ejemplares comprenden prolil hidroxilasa celular, una dioxigenasa o una histona desmetilasa, tal
 como un miembro de la familia JHDM.

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



45 en donde R¹, R², R⁴ y n son como se describen en el presente documento. Las estructuras ejemplares incluyen
 aquellas estructuras de fórmula (I), (II), (III), (IV) o (V):



celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;

determinar el estadio del sujeto, por ejemplo, determinar el estadio de un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;

proporcionar un pronóstico para el sujeto, por ejemplo, proporcionando un pronóstico para un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso;

determinar la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, la eficacia de un agente quimioterápico, irradiación o cirugía;

determinar la eficacia de un tratamiento con un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor, descrito en el presente documento;

seleccionar al sujeto para un tratamiento para un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso. La selección puede basarse en la necesidad de una reducción en la neoactividad o en la necesidad de mejora de una afección asociada con o resultante de la neoactividad. Por ejemplo, se determina que el sujeto tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, por ejemplo, cáncer o un trastorno precanceroso caracterizado por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o por una mutación IDH1-97^{neo} o una mutación IDH2-137^{neo}, seleccionando al sujeto para tratamiento con un agente terapéutico descrito en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor (*por ejemplo*, una molécula pequeña o un inhibidor a base de ácidos nucleicos) de la neoactividad de dicho mutante (*por ejemplo*, conversión de alfa-cetoglutarato en 2HG, por ejemplo, R-2HG);

correlacionar el análisis con un resultado o un pronóstico;

proporcionar un valor para un análisis en el que se basa la evaluación, por ejemplo, el valor para un parámetro correlacionado con la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;

proporcionar una recomendación para el tratamiento del sujeto; o

almacenar en un dispositivo de memoria un resultado o la salida del método, por ejemplo, una medida efectuada durante la ejecución del método y opcionalmente, transmitir lo almacenado en memoria a un tercero, por ejemplo, el sujeto, un proveedor de servicios sanitarios o una entidad que se hace cargo del pago del tratamiento del sujeto, por ejemplo, un gobierno, compañía aseguradora u otro tercero pagador.

Como se describe en el presente documento, la evaluación puede proporcionar información en la que pueden basarse una serie de decisiones o tratamientos.

Por lo tanto, en una realización, el resultado de la evaluación, por ejemplo, un nivel no deseado de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en una célula o tejido que tiene una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}; la presencia de una neoactividad de IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, neoactividad de 2HG; la presencia de una proteína IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo} mutante (o el ARN correspondiente) que tiene, por ejemplo, neoactividad de 2HG; la presencia de una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, que tiene, neoactividad de 2HG, por ejemplo, un alelo divulgado en el presente documento, es indicativo de:

un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, cáncer, por ejemplo, es indicativo de una lesión primaria o metastásica;

el estadio de un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo};

un pronóstico o resultado para un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, es indicativo de una forma menos agresiva del trastorno, por ejemplo, cáncer. Por ejemplo, en el caso de un trastorno de glioma caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, la presencia de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, puede indicar una forma menos agresiva del cáncer;

la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, la eficacia de un agente quimioterápico, irradiación o cirugía; la necesidad de una terapia divulgada en el presente documento, por ejemplo, la inhibición de una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}. En una realización, los niveles relativamente mayores (o la presencia del mutante de IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}) se correlaciona con la necesidad de inhibición de una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}; o

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

Como se describe en el presente documento, la evaluación puede posibilitar la selección de un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

Por lo tanto, en una realización, el método comprende, por ejemplo, en respuesta al análisis de uno o más de a-d, seleccionar a un sujeto, por ejemplo, para un tratamiento. El sujeto puede seleccionarse basándose en lo descrito en el presente documento, por ejemplo, basándose en que:

5 dicho sujeto se encuentre en riesgo de o tenga, niveles mayores de lo normal de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2-hidroxiglutarato (*por ejemplo*, R-2HG) en una célula que tenga un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, una leucemia, tal como AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL o una lesión tumoral, por ejemplo, cáncer colorrectal, un glioma o un tumor de próstata;

10 teniendo dicho sujeto un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG; teniendo dicho sujeto una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo};

15 necesitando dicho sujeto un trastorno relacionado con la proliferación;

20 necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un agente terapéutico de un tipo descrito en el presente documento;

25 necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un compuesto que inhibe la neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG;

necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un compuesto que reduce el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;

necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un agente antiglicolítico o un antioxidante, por ejemplo, para mejorar los efectos de un producto de neoactividad de alfa hidroxil no deseado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un tratamiento que mejore un efecto de la competición de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, con un componente celular, por ejemplo, alfa cetoglutarato, por la interacción con un componente celular.

necesitando dicho sujeto o pudiéndose beneficiar de, un agente terapéutico que hace que el 2HG, por ejemplo, R-2HG, sea más tóxico para las células, por ejemplo, modulando una enzima que da como resultado la conversión de 2HG, por ejemplo, R-2HG, en una sustancia más tóxica, por ejemplo, donde el 2 HG, por ejemplo, R-2HG, actúa como un profármaco.

En una realización, la evaluación comprende seleccionar al sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, para su tratamiento con un agente antineoplásico, al establecerse o determinarse que, el sujeto tiene un producto de neoactividad de alfa hidroxil no deseado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o neoactividad de alfa hidroxil no deseada, por ejemplo, neoactividad de 2HG o que el sujeto necesita inhibición de una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, descrito en el presente documento.

Las evaluaciones posibilitadas mediante los métodos descritos en el presente documento permiten la selección de regímenes de tratamiento óptimos para sujetos que tienen un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

Por lo tanto, en una realización, el método comprende, por ejemplo, en respuesta al análisis de uno o más de a-d, seleccionar un tratamiento para el sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, seleccionar un tratamiento basándose en lo divulgado en el presente documento. El tratamiento puede ser la administración de un agente terapéutico divulgado en el presente documento. El tratamiento puede seleccionarse basándose en que:

45 es útil para tratar un trastorno caracterizado por uno o más de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG, una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante que tenga neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente);

50 es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un mutante de IDH1-97^{neo} o IDH2-137^{neo}, que codifica una proteína con neoactividad de 2HG, por ejemplo, un alelo divulgado en el presente documento, en células caracterizadas por un trastorno relacionado con la proliferación celular del sujeto;

55 reduce el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG;

reduce el nivel de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG;

es útil en el tratamiento de un cáncer que tiene daño mitocondrial asociado con niveles aumentados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil no deseado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG y es, por ejemplo, un agente antiglicolítico o un antioxidante; o

es útil en el tratamiento de un cáncer que tiene niveles de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, que compiten con un componente celular, por ejemplo, alfa cetoglutarato, por la interacción con un componente celular.

En una realización, la evaluación comprende seleccionar al sujeto, por ejemplo, para el tratamiento.

En algunas realizaciones, el tratamiento es la administración de un agente terapéutico descrito en el presente documento.

Los métodos también pueden incluir tratar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, con un tratamiento seleccionado en respuesta a o basándose en, una evaluación efectuada en el método.

Por lo tanto, en una realización, el método comprende, por ejemplo, en respuesta al análisis de uno o más de a-d, administrar un tratamiento al sujeto, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico de un tipo descrito en el presente documento.

5 En una realización, el agente terapéutico comprende ácido nucleico, por ejemplo, ARNbc, por ejemplo, un ARNbc descrito en el presente documento.

10 En una realización, el agente terapéutico da como resultado la reducción en el nivel de un producto de neoactividad, por ejemplo, un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

En una realización, el método comprende administrar un agente terapéutico que reduce la neoactividad, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

15 En una realización, el método comprende administrar un inhibidor de una enzima codificada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

20 En una realización, el agente terapéutico comprende un agente terapéutico a base de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNbc descrito en el presente documento.

25 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor, por ejemplo, un polipéptido, péptido o molécula pequeña (por ejemplo, una molécula de menos de 1.000 Dalton) o aptámero, que se une a una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} o una subunidad de tipo silvestre e inhibe la neoactividad, por ejemplo, inhibiendo la formación de un dímero, por ejemplo, un homodímero de subunidades de IDH1 mutantes o un heterodímero de una subunidad mutante y una de tipo silvestre. En una realización, el inhibidor es un polipéptido. En una realización, el polipéptido actúa como dominante negativo con respecto a la neoactividad de la enzima mutante. El polipéptido puede corresponder a IDH1 de longitud completa o un fragmento del mismo. No es necesario que el polipéptido sea idéntico con los restos correspondientes de IDH1 de tipo silvestre, pero en algunas realizaciones, tiene al menos un 60, 70, 80, 90 o 95 % de homología con IDH1 de tipo silvestre.

30 En una realización, el agente terapéutico reduce la afinidad de una proteína IDH1-97^{neo} mutante o IDH2-137^{neo} mutante por el NADH, NADPH o un ion de metal divalente, por ejemplo, Mg²⁺ o Mn²⁺ o reduce los niveles o la disponibilidad de NADH, NADPH o ion de metal divalente, por ejemplo, Mg²⁺ o Mn²⁺, por ejemplo, compitiendo por la unión a la enzima mutante. En una realización, la enzima se inhibe reemplazando Mg²⁺ o Mn²⁺ con Ca²⁺.

35 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad de 2HG.

40 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que:

45 inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

50 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que se selecciona basándose en que:

55 inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína o ARNm de IDH1-G97D mutante.

60 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D mutante.

65 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de actividad de enzima neoactiva, por ejemplo, interactuando con, por ejemplo, uniéndose a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D

mutante. En una realización, el inhibidor es distinto de un anticuerpo.

En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se une a, mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

5 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, o bien el mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, proteína de IDH1-G97D mutante o interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, el mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, ARNm de IDH1-G97D mutante.

10 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel de una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad de 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante de IDH2-137^{neo}, por ejemplo, reduce el nivel de 2HG, por ejemplo, R-2HG.

15 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que:

inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o

20 inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que se selecciona basándose en que:

25 inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o

inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como una neoactividad de un mutante de IDH2-137^{neo}, neoactividad descrita en el presente documento, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

30 En una realización, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce la cantidad de mutante, proteína o ARNm de IDH2-137^{neo}.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, ARNm de mutante de IDH2-137^{neo}.

35 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, una proteína IDH2-137^{neo} mutante.

40 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de actividad de la enzima neoactiva, por ejemplo, interactuando con, por ejemplo, uniéndose a, una proteína IDH2-137^{neo} mutante. El inhibidor puede ser distinto de un anticuerpo.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, por ejemplo, se une a, ARNm de mutante de IDH2-137^{neo}.

45 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, o bien la proteína IDH2-137^{neo} mutante o interactúa directamente con, por ejemplo, se une a, el ARNm del mutante de IDH2-137^{neo}.

50 En una realización, el agente terapéutico es un análogo estructural celular de un producto de neoactividad o un profármaco del mismo, por ejemplo, como se describe en la sección titulada "Análogos estructurales celulares de productos de neoactividad y profármacos de los mismos" en otras partes del presente documento.

En una realización, el agente terapéutico es un agente antiglucolítico, por ejemplo, un agente antiglucolítico descrito en la sección titulada "Compuestos antiglucolíticos" en el presente documento.

55 En una realización, el agente terapéutico es un antioxidante, por ejemplo, un agente antioxidante descrito en la sección titulada "Antioxidantes" en el presente documento.

60 En una realización, el agente terapéutico es un agente hipometilante, por ejemplo, un agente hipometilante descrito en la sección titulada "Agentes hipometilantes" en el presente documento.

En una realización, el agente terapéutico hace que el 2HG, por ejemplo, R-2HG, sea más tóxico para las células, por ejemplo, modulando una enzima que da como resultado la conversión de 2HG, por ejemplo, R-2HG, en una sustancia más tóxica, por ejemplo, donde el 2 HG, por ejemplo, R-2HG, actúa como un profármaco.

65 En una realización, se administra el agente terapéutico.

5 En una realización, el tratamiento: inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D. En una realización, se evalúa o monitoriza posteriormente al sujeto mediante un método descrito en el presente documento, por ejemplo, el análisis de la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, para evaluar la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad.

10 En una realización, el tratamiento se selecciona basándose en que: inhibe, por ejemplo, específicamente, una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, neoactividad de 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

15 En una realización, el método comprende determinar la posibilidad de una mutación distinta de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En algunas realizaciones, un nivel relativamente elevado de 2HG, por ejemplo, R-2HG es indicativo de otra mutación.

20 En una realización, dicha realización incluye seleccionar o administrar un tratamiento al sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, en donde el sujeto:
 aún no ha sido tratado para el presente trastorno relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado es el tratamiento inicial o de primera línea;
 ya ha sido tratado para el trastorno relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado da como resultado una alteración del tratamiento existente;
 25 ya ha sido tratado para el trastorno relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado da como resultado una continuación del tratamiento existente; o
 ya ha sido tratado para el trastorno relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado es diferente, por ejemplo, en comparación con lo que se administró antes de la evaluación o con lo que se administraría en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.
 30

En una realización, dicha realización incluye seleccionar o administrar un tratamiento para el sujeto, pudiendo comprender el tratamiento seleccionado o administrado:

35 un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico a una dosis diferente, por ejemplo, una dosis mayor (o menor) (por ejemplo, diferente en comparación con lo que se administró antes de la evaluación o con lo que se administraría en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG);
 un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico con una frecuencia diferente, por ejemplo,
 40 con mayor o menor frecuencia o en absoluto (por ejemplo, diferente en comparación con lo que se administró antes de la evaluación o con lo que se administraría en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG); o un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico en una situación terapéutica diferente (*por ejemplo*, añadiendo o eliminando un segundo tratamiento del régimen de tratamiento) (por ejemplo, diferente en comparación con lo que se administró antes de la evaluación o con lo que se administraría en ausencia de niveles elevados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG).
 45

50 Los métodos para evaluar a un sujeto descritos en el presente documento pueden comprender evaluar un genotipo o fenotipo de neoactividad. Los métodos para obtener y analizar muestras y el análisis en sujetos *in vivo*, descritos en otra parte del presente documento, por ejemplo, en la sección titulada, "Métodos para evaluar muestras y/o sujetos", pueden combinarse con este método.

En una realización, el método comprende:

55 someter al sujeto (por ejemplo, un sujeto que no tenga aciduria 2-hidroxiglutarica) a un análisis de obtención de imágenes y/o espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, IRM y/o ERM, *por ejemplo*, análisis de obtención de imágenes, para proporcionar una determinación de la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, asociado con un tumor, por ejemplo, un glioma, en el sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo};
 60 opcionalmente, almacenar un parámetro relacionado con la determinación, por ejemplo, la imagen o un valor relacionado con la imagen del análisis de obtención de imágenes, en un medio tangible; y
 en respuesta a la determinación, llevar a cabo uno o más de: correlacionar la determinación con el resultado o con un pronóstico; proporcionar una indicación del resultado o el pronóstico; proporcionar un valor para un análisis en el que se basa la evaluación, por ejemplo, la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de
 65

5 alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG; proporcionar una recomendación para el tratamiento del sujeto; seleccionar un curso de tratamiento para el sujeto, por ejemplo, un ciclo de tratamiento descrito en el presente documento, por ejemplo, seleccionar un ciclo de tratamiento que incluye inhibir una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}; administrar un ciclo de tratamiento al sujeto, por ejemplo, un ciclo de tratamiento descrito en el presente documento, por ejemplo, un ciclo de tratamiento que incluye inhibir una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}; y memorizar un resultado del método o una medida efectuada en el transcurso del método, por ejemplo, una o más de las anteriores y/o transmitir los datos almacenados en memoria de uno o más de los anteriores a un tercero, por ejemplo, el sujeto, un proveedor de servicios sanitarios o una entidad que se hace cargo del pago del tratamiento del sujeto, por ejemplo, un gobierno, compañía aseguradora u otro tercero pagador.

15 En una realización, el método comprende confirmar o determinar, por ejemplo, mediante examen o evaluación directamente del sujeto o una muestra, por ejemplo, tejido o fluido corporal (por ejemplo, sangre (por ejemplo, plasma sanguíneo), orina, linfa o líquido cefalorraquídeo) del mismo, (por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o análisis inmunológico o evaluación de la presencia, distribución o nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG) o recibir dicha información acerca del sujeto, de que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

20 En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye evaluar el crecimiento, tamaño, peso, invasividad, estadio u otro fenotipo del trastorno relacionado con la proliferación celular.

25 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, cáncer colorrectal, cáncer de próstata o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico y la evaluación es a o b.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer colorrectal y la evaluación es a o b.

30 En una realización, se somete a un sujeto a ERM y la evaluación comprende evaluar la presencia o la cantidad elevada de un pico correlacionado con o correspondiente a 2HG, por ejemplo, R-2HG, determinada mediante resonancia magnética. Por ejemplo, puede analizarse en un sujeto la presencia y/o la fuerza de una señal a aproximadamente 2,5 ppm para determinar la presencia y/o la cantidad de 2HG, por ejemplo, R-2HG en el sujeto.

35 En una realización, el método comprende obtener una muestra del sujeto y analizar la muestra o analizar al sujeto, por ejemplo, obteniendo imágenes del sujeto y opcionalmente, formando una representación de la imagen en un ordenador.

En una realización, los resultados del análisis se comparan con una referencia.

40 En una realización, se determina un valor para un parámetro correlacionado con la presencia, la distribución o el nivel, por ejemplo, de 2HG, por ejemplo, R-2HG. Puede compararse con un valor de referencia, por ejemplo, el valor para un sujeto de referencia que no tiene una presencia, nivel o distribución anormal, por ejemplo, un sujeto de referencia que no tiene una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D.

45 En una realización, el método comprende determinar si está presente una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La determinación puede comprender secuenciar un ácido nucleico, por ejemplo, ADN genómico o ADNc, de una célula afectada, que codifica el o los aminoácidos relevantes. La mutación puede ser una eliminación, inserción, reorganización o sustitución. La mutación puede implicar un solo nucleótido, por ejemplo, una sola sustitución o más de un nucleótido, por ejemplo, una eliminación de más de un nucleótido.

50 En una realización, el sujeto no tiene o no se ha diagnosticado que tenga, aciduria 2-hidroxiglutarica.

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

60 En una realización, el trastorno es distinto de un tumor sólido. En una realización, el trastorno es un tumor que, en el momento del diagnóstico o el tratamiento, no tiene una porción necrótica. En una realización, el trastorno es un tumor en el que al menos un 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % de las células tumorales portan una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG, en el momento del diagnóstico o el tratamiento.

65 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D (la secuencia de IDH1 se proporciona en la (SEQ ID NO:8)) o IDH2-137^{neo}.

5 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma, caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

10 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, en donde el tumor se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización, el tumor se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

15 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

20 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene un glioma caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

25 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

30 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

35 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

40 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer de próstata caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

45 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer hematológico, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML o ALL, en donde el cáncer hematológico se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

50 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, una forma de adulto o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia linfoblástica aguda (en ocasiones citada en el presente documento como ALL) se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La ALL puede ser, por ejemplo, B-ALL o T-ALL. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

55 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, SEQ ID NO:8 o una mutación IDH2-137^{neo}.

60 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

65 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL, caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia mielógena aguda (por ejemplo,

una forma de adulto o pediátrica), por ejemplo, en donde la leucemia mielógena aguda (en ocasiones citada en el presente documento como AML) se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

5 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, SEQ ID NO:8 o una mutación IDH2-137^{neo}.

10 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

15 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) caracterizada por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

20 En una realización, el método comprende además evaluar la presencia en el sujeto de una mutación en el gen NRAS o NPMc.

25 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, por ejemplo, en donde la mielodisplasia o el síndrome mielodisplásico se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el trastorno se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

30 En una realización, comprendiendo el método seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el trastorno se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

35 En una realización, comprendiendo el método seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el trastorno se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

40 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

45 En una realización, el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer colorrectal, por ejemplo, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en comparación con células no enfermas del mismo tipo.

50 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

55 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal, basándose en que el cáncer se caracterice por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

60 En una realización, el método comprende seleccionar a un sujeto que tiene cáncer colorrectal caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, basándose en que el cáncer se caracterice por niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

Un método de tratar a un sujeto con aciduria (por ejemplo, un sujeto con aciduria 2-hidroxiglutarica) que comprende:

65 determinar si el sujeto tiene una mutación neoactiva en el resto 97 de IDH1, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, una mutación de línea germinal, que tiene neoactividad de 2HG o determinar la ausencia de una mutación de 2HG

deshidrogenasa junto con niveles elevados de 2HG; y

en respuesta a dicha determinación, por ejemplo, en respuesta a la presencia de dicha mutación, administrar uno o más de: un inhibidor de la neoactividad; un tratamiento que reduce la competición entre 2HG y un análogo estructural celular de 2HG; un agente antiglicolítico; un antioxidante; o un agente hipometilante, tratando de este modo a dicho sujeto.

En algunas realizaciones preferidas, el método incluye determinar si el sujeto tiene una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, una mutación de línea germinal, que tiene neoactividad de 2HG.

5 Puede determinarse que un sujeto tiene una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} usando métodos descritos en el presente documento.

10 En otro aspecto, la invención presenta un método para evaluar a un sujeto con aciduria (por ejemplo, un sujeto con aciduria 2-hidroxi-glutárica), comprendiendo el método, determinar si el sujeto tiene una mutación de IDH, por ejemplo, de IDH1 o IDH2, (por ejemplo, una mutación de línea germinal, tal como una mutación descrita en el presente documento), que tiene neoactividad de 2HG o determinar la ausencia de una mutación de 2HG deshidrogenasa junto con niveles elevados de 2HG. La determinación puede efectuarse usando métodos descritos en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, el sujeto no tiene o no se le ha diagnosticado un cáncer, por ejemplo, un cáncer del SNC.

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

25 Además se describe una composición farmacéutica de un agente terapéutico, por ejemplo, inhibidor (por ejemplo, un inhibidor de molécula pequeña o uno basado en ácidos nucleicos), descrito en el presente documento.

30 Además, se describe un método para evaluar un compuesto candidato respecto de su capacidad para inhibir una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, para su uso como un agente antiproliferativo o anticanceroso. En una realización, la neoactividad es neoactividad de 2HG. El método comprende:

35 opcionalmente, suministrar el compuesto candidato;
 poner en contacto el compuesto candidato con una enzima IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, una enzima IDH1-G97D o una enzima IDH2-137^{neo} mutante, (o con una célula o lisado celular que comprende la misma); y
 evaluar la capacidad del compuesto candidato para modular, por ejemplo, inhibir o promocionar, la neoactividad,

evaluando de este modo al compuesto candidato.

40 El método puede incluir evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la neoactividad.

El método puede comprender además evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la reacción directa de IDH1, la conversión del isocitrato en α -cetoglutarato (o un intermedio del mismo, incluyendo el intermedio de hidroxil reducido).

45 En una realización, la etapa de puesta en contacto comprende poner en contacto el compuesto candidato con una célula o un lisado del mismo, en donde la célula comprende una enzima mutante codificada por un gen de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante.

50 En una realización, la célula comprende una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

55 En una realización, la célula incluye una copia heteróloga de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. (Copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada mediante una manipulación por ingeniería genética).

60 En una realización, la célula se transfecta (*por ejemplo*, se transfecta de manera transitoria o estable) o se transduce (*por ejemplo*, se transduce de manera transitoria o estable) con una secuencia de ácido nucleico que codifica una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, la enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, está marcada epitópicamente, por ejemplo, marcada con myc.

65 En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria o una línea celular. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, un glioma, por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de colon, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, de B-ALL o T-ALL o una célula de AML), una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásica, una célula cancerosa de fibrosarcoma, una célula cancerosa de paranglioma, una célula cancerosa de mieloma, una célula de cáncer de tiroides, una célula cancerosa

de sarcoma u osteosarcoma o una célula caracterizada por neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML). En una realización, la célula es una célula 293T, una célula U87MG o una célula LN-18 (por ejemplo, ATCC HTB-14 o CRL-2610).

- 5 En una realización, la célula es de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, por ejemplo, un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

10 En una realización, la etapa de evaluación comprende evaluar la presencia y/o la cantidad de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, por ejemplo, en el lisado celular o el medio de cultivo, por ejemplo, mediante CL-EM.

En una realización, la etapa de evaluación comprende evaluar la presencia y/o la cantidad de una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG, en el lisado celular o el medio de cultivo.

- 15 En una realización, el método comprende además evaluar la presencia/cantidad de uno o más metabolitos de TCA, por ejemplo, citrato, α -KG, succinato, fumarato y/o malato, por ejemplo, mediante CL-EM, por ejemplo, como control.

20 En una realización, el método comprende además evaluar el estado de oxidación del NADPH, por ejemplo, la absorbancia a 340 nm, por ejemplo, mediante un espectrofotómetro.

En una realización, el método comprende además evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir una segunda actividad enzimática, por ejemplo, la reacción directa de IDH1 no mutante o de tipo silvestre, la conversión del isocitrato en α -cetoglutarato (o un intermedio del mismo, incluyendo el intermedio de hidroxil reducido).

25 En una realización, el compuesto candidato es una molécula pequeña, un polipéptido, péptido, una molécula a base de carbohidratos o un aptámero (por ejemplo, un aptámero de ácido nucleico o un aptámero peptídico). El método puede usarse ampliamente y puede, por ejemplo, usarse como uno o más de una detección sistemática primaria, para confirmar los candidatos producidos mediante este u otros métodos o detecciones sistemáticas o en general, para guiar el descubrimiento de fármacos o la optimización de fármacos candidatos.

30 En una realización, el método comprende evaluar, por ejemplo, confirmar, la capacidad de un compuesto candidato (*por ejemplo*, un compuesto candidato que cumple con un nivel predeterminado de inhibición en la etapa de evaluación) para inhibir la neoactividad de IDH1-97^{neo} en un segundo ensayo.

35 En una realización, el segundo ensayo comprende repetir una o más de las etapas de puesta en contacto y/o de evaluación del método básico.

40 En otra realización, el segundo ensayo es diferente del primero. *Por ejemplo*, cuando el primer ensayo puede usar una célula o un lisado celular u otro modelo de animal no completo, el segundo ensayo puede usar un modelo animal, por ejemplo, un modelo de trasplante de tumor, por ejemplo, un ratón al que se le ha trasplantado una célula o un tumor mutante para IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Por ejemplo, una célula U87 u otra célula de glioma, por ejemplo, blastoma, que porta una mutación IDH1-97^{neo} transfectada, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, puede implantarse como un xenoinjerto y usarse en un ensayo. Pueden injertarse células tumorales de glioma o de AML humanas primarias que expresan una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante en ratones para permitir la propagación del tumor y usarse en un ensayo. También pueden usarse en dichos ensayos otras líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. También puede usarse en un ensayo un modelo de ratón modificado por ingeniería genética (GEMM) que porta una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} y opcionalmente otra mutación.

50 En una realización, el método comprende:

opcionalmente, suministrar el compuesto candidato;

55 poner en contacto el compuesto candidato con una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia heteróloga, que codifica un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}; y

evaluar la presencia y/o la cantidad de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en el lisado celular o el medio de cultivo, mediante CL-EM, evaluando de este modo al compuesto.

60 En una realización, el resultado de la evaluación se compara con una referencia, por ejemplo, el nivel de producto, por ejemplo, un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en una célula de control, por ejemplo, una célula en la que se ha insertado una copia de tipo silvestre o no mutante de IDH1.

65 En otro aspecto, la invención presenta, un método para evaluar un compuesto candidato, por ejemplo, respecto de su capacidad para inhibir un ARN que codifica una enzima IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, para su uso como un agente antiproliferativo o anticanceroso. En una realización, la neoactividad es

neoactividad de 2HG. El método comprende:

opcionalmente, suministrar el compuesto candidato, por ejemplo, un inhibidor a base de ácido nucleico (por ejemplo, un ARNbc (por ejemplo, ARNpi o ARNhc), uno antisentido o un microARN);
 5 poner en contacto el compuesto candidato con un ARN, por ejemplo, un ARNm, que codifica una enzima IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante (o con una célula o lisado celular que comprende la misma); y
 evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir el ARN, evaluando de este modo al compuesto candidato. Por inhibir el ARN se entiende, por ejemplo, escindir o de otro modo inactivar el ARN.

10 En una realización, el ARN codifica una fusión de la totalidad o parte de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante a una segunda proteína, por ejemplo, una proteína indicadora, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

15 En una realización, la etapa de puesta en contacto comprende poner en contacto el compuesto candidato con una célula o un lisado del mismo, en donde la célula comprende ARN que codifica una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante.

20 En una realización, la célula incluye una copia heteróloga de un gen de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. (Copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada mediante una manipulación por ingeniería genética). En una realización, el gen heterólogo comprende una fusión a una proteína indicadora, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

25 En una realización, la célula se transfecta (*por ejemplo*, se transfecta de manera transitoria o estable) o se transduce (*por ejemplo*, se transduce de manera transitoria o estable) con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, está marcada epitópicamente, por ejemplo, marcada con myc.

30 En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria o una línea celular, que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la célula es una célula 293T que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, un glioma, por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de colon, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, de B-ALL o T-ALL o una célula de AML), una célula
 35 caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásica, una célula cancerosa de fibrosarcoma, una célula cancerosa de paranglioma, una célula cancerosa de mieloma, una célula de cáncer de tiroides, una célula cancerosa de sarcoma u osteosarcoma o una célula caracterizada por neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML), que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante.

40 En una realización, la célula es de un sujeto que tiene un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

45 En una realización, el método comprende un segundo ensayo que comprende repetir una o más de las etapas de puesta en contacto y/o de evaluación del método básico.

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

55 En una realización, la eficacia del candidato se evalúa por su efecto en la actividad de la proteína indicadora.

60 En otro aspecto, la invención presenta, un método para evaluar un compuesto candidato, por ejemplo, respecto de su capacidad para inhibir la transcripción de un ARN que codifica una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, por ejemplo, para su uso como un agente antiproliferativo o anticanceroso. En una realización, la neoactividad es neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG. El método comprende:

opcionalmente, suministrar el compuesto candidato, por ejemplo, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptámero, una molécula a base de carbohidratos o una molécula a base de ácido nucleico;
 poner en contacto el compuesto candidato con un sistema que comprende una célula o un lisado celular; y
 65 evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la traducción de un ARN que codifica una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, evaluando de este modo al compuesto candidato.

En una realización, el sistema comprende un gen de fusión que codifica la totalidad o parte de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante a una segunda proteína, por ejemplo, una proteína indicadora, por ejemplo, una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína fluorescente verde o roja.

En una realización, la célula es una célula cultivada, por ejemplo, una célula primaria, una célula secundaria o una

línea celular, que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la célula es una célula 293T que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de glioma (por ejemplo, un glioma, por ejemplo, una célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de colon, una célula de leucemia (por ejemplo, una célula de ALL, por ejemplo, de B-ALL o T-ALL o una célula de AML), una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásica, una célula cancerosa de fibrosarcoma, una célula cancerosa de parangangioma, una célula cancerosa de mieloma, una célula de cáncer de tiroides, una célula cancerosa de sarcoma u osteosarcoma o una célula caracterizada por neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML), que expresa una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En una realización, la célula es de un sujeto que tiene un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

En una realización, el método comprende un segundo ensayo y el segundo ensayo comprende repetir el método.

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

En una realización, la eficacia del candidato se evalúa por su efecto en la actividad de la proteína indicadora.

En otro aspecto, la invención presenta un método para evaluar un compuesto candidato, por ejemplo, un agente terapéutico o un inhibidor, para reducir la actividad de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante en un modelo animal. El compuesto candidato puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptámero, una molécula a base de carbohidratos o una molécula a base de ácido nucleico. El método comprende, poner en contacto el candidato con el modelo animal y evaluar el modelo animal.

En una realización, la evaluación comprende;

- determinar un efecto del compuesto en la salud general del animal;
- determinar un efecto del compuesto en el peso del animal;
- determinar un efecto del compuesto en la función hepática, por ejemplo, en una enzima hepática;
- determinar un efecto del compuesto en el sistema cardiovascular del animal;
- determinar un efecto del compuesto en la función neural, por ejemplo, en el control o la respuesta neuromuscular;
- determinar un efecto del compuesto en la alimentación o la bebida;
- determinar la distribución del compuesto en el animal;
- determinar la persistencia del compuesto en el animal o en un tejido u órgano del animal, por ejemplo, determinar la semivida en plasma; o
- determinar un efecto del compuesto en una célula seleccionada en el animal;
- determinar un efecto del compuesto en el crecimiento, tamaño, peso, la invasividad u otro fenotipo de un tumor, por ejemplo, un tumor endógeno o un tumor que surge de la introducción de células de la misma especie u otra diferente.

En una realización, el animal es un primate no humano, por ejemplo, un mono cinomolgo o un chimpancé.

En una realización, el animal es un roedor, por ejemplo, una rata o ratón.

En una realización, el animal es un animal grande, por ejemplo, un perro o cerdo, distinto de un primate no humano.

En una realización, la evaluación se almacena en un dispositivo de memoria y opcionalmente, se transmite a un tercero.

En un aspecto, la invención proporciona, un método para evaluar o procesar un agente terapéutico que da como resultado una reducción del nivel de un producto neoactivo de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, la neoactividad es neoactividad de 2HG y se reduce el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG.

El método incluye:

- proporcionar, por ejemplo, ensayando una muestra de un agente terapéutico que da como resultado una reducción del nivel de un producto neoactivo de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, un valor (por ejemplo, un valor de ensayo) para un parámetro relacionado con una propiedad del agente terapéutico, por ejemplo, la capacidad para inhibir la conversión de alfa cetoglutarato en 2 hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2 hidroxiglutarato y,
- opcionalmente, proporcionar una determinación de si el valor determinado para el parámetro cumple un criterio preseleccionado, por ejemplo, está presente o está presente en un intervalo preseleccionado, evaluando o procesando de este modo el agente terapéutico.

En una realización, el agente terapéutico está aprobado para su uso en seres humanos por una agencia gubernamental, por ejemplo, la FDA.

En una realización, el parámetro está correlacionado con la capacidad para inhibir la neoactividad de 2HG y, por ejemplo, el agente terapéutico es un inhibidor que se une a una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante y reduce una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

- 5 En una realización, el parámetro está correlacionado con el nivel de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} y, por ejemplo, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de una proteína mutante.

10 En una realización, el parámetro está correlacionado con el nivel de un ARN que codifica un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} y, por ejemplo, el agente terapéutico reduce el nivel de ARN, por ejemplo, ARNm que codifica la proteína mutante.

En una realización, el método incluye poner en contacto el agente terapéutico con una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante (o el ARN correspondiente).

15 En una realización, el método incluye proporcionar una comparación del valor determinado para un parámetro con un valor o valores de referencia, para evaluar de este modo el agente terapéutico. En una realización, la comparación incluye determinar si un valor de ensayo determinado para el agente terapéutico tiene una relación preseleccionada con el valor de referencia, por ejemplo, determinando si cumple el valor de referencia. No es necesario que el valor sea un valor numérico, sino que, por ejemplo, puede ser simplemente una indicación de si está presente una actividad.

20 En una realización, el método incluye determinar si un valor de ensayo es igual o mayor que un valor de referencia, si es menor o igual que un valor de referencia o si se encuentra dentro de un intervalo (incluyendo o excluyendo uno o ambos extremos). En una realización, puede almacenarse en un dispositivo de memoria el valor del ensayo o una indicación de si se cumple el criterio preseleccionado, por ejemplo, en un registro legible por ordenador.

25 En una realización, se toma una decisión o etapa, por ejemplo, una muestra que contiene el agente terapéutico o un lote del agente terapéutico, se clasifica, selecciona, acepta o descarta, libera o retiene, procesa en un producto farmacológico, envía, mueve a una ubicación diferente, formula, etiqueta, envasa, se pone en contacto con o se pone en un recipiente, por ejemplo, un recipiente hermético para gases o líquidos, se libera comercialmente o se vende u ofrece comercialmente o se redacta o altera un informe para reflejar la determinación, dependiendo de si se cumple o no el criterio preseleccionado. *Por ejemplo*, basándose en el resultado de la determinación o de si está presente o no una actividad o tras la comparación con un patrón de referencia, puede procesarse el lote del que se toma la muestra, por ejemplo, como se acaba de describir.

30 La evaluación de la presencia o el nivel de actividad puede mostrar si el agente terapéutico cumple con un patrón de referencia.

35 En una realización, los métodos y composiciones divulgados en el presente documento son útiles desde el punto de vista de un proceso, por ejemplo, para monitorizar o garantizar la consistencia o la calidad entre lotes o para evaluar una muestra con respecto a un patrón, por ejemplo, un valor preseleccionado.

40 En una realización, el método puede usarse para determinar si puede esperarse que un lote de ensayo de un agente terapéutico tenga una o más de las propiedades. Dichas propiedades pueden incluir una propiedad listada en el prospecto de un agente terapéutico, una propiedad que aparece en un compendio, por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos o una propiedad requerida por una agencia reguladora, por ejemplo, la FDA, para uso comercial.

45 En una realización, el método incluye evaluar el efecto del agente terapéutico en la actividad de tipo silvestre de la proteína IDH1 y proporcionar una determinación de si el valor determinado cumple o no con un criterio predeterminado, por ejemplo, está presente o está presente en un intervalo preseleccionado.

50 En una realización, el método incluye:

55 poner en contacto un agente terapéutico que es un inhibidor de una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG, con un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, determinando un valor relacionado con la inhibición de una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG y

60 comparar el valor determinado con un valor de referencia, por ejemplo, un intervalo de valores, para la inhibición de una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización, el valor de referencia es un valor de referencia requerido por la FDA, por ejemplo, un criterio de liberación.

65 En una realización, el método incluye:

poner en contacto un agente terapéutico con un ARNm que codifica una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante y determinar un valor relacionado con la inhibición del ARNm y, comparar el valor determinado con un valor de referencia, por ejemplo, un intervalo de valores para la inhibición del ARNm. En una realización, el valor de referencia es un valor de referencia requerido por la FDA, por ejemplo,

un criterio de liberación.

En un aspecto, la invención presenta un método para evaluar una muestra de un agente terapéutico citado en el presente documento, que incluye recibir datos con respecto a una actividad del agente terapéutico; proporcionar un registro que incluye dichos datos y opcionalmente, incluye un identificador para un lote de agente terapéutico; remitir dicho registro a un tercero a cargo de la toma de decisiones, por ejemplo, una agencia gubernamental, por ejemplo, la FDA; opcionalmente, recibir una comunicación de un tercero a cargo de la toma de decisiones; opcionalmente, decidir si se libera comercialmente el lote de agente terapéutico basándose en la comunicación del tercero a cargo de la toma de decisiones. En una realización, el método incluye además liberar o de otro procesar, por ejemplo, como se describe en el presente documento, la muestra.

En otro aspecto, se divulga un método para seleccionar una clase de pago para el tratamiento con un agente terapéutico descrito en el presente documento, por ejemplo, un inhibidor de la neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, para un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular. El método incluye:

proporcionar (*por ejemplo*, recibir) una evaluación de si el sujeto es positivo para un genotipo o fenotipo de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante; y llevar a cabo al menos uno de (1) si el sujeto es positivo, seleccionar una primera clase de pago y (2) si el sujeto no es positivo, seleccionar una segunda clase de pago.

En una realización, la selección se almacena en un dispositivo de memoria, por ejemplo, en un sistema de registros médicos.

En una realización, el método incluye la evaluación de si el sujeto es positivo para niveles no deseados de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, neoactividad de 2HG.

En una realización, el método incluye la evaluación de si el sujeto es positivo para una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}.

En una realización, el método incluye solicitar la evaluación.

En una realización, la evaluación se lleva a cabo en el sujeto mediante un método descrito en el presente documento.

En una realización, el método comprende comunicar la selección a un tercero, por ejemplo, mediante un ordenador, disco compacto, teléfono, facsímil, correo electrónico o carta.

En una realización, el método comprende efectuar o autorizar un pago para dicho tratamiento.

En una realización, el pago es de una primera parte a una segunda parte. En algunas realizaciones, la primera parte es distinta del sujeto. En algunas realizaciones, la primera parte se selecciona entre un tercero pagador, una compañía aseguradora, empleador, plan de salud patrocinado por el empleador, HMO u entidad gubernamental. En algunas realizaciones, la segunda parte se selecciona entre el sujeto, un proveedor de servicios sanitarios, un médico a cargo del tratamiento, un HMO, un hospital, una entidad gubernamental o una entidad que vende o suministra el fármaco. En algunas realizaciones, la primera parte es una compañía aseguradora y la segunda parte se selecciona entre el sujeto, un proveedor de servicios sanitarios, un médico a cargo del tratamiento, un HMO, un hospital, una entidad gubernamental o una entidad que vende o suministra el fármaco. En algunas realizaciones, la primera parte es una entidad gubernamental y la segunda parte se selecciona entre el sujeto, un proveedor de servicios sanitarios, un médico a cargo del tratamiento, un HMO, un hospital, una compañía aseguradora o una entidad que vende o suministra el fármaco.

Como se usa en el presente documento, un trastorno relacionado con la proliferación celular es un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada o por una predisposición a una proliferación celular no deseada (en ocasiones citada como trastorno precanceroso). Los ejemplos de trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada incluyen cánceres, por ejemplo, tumores del SNC, por ejemplo, un glioma. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. Otros ejemplos incluyen cánceres hematológicos, por ejemplo, una leucemia, por ejemplo, AML (por ejemplo, una forma de adulto o pediátrica) o ALL, por ejemplo, B-ALL o T-ALL (*por ejemplo*, una forma de adulto o pediátrica), cáncer de próstata localizado o metastásico, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, cáncer de colon; fibrosarcoma, paraganglioma, mieloma, cáncer de tiroides, sarcoma, osteosarcoma o neoplasias mieloproliferativas (por ejemplo, CML). Los ejemplos de trastornos caracterizados por una predisposición a una proliferación celular no deseada incluyen mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, que son una colección diversa de afecciones hematológicas marcadas por una producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y en riesgo de transformarse en AML.

Como se usa en el presente documento, inhibe específicamente una neoactividad (y expresiones similares), significa que se inhibe la neoactividad de la enzima mutante en un grado significativamente mayor que la actividad de la enzima de tipo silvestre. A modo de ejemplo, "inhibe específicamente la neoactividad de 2HG" significa que se inhibe la neoactividad de 2HG en un grado significativamente mayor que la reacción directa (la conversión de isocitrato a alfa cetoglutarato) de la actividad de IDH1 de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la neoactividad se inhibe al menos 2, 5, 10 o 100 veces más que la actividad de tipo silvestre. En algunas realizaciones, un inhibidor que es específico para la neoactividad de 2HG de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, también inhibirá otra deshidrogenasa, por ejemplo, malato deshidrogenasa. En otras realizaciones, el inhibidor específico no inhibe a otras deshidrogenasas, por ejemplo, malato deshidrogenasa.

Como se usa en el presente documento, un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un cáncer, caracterizado por una mutación o alelo, significa un trastorno relacionado con la proliferación celular que tiene un número sustancial de células que portan dicha mutación o alelo. En una realización, al menos un 10, 25, 50, 75, 90, 95 o 99 % de las células del trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, las células de un cáncer o una muestra representativa, promedio o típica de células cancerosas, por ejemplo, de un tumor o de células sanguíneas afectadas, portan al menos una copia de la mutación o el alelo. En una realización, la mutación o el alelo está presente en forma de un heterocigoto a las frecuencias indicadas.

Como se usa en el presente documento, un "SNP" es una variación de secuencia de ADN que se produce cuando un solo nucleótido (A, T, C o G) en el genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre miembros de una especie (o entre cromosomas emparejados en un individuo).

Como se usa en el presente documento, un sujeto puede ser un sujeto humano o no humano. Los sujetos no humanos incluyen primates no humanos, roedores, por ejemplo, ratones o ratas u otros animales no humanos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa la verificación de secuencia de ADN de pET41a-IDH1 y un alineamiento frente al CDS de IDH1 publicado. La secuencia de IDH1 (CDS) corresponde a la SEQ ID NO: 5. La secuencia de pET41a-IDH1 corresponde a la SEQ ID NO: 6 y la secuencia "consenso" corresponde a la SEQ ID NO: 7.

La FIG. 2 representa la secuencia de aminoácidos de IDH1 (SEQ ID NO: 8) descrita en el n.º de referencia de GenBank NP_005887.2 (GI n.º 28178825) (registro con fecha del 10 de mayo de 2009).

La FIG. 2A es la secuencia de ADNc de IDH1 presentada en el n.º de referencia de GenBank NM_005896.2 (registro con fecha del 10 de mayo de 2009; GI n.º 28178824) (SEQ ID NO: 9).

La FIG. 2B representa la secuencia de ARNm de IDH1 descrita en el n.º de referencia de GenBank NM_005896.2 (registro con fecha del 10 de mayo de 2009; GI n.º 28178824) (SEQ ID NO: 10).

La FIG. 3 es una gráfica que representa la oxidación de NADPH por IDH1-G97D en presencia de alfa-cetoglutarato. Las FIG. 4A y 4B son gráficas que representan las constantes de Michaelis de alfa-cetoglutarato y NADPH para IDH1-G97D.

Las FIG. 5A y 5B son los resultados de un análisis de LC-EM/EM, que indican que IDH1-G97D redujo el alfa-cetoglutarato en ácido 2-hidroxiglutarico en presencia de carbonato y en ausencia de carbonato. No se produjo isocitrato por la enzima mutante, según se determinó mediante análisis de CL-EM/EM.

La FIG. 6 es un diagrama de barras que representa los niveles de 2-HG en las líneas celulares HCT-15, HCT116 y DLD-1.

La FIG. 7 es un diagrama de barras que representa las concentraciones de metabolitos de TCA (ácido tricarbóxico) (ng/ml) en las líneas celulares HCT-15, DLD-1 y HCT116.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que las mutaciones en el resto 97 de IDH1, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, pueden tener una ganancia de función, citada en el presente documento como una neoactividad, que puede usarse como diana en el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un trastorno proliferativo, tal como cáncer. En el presente documento se describen métodos y composiciones para el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, un trastorno proliferativo, tal como cáncer. Los métodos incluyen, por ejemplo, tratar a un sujeto que tiene un glioma o un tumor cerebral caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} preseleccionada, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IDH1. El inhibidor a base de ácido nucleico es, por ejemplo, un ARNbc, por ejemplo, un ARNbc que comprende las secuencias primarias de la hebra sentido y las hebras antisentido de las tablas 1-7. El ARNbc está formado por dos hebras separadas o una sola hebra plegada para formar una estructura de horquilla (*por ejemplo*, un ARN en horquilla corta (ARNhc)). En algunas realizaciones, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido, tal como uno antisentido que tiene una secuencia que se solapa o que incluye, una secuencia antisentido proporcionada en las tablas 1-7.

Neoactividad de una enzima

Neoactividad, como se usa en el presente documento, significa una neoactividad de alfa hidroxilo en un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D (o IDH2-137^{neo}), que surge como resultado de una mutación, por ejemplo, una mutación puntual, por ejemplo, una sustitución, en el resto 97 de IDH1 (o en el caso de IDH2-137^{neo}, en el resto 137 de IDH2). En una realización, la neoactividad está sustancialmente en la enzima de tipo silvestre o no mutante. En ocasiones, esto se cita en el presente documento como una neoactividad de primer grado. Un ejemplo de una neoactividad de primer grado es una "ganancia de función", en donde la enzima mutante gana una nueva actividad catalítica. En una realización, la neoactividad está presente en una enzima de tipo silvestre o no mutante, pero a un nivel que es menor de un 10, 5, 1, 0,1, 0,01 o 0,001 % del que se observa en la enzima mutante. En ocasiones, esto se cita en el presente documento como una neoactividad de segundo grado. Un ejemplo de una neoactividad de segundo grado es una "ganancia de función", en donde la enzima mutante tiene un aumento, por ejemplo, un aumento de 5 veces en la velocidad de una actividad catalítica poseída por la enzima cuando carece de la mutación.

En algunas realizaciones, una forma no mutante de la enzima, por ejemplo, una forma de tipo silvestre, convierte la sustancia A (*por ejemplo*, isocitrato) en la sustancia B (*por ejemplo*, α -cetoglutarato) y la neoactividad convierte la sustancia B (*por ejemplo*, α -cetoglutarato) en la sustancia C, en ocasiones citada como el producto de neoactividad (*por ejemplo*, 2-hidroxisulfolactato, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato).

Isocitrato deshidrogenasas

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

La IDH1 (isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), citosólica) también se conoce como IDH; IDP; IDCD; IDPC o PICD. La proteína codificada por este gen es la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP(+) que se encuentra en el citoplasma y los peroxisomas. Contiene la secuencia de señal de direccionamiento peroxisómica PTS-1. La presencia de esta enzima en los peroxisomas sugiere papeles en la regeneración de NADPH para reducciones intraperoxisómicas, tales como la conversión de 2,4-dienoil-CoA en 3-enoil-CoA, así como en reacciones peroxisómicas que consumen 2-oxoglutarato, a saber: la alfa-hidroxisulfolactación del ácido fitánico. La enzima citoplásmica desempeña un papel importante en la producción citoplásmica de NADPH.

El gen humano de IDH1 codifica una proteína de 414 aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para IDH1 humana se pueden encontrar como las entradas NM_005896.2 y NP_005887.2 de GenBank, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para IDH1 también se describen en, *por ejemplo*, Nekrutenko *et al.*, Mol. Biol. Evol. 15:1674-1684(1998); Geisbrecht *et al.*, J. Biol. Chem. 274:30527-30533(1999); Wiemann *et al.*, Genome Res. 11:422-435(2001); The MGC Project Team, Genome Res. 14:2121-2127(2004); Lubec *et al.*, Enviado (DIC-2008) a UniProtKB; Kullmann *et al.*, Enviado (JUN-1996) a las bases de datos EMBL/GenBank/DBJ; y Sjoeblohm *et al.*, Science 314:268-274(2006).

IDH1 no mutante, *por ejemplo*, de tipo silvestre, cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α -cetoglutarato, reduciendo de este modo el NAD+ (NADP+) en NADP (NADPH), *por ejemplo*, en la reacción directa:



En algunas realizaciones, un mutante de IDH1-97^{neo}, *por ejemplo*, IDH1-G97D, puede tener la capacidad de convertir el α -cetoglutarato en 2-hidroxisulfolactato, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato:
 $\alpha\text{-KG} + \text{NADH} (\text{NADPH}) + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{-hidroxisulfolactato}$, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato + NAD⁺ (NADP⁺).

En algunas realizaciones, la neoactividad puede ser la reducción del piruvato o malato en los compuestos de α -hidroxi correspondientes.

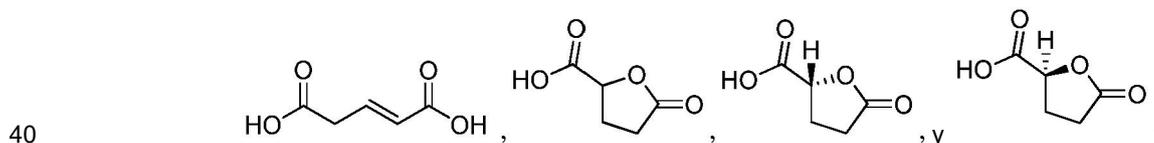
En algunas realizaciones, un mutante de IDH1-97^{neo}, *por ejemplo*, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} puede dar lugar a un nivel aumentado de 2-hidroxisulfolactato, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato en un sujeto. La acumulación de 2-hidroxisulfolactato, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato en un sujeto, *por ejemplo*, en el cerebro de un sujeto, puede ser dañina. *Por ejemplo*, en algunas realizaciones, los niveles elevados de 2-hidroxisulfolactato, *por ejemplo*, R-2-hidroxisulfolactato pueden dar lugar a y/o ser predictivos de un cáncer en un sujeto, tal como un cáncer del sistema nervioso central, *por ejemplo*, tumor cerebral, *por ejemplo*, glioma, *por ejemplo*, glioblastoma multiforme (GBM). *Por consiguiente*, en algunas realizaciones, un método descrito en el presente documento incluye administrar a un sujeto un inhibidor de la neoactividad.

Detección de 2-hidroxi-glutarato

El 2-hidroxi-glutarato puede detectarse, por ejemplo, mediante CL/EM. Para detectar el 2-hidroxi-glutarato secretado en el medio de cultivo, pueden recogerse alícuotas de 500 µl de medio condicionado, mezclarse a 80:20 con metanol y centrifugarse a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4 grados centígrados. El sobrenadante resultante puede recogerse y almacenarse a -80 grados centígrados antes de la CLEM/EM para evaluar los niveles de 2-hidroxi-glutarato. Para medir los metabolitos asociados con células completas, pueden aspirarse los medios y recogerse las células, por ejemplo, a una densidad no de confluencia. Se puede utilizar una variedad de diferentes métodos de separación por cromatografía líquida (CL). Cada método puede acoplarse a ionización por electropulverización negativa (IEN, -3,0 kV) a espectrómetros de masas de triple-cuadrupolo que funcionan en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), con parámetros de EM optimizados en soluciones patrón de metabolitos infundidos. Los metabolitos pueden separarse mediante cromatografía en fase reversa usando tributilamina 10 mM como agente de emparejamiento de iones en la fase móvil acuosa, de acuerdo con una variante de un método anteriormente publicado (Luo *et al.* J Chromatogr A 1147, 153-64, 2007). Un método permite la resolución de los metabolitos de TCA: t = 0, B al 50 %; t = 5, B al 95 %; t = 7, B al 95 %; t = 8, B al 0 %, donde B se refiere a una fase móvil orgánica de metanol al 100%. Otro método es específico para 2-hidroxi-glutarato, que ejecuta un gradiente lineal rápido de B al 50 % -95 % (tampones como se definió anteriormente) durante 5 minutos. Como columna, puede usarse una Synergi Hydro-RP, 100 mm x 2 mm, tamaño de partícula de 2,1 µm (Phenomenex), como se ha descrito anteriormente. Los metabolitos se pueden cuantificar mediante la comparación de áreas de picos con patrones de metabolitos puros a concentraciones conocidas. Los estudios de flujo de metabolitos de ¹³C-glutamina se pueden realizar como se describe, por ejemplo, en Munger *et al.* Nat Biotechnol 26, 1179-86, 2008.

En una realización, se evalúa 2HG, por ejemplo, R-2HG y el analito en el que se basa la determinación es 2HG, por ejemplo, R-2HG. En una realización, el analito en el que se basa la determinación es un derivado de 2HG, por ejemplo, R-2HG, formado en el proceso de llevar a cabo el método analítico. A modo de ejemplo, dicho derivado puede ser un derivado formado en el análisis de EM. Los derivados pueden incluir un aducto de sal, por ejemplo, un aducto de Na, una variante de hidratación o una variante de hidratación que también es un aducto de sal, por ejemplo, un aducto de Na, por ejemplo, formado en el análisis de EM. En una realización, puede ensayarse indirectamente un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. En un ensayo indirecto, el analito es un derivado metabólico de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG u otros compuestos diferentes, por ejemplo, un compuesto celular, que está correlacionado con el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Los ejemplos incluyen especies que se acumulan o están elevadas o reducidas, como resultado de la presencia de 2HG, por ejemplo, R-2HG. *Por ejemplo*, en realizaciones, las células cancerosas con el mutante neoactivo tienen niveles elevados de glutarato o glutamato que estará correlacionado con 2HG, por ejemplo, R-2HG.

Los derivados de 2HG ejemplares incluyen derivados deshidratados tales como los compuestos proporcionados a continuación o un aducto de sal de los mismos:

Métodos para evaluar muestras y/o sujetos

Esta sección proporciona métodos para obtener y analizar muestras y para analizar sujetos.

Las realizaciones del método comprenden la evaluación de uno o más parámetros relacionados con la neoactividad de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, neoactividad de 2HG, por ejemplo, para evaluar el genotipo o fenotipo de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La evaluación puede realizarse, por ejemplo, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar al sujeto, para seleccionar un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor o para evaluar la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad. En una realización, la evaluación, que puede llevarse a cabo antes y/o después de que el tratamiento haya comenzado, se basa, al menos en parte, en el análisis de una muestra tumoral, una muestra de células cancerosas o una muestra de células precancerosas, del sujeto. *Por ejemplo*, puede analizarse en una muestra del paciente la presencia o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, evaluando un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Un producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en la muestra puede determinarse mediante un método cromatográfico, por ejemplo, mediante análisis de CL-EM. También puede determinarse mediante contacto con un agente de unión específico, por ejemplo, un anticuerpo, que se une al producto de neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG y posibilita la detección. En una realización, se analiza el nivel de neoactividad en la muestra, por ejemplo, una neoactividad de alfa hidroxil, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización, se analiza en la muestra la presencia de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante que tiene, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente). En una

realización, se secuencian un ácido nucleico de la muestra (por ejemplo, interrogación directa o mediante análisis de SNP) para determinar si está presente una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el análisis es distinto de determinar directamente la presencia de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, (o el ARN correspondiente) o secuenciar un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, un gen mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En una realización, el análisis es distinto de una determinación directa, por ejemplo, es distinto de la secuenciación de ADN genómico o de ADNc, la presencia de una mutación en el resto de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. EN una realización, el análisis comprende determinar directamente, por ejemplo, mediante secuenciación, por ejemplo, secuenciación de ADN genómico o ADNc, la presencia de una mutación en el resto de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. *Por ejemplo*, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o la medición de una neoactividad de alfa hidroxilado de la mutación, por ejemplo, neoactividad de 2HG. En una realización, se extrae la muestra del paciente y se analiza. En una realización, la evaluación puede incluir uno o más de llevar a cabo el análisis de la muestra, solicitar el análisis de la muestra, solicitar los resultados del análisis de la muestra o recibir los resultados del análisis de la muestra. En general en el presente documento, la determinación, el análisis o la evaluación pueden incluir uno o ambos de llevar a cabo el método subyacente o recibir datos de otro que hay llevado a cabo el método subyacente.

En una realización, la evaluación, que puede llevarse a cabo antes y/o después de que el tratamiento haya comenzado, se basa, al menos en parte, en el análisis de un tejido (por ejemplo, un tejido distinto de una muestra de tumor) o un fluido corporal o un producto corporal. Los tejidos ejemplares incluyen ganglio linfático, piel, folículos pilosos y uñas. Los fluidos corporales ejemplares incluyen sangre, plasma, orina, linfa, lágrimas, sudor, saliva, semen y fluido cefalorraquídeo. Los productos corporales ejemplares incluyen aliento exhalado. *Por ejemplo*, el tejido, fluido o producto puede analizarse respecto de la presencia o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, evaluando un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG. Un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en la muestra puede determinarse mediante un método cromatográfico, por ejemplo, mediante análisis de CL-EM. También puede determinarse mediante contacto con un agente de unión específico, por ejemplo, un anticuerpo, que se une al producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG y posibilita la detección. En realizaciones donde hay presencia de niveles suficientes, el tejido, fluido o producto pueden analizarse respecto del nivel de neoactividad, por ejemplo, una neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, la neoactividad de 2HG. En una realización, se analiza en la muestra la presencia de una proteína IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante que tiene, por ejemplo, neoactividad de 2HG (o un ARN correspondiente). En una realización, se secuencian un ácido nucleico de la muestra para determinar si una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, está presente. En una realización, el análisis es distinto de determinar directamente la presencia de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una proteína IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} (o el ARN correspondiente) o la secuenciación de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. *Por ejemplo*, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o la medición de la neoactividad de 2HG. En una realización, el tejido, fluido o producto se extrae del paciente y se analiza. En una realización, la evaluación puede incluir uno o más de llevar a cabo el análisis del tejido, fluido o producto, solicitar el análisis del tejido, fluido o producto, solicitar los resultados del análisis del tejido, fluido o producto o recibir los resultados del análisis del tejido, fluido o producto.

En una realización, la evaluación, que puede llevarse a cabo antes y/o después de que el tratamiento haya comenzado, se basa, al menos en parte, en la obtención de imágenes de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, del sujeto. En algunas realizaciones, se usan métodos de resonancia magnética para evaluar la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG, en el sujeto. En una realización, se somete al sujeto a análisis de obtención de imágenes y/o espectroscópico, por ejemplo, análisis basado en resonancia magnética, por ejemplo, análisis por IRM y/o ERM *por ejemplo*, y opcionalmente, se forma una imagen correspondiente a la presencia, la distribución o el nivel de un producto de neoactividad de alfa hidroxilado, por ejemplo, 2HG, por ejemplo, R-2HG o del tumor. Opcionalmente, se almacena la imagen o un valor relacionado con la imagen en un medio tangible y/o se transmite a un segundo sitio. En una realización, la evaluación puede incluir uno o más de llevar a cabo el análisis por imagen, solicitar el análisis por imagen, solicitar los resultados del análisis por imagen o recibir los resultados del análisis por imagen.

55 Métodos para tratar un trastorno proliferativo

En el presente documento se describen métodos de tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, un cáncer, por ejemplo, un glioma, por ejemplo, inhibiendo una neoactividad de la enzima mutante. En algunas realizaciones, la ganancia de función es la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato.

Compuestos para el tratamiento del cáncer

65 Los compuestos divulgados en el presente documento para el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, por ejemplo, cáncer, incluyen: moduladores, por ejemplo, inhibidores, de una enzima neoactiva;

compuestos o profármacos de los mismos, que son análogos estructurales de un producto de neoactividad; agentes antiglicolíticos; antioxidantes; y agentes terapéuticos a base de ácido nucleico.

Moduladores de una neoactividad

5 Puede evaluarse un compuesto candidato respecto de la modulación (por ejemplo, inhibición) de la neoactividad de un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, usando un ensayo descrito en el presente documento. También puede evaluarse un compuesto candidato respecto de la modulación (por ejemplo, inhibición) de la actividad de tipo silvestre o no mutante. Por ejemplo, puede evaluarse la formación de un producto o subproducto de cualquier actividad (por ejemplo, actividad enzimática), evaluando de este modo un compuesto candidato. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, tipo silvestre/no mutante o neoactividad) puede evaluarse midiendo una o más lecturas de un ensayo enzimático. Por ejemplo, puede medirse el cambio en la naturaleza y/o cantidad de sustrato y/o producto, por ejemplo, usando métodos tales como sustratos fluorescentes o radiomarcados. Los sustratos y/o productos ejemplares incluyen α -cetoglutarato, CO₂, NADP, NADPH, NAD, NADH y 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato. En algunas realizaciones, también puede evaluarse la velocidad de reacción de la enzima, así como la naturaleza y/o cantidad de un producto de la reacción enzimática. Además de la medición de las potenciales actividades enzimáticas, puede detectarse la actividad (por ejemplo, de tipo silvestre/no mutante o neoactividad) mediante la inactivación de la fluorescencia de la proteína tras la unión de un potencial sustrato, cofactor o modulador de la actividad enzimática para la enzima.

20 En una realización, puede monitorizarse el progreso del ensayo mediante cambios en la DO340 o la fluorescencia del cofactor de NAD o NADP. En otra realización, puede acoplarse el progreso de la reacción con un sistema de ensayo enzimático secundario en modo continuo o en modo de punto final para aumentar el intervalo dinámico del ensayo. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo de punto final añadiendo a la reacción un exceso de diaforasa y rezasarina. La diaforasa consume el NADPH o NADH restante a la vez que produce resorufina a partir de rezasarina. La resorufina es un producto altamente fluorescente que puede medirse mediante fluorescencia a Ex544 Em590. Esto no solo termina la reacción, sino que también genera una señal fácilmente detectable con mayor rendimiento cuántico que la fluorescencia del cofactor.

30 Puede implementarse un ensayo continuo mediante el acoplamiento de un producto de la reacción primaria a una reacción enzimática secundaria que proporciona resultados detectables con mayor intervalo dinámico o un modo de detección más conveniente. Por ejemplo, la inclusión en la mezcla de reacción de aldehído deshidrogenasa (ALDH), que es una enzima dependiente de NADP⁺, y de 6-metoxi-2-naftaldehído, un sustrato cromogénico para la ALDH, dará como resultado la producción del producto fluorescente, 6-metoxi-2-naftoato (Ex310, Em 360) a una velocidad dependiente de la producción de NADP⁺ por isocitrato deshidrogenasa. La inclusión de una enzima de acoplamiento, tal como aldehído deshidrogenasa, tiene el beneficio adicional de permitir la detección sistemática de la neoactividad, independientemente de si se produce o no NADP⁺ o NAD⁺, ya que esta enzima es capaz de utilizar ambos. Además, debido a que se genera el cofactor de NADPH o NADH necesario para el ensayo "inverso", un sistema enzimático acoplado que cicla el cofactor de vuelta a la enzima IDH tiene la ventaja adicional de permitir que se lleven a cabo ensayos continuos a concentraciones de cofactor muy por debajo de la Km con el fin de potenciar la detección de inhibidores competitivos de la unión al cofactor.

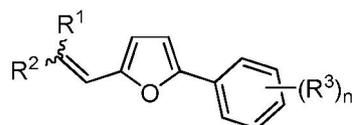
45 En una tercera realización de una detección sistemática de la actividad (por ejemplo, una de tipo silvestre/no mutante o neoactividad), puede marcarse isotópicamente uno o una serie de sustratos de IDH1, cofactores o productos con elementos radiactivos o "pesados" en átomos definidos a fin de seguir sustratos específicos o átomos de los sustratos a lo largo de la reacción química. Por ejemplo, el carbono alfa del α -KG, isocitrato o 2-hidroxiglutarato, por ejemplo, R-2-hidroxiglutarato puede ser ¹⁴C o ¹³C. Puede analizarse la cantidad, la tasa, la identidad y la estructura de los productos formados por medios conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, espectroscopía de masas o HPLC radiométrica.

50 Los compuestos que inhiben una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en el presente documento, pueden incluir, por ejemplo, molécula pequeña, ácido nucleico, proteína y anticuerpo.

55 Las moléculas pequeñas ejemplares incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas que se unen a enzimas y reducen su actividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en el presente documento. La unión de un inhibidor puede detener la entrada de un sustrato en el sitio activo de la enzima y/o impedir que la enzima catalice su reacción. La unión del inhibidor es reversible o irreversible. Los inhibidores irreversibles normalmente reaccionan con la enzima y la cambian químicamente. Estos inhibidores pueden modificar restos de aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática. Por el contrario, los inhibidores reversibles se unen de manera no covalente y se producen diferentes tipos de inhibición, dependiendo de si estos inhibidores se unen a la enzima, al complejo de enzima-sustrato o a ambos. En algunas realizaciones, la molécula pequeña es oxalomalato, oxalofumarato u oxalosuccinato.

60 En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un inhibidor seleccionado para la neoactividad (por ejemplo, en relación con la actividad de tipo silvestre). Los compuestos de molécula pequeña ejemplares que inhiben la neoactividad incluyen aquellos de fórmula (XX) a continuación:

65



fórmula (XX)

en donde

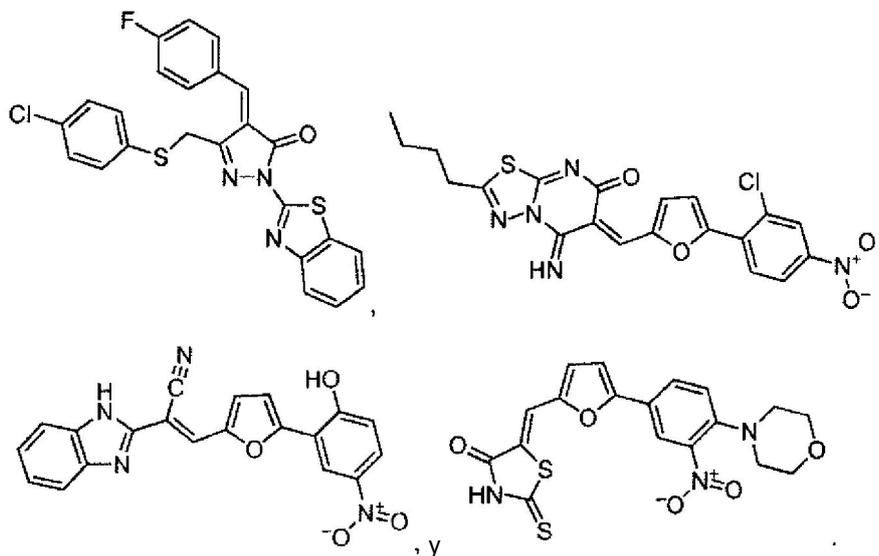
- 5
 R¹ es H, alquilo C₁-C₆ o ciano;
 R² es arilo, heteroarilo o heterociclilo; opcionalmente sustituido con 1-3 R⁴;
 o R¹ y R², tomados junto con el carbono al que están unidos, forman un heteroarilo o heterociclilo;
 cada R³ es independientemente alquilo C₁-C₆, heterociclilo, hidroxilo, alcoxi, nitro, ciano, amino, amido, halo o
 10 haloalquilo; cada R⁴ es independientemente alquilo C₁-C₆, hidroxilo, alcoxi, nitro, ciano, amino, amido, halo o
 haloalquilo opcionalmente sustituido con 1-3 R⁴;
 n es 2.

En algunas realizaciones, R¹ es ciano.

- 15
 En algunas realizaciones, R¹ y R², tomados junto con el carbono al que están unidos, forman un heteroarilo o
 heterociclilo. En algunas realizaciones, R¹ y R², tomados junto con el carbono al que están unidos, forman un
 heteroarilo o heterociclilo monocíclico. En algunas realizaciones, R¹ y R², tomados junto con el carbono al que están
 20 unidos, forman un heteroarilo o heterociclilo bicíclico. En algunas realizaciones, el heteroarilo o heterociclilo se
 sustituye con al menos 1 R⁴ (por ejemplo, alquilo C₁-C₆).

En algunas realizaciones, al menos un R³ es nitro. En algunas realizaciones, al menos un R³ es un nitro meta. En
 algunas realizaciones, el segundo R³ es halo, hidroxilo o heterociclilo.

- 25 A continuación se proporcionan inhibidores ejemplares de la neoactividad:



- 30 Pueden usarse ácidos nucleicos para inhibir una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en el presente
 documento, por ejemplo, reduciendo la expresión de la enzima. Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen, por ejemplo,
 ARNpi, ARNhc, ARN antisentido, aptámero y ribozima. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para
 35 seleccionar moléculas inhibitoras, por ejemplo, moléculas de ARNpi, para una secuencia génica particular.

- También pueden usarse proteínas para inhibir una neoactividad, por ejemplo, una neoactividad descrita en el presente
 documento, mediante unión directa o indirecta a la enzima y/o al sustrato o compitiendo por la unión a la enzima y/o
 al sustrato. Las proteínas ejemplares incluyen, por ejemplo, receptores solubles, péptidos y anticuerpos. Los
 anticuerpos ejemplares incluyen, por ejemplo, un anticuerpo completo o un fragmento del mismo que conserva su
 40 capacidad para unirse a la enzima o al sustrato.

Los compuestos candidatos ejemplares, que pueden evaluarse respecto de la inhibición de una neoactividad de una
 mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, se describen en las siguientes
 referencias:

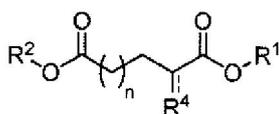
- 45 Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008), 16(7), 3580-3586; Free Radical Biology & Medicine (2007), 42(1), 44-51; KR

2005036293 A; Applied and Environmental Microbiology (2005), 71(9), 5465-5475; KR 2002095553 A; Solicitud de Patente de los Estados Unidos US 2004067234 A1; Solicitud Internacional PCT (2002), WO 2002033063 A1; Journal of Organic Chemistry (1996), 61(14), 4527-4531; Biochimica et Biophysica Acta, Enzymology (1976), 452(2), 302-9; Journal of Biological Chemistry (1975), 250(16), 6351-4; Bollettino - Societa Italiana di Biologia Sperimentale (1972), 48(23), 1031-5; Journal of Biological Chemistry (1969), 244(20), 5709-12.

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

Un análogo estructural celular ejemplar de un producto de neoactividad es el alfa-cetoglutarato. Por lo tanto, se describe un método para tratar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por proliferación celular no deseada, por ejemplo, cáncer, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de α -cetoglutarato (por ejemplo, altos niveles en comparación con las condiciones metabólicas normales), un profármaco de α -cetoglutarato o un compuesto que aumenta el nivel de α -cetoglutarato en el sujeto.

Los análogos estructurales ejemplares incluyen aquellos de la fórmula a continuación: En una realización, el análogo estructural celular de un producto neoactivo o un profármaco del mismo, es un compuesto de la fórmula a continuación:



en donde

R1 y R2 son como se describen a continuación;

==== es un enlace sencillo o doble; y

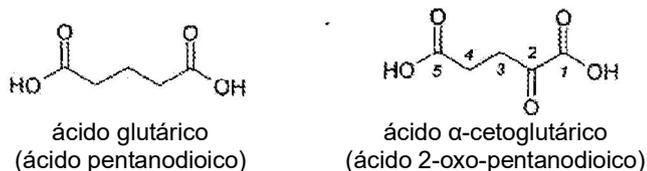
R4 es O, cuando ===== es un doble enlace o se selecciona entre -OH, -O-(resto hidrófobo), -NH y -N-(resto hidrófobo) cuando ===== es un enlace sencillo.

El cáncer puede ser uno descrito en el presente documento. En la fórmula (I) a continuación se proporciona una representación estructural del alfa-cetoglutarato y de profármacos de alfa-cetoglutarato relacionados ejemplares.

En algunas realizaciones, ciertos compuestos (citados en el presente documento como "compuestos de α -cetoglutarato" o " α -cetoglutaratos" o "ésteres de α -cetoglutarato"), pueden administrarse a un sujeto para tratar un cáncer descrito en el presente documento. Estos compuestos pueden describirse como α -cetoglutaratos que portan (por ejemplo, conjugados a, acoplados a) un resto hidrófobo. Los compuestos ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento WO2006016143.

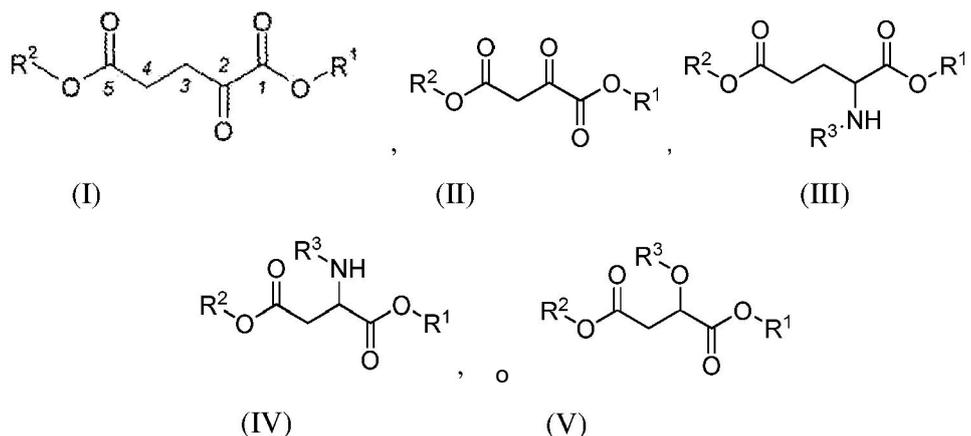
Por ejemplo, estos compuestos pueden describirse como ésteres de α -cetoglutarato (es decir, ésteres del ácido α -cetoglutarico) que tienen un resto hidrófobo que es o forma parte de, un grupo éster (es decir, -C(=O)OR) formado a partir de uno de los grupos ácidos del ácido α -cetoglutarico.

Como referencia, los grupos precursores relacionados, el ácido glutámico y el ácido α -cetoglutarico se muestran a continuación.



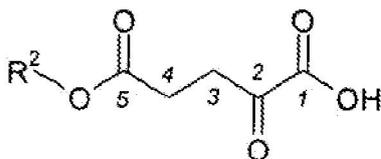
También pueden usarse otros análogos estructurales del alfa cetoglutarato para el tratamiento de un trastorno proliferativo descrito en el presente documento, tal como cáncer. Se proporcionan análogos estructurales y profármacos de los mismos ejemplares adicionales en los compuestos de las fórmulas (II), (III), (IV) y (V) a continuación.

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

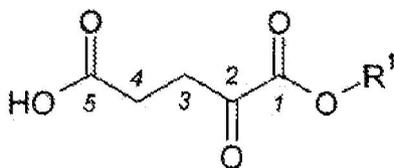


en donde

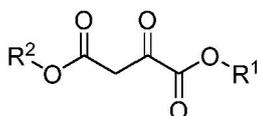
- 5 cada uno de R1 y R2 se selecciona independientemente entre: (i) H; y (ii) un resto hidrófobo; y R3 es H o un resto hidrófobo, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 En una realización, donde el compuesto incluye cada uno de R1, R2 y R3, al menos uno de R1, R2 y R3 no es H.
- En una realización, R1 y R2 no son ambos H.
- 15 En una realización, ni R1 ni R2 es H (es decir, diésteres).
- En una realización, ni R1 ni R2 es H; y R1 y R2 son diferentes. En una realización, ni R1 ni R2 es H; y R1 y R2 son idénticos.
- 20 En una realización, exactamente uno de R1 y R2 es H (es decir, monoésteres).
- En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (I) y R1 es H (y R2 no es H):



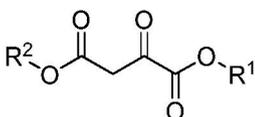
- 25 En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (I) y R2 es H (y R1 no es H):



- 30 En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (II) y R1 es H (y R2 no es H):

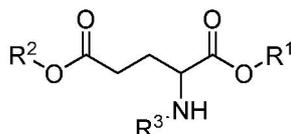


En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (II) y R2 es H (y R1 no es H):



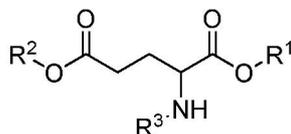
35

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y R1 es H (y R2 no es H):



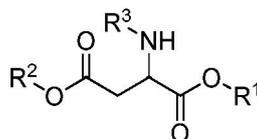
5

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (III) y R2 es H (y R1 no es H):



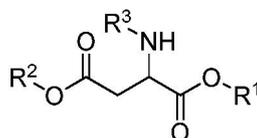
10

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV) y R1 es H (y R2 no es H):

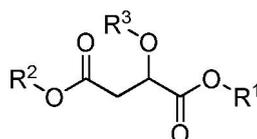


15

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV) y R2 es H (y R1 no es H):

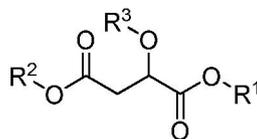


En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (V) y R1 es H (y R2 no es H):



20

En una realización, el compuesto es un compuesto de fórmula (V) y R2 es H (y R1 no es H):



25

El resto/restos hidrófobo(s)

Como se usa en el presente documento, la expresión "resto hidrófobo" incluye, pero sin limitación, restos químicos con átomos o grupos no polares que tienen tendencia a interactuar entre sí, en lugar de con agua u otros átomos o grupos polares. Los restos hidrófobos son sustancialmente insolubles o solo escasamente solubles en agua. Opcionalmente, el resto hidrófobo puede seleccionarse de acuerdo con sus propiedades fusogénicas o sus interacciones con componentes de membranas celulares, tales como lectinas y grupos de cabeza lipídicos. Por ejemplo, el resto hidrófobo puede comprender un polímero (por ejemplo, un polímero lineal o ramificado); un grupo alquilo, alqueno y/o alquino, que puede ser, por ejemplo, lineal, ramificado o cíclico (por ejemplo, alquilo C1-C30, alqueno C2-C30, alquino C2-C30, cicloalquilo C3-C30, cicloalqueno C3-C30, cicloalquino C3-C30); un grupo aromático (por ejemplo, carboarilo C6-C20, heteroarilo Cs-C20); o una combinación de los mismos.

Opcionalmente, el resto hidrófobo puede comprender uno o más de: un heteroátomo, un grupo heterocíclico, un péptido, un peptido, un producto natural, un compuesto sintético, un esteroide y un derivado de esteroide (por ejemplo, restos hidrófobos que comprenden un núcleo de esteroide, por ejemplo, un sistema de anillo de colesterol).

Se pretende que el resto hidrófobo se seleccione de tal forma que el compuesto de α-cetoglutarato sea capaz de llevar

a cabo su función prevista, por ejemplo, para atravesar membranas lipídicas en el citosol/mitocondrias.

Los ejemplos de restos hidrófobos incluyen, pero sin limitación, los derivados de: lípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, esfingolípidos, acilgliceroles, ceras, esteroides, esteroides (por ejemplo, colesterol), terpenos, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, isoprenoides, retenoides, biotina y aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, metionina, alanina, prolina y tirosina).

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: alquilo C1-C30; alqueno C2-C30; alquino C2-C30; cicloalquilo C3-C30; cicloalqueno C3-C30; cicloalquino C3-C30; carboarilo C6-C20; heteroarilo C5-C20; carboaril C6-C20-alquilo CrC7; heteroaril C5-C20-alquilo d-Cr; y está sin sustituir o sustituido. En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: alquilo C1-C30; alqueno C2-C30; alquino C2-C30; y está sin sustituir o sustituido.

En una realización, el extremo inferior del intervalo (para alquilo, alqueno, alquino) es C4. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C6. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C8. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C10. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C12.

En una realización, el extremo superior del intervalo (para alquilo, alqueno, alquino) es C30. En una realización, el extremo superior del intervalo es C24. En una realización, el extremo superior del intervalo es C22. En una realización, el extremo superior del intervalo es C20. En una realización, el extremo superior del intervalo es C18. En una realización, el extremo superior del intervalo es C16.

En una realización, el intervalo (para alquilo, alqueno, alquino) es C4-C20. En una realización, el intervalo es C6-C18. En una realización, el intervalo es C8-C16. En una realización, el intervalo es C10-C24. En una realización, el intervalo es C12-C22. En una realización, el intervalo es C14-C20. En una realización, el intervalo es C16-C18.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, es independientemente alquilo C1-C30 y está sin sustituir o sustituido.

En una realización, el extremo inferior del intervalo (para alquilo) es C4. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C6. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C8. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C10. En una realización, el extremo inferior del intervalo es C12.

En una realización, el extremo superior del intervalo (para alquilo) es C30. En una realización, el extremo superior del intervalo es C24. En una realización, el extremo superior del intervalo es C22. En una realización, el extremo superior del intervalo es C20. En una realización, el extremo superior del intervalo es C18. En una realización, el extremo superior del intervalo es C16.

En una realización, el intervalo (para alquilo) es C4-C20. En una realización, el intervalo es C6-C18. En una realización, el intervalo es C8-C16. En una realización, el intervalo es C10-C24. En una realización, el intervalo es C12-C22. En una realización, el intervalo es C14-C20. En una realización, el intervalo es C16-C18.

En una realización, el grupo alquilo es un grupo alquilo lineal o ramificado y está sin sustituir o sustituido, por ejemplo, en una realización, el resto hidrófobo es alquilo C1-C30 lineal o ramificado y está sin sustituir o sustituido.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, es independientemente $-(CH_2)_nCH_3$, en donde n es independientemente un número entero de 0 a 29.

En una realización, el extremo inferior del intervalo para n es 3. En una realización, el extremo inferior del intervalo para n es 5. En una realización, el extremo inferior del intervalo para n es 7. En una realización, el extremo inferior del intervalo para n es 9. En una realización, el extremo inferior del intervalo para n es 11.

En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 29. En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 23. En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 21. En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 19. En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 17. En una realización, el extremo superior del intervalo para n es 15. En una realización, n es independientemente un número entero de 3 a 19. En una realización, n es independientemente un número entero de 5 a 17. En una realización, n es independientemente un número entero de 7 a 15.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: carboarilo C6-C20; heteroarilo C5-C20; carboaril C6-C20-alquilo C1-C7; heteroaril C5-C20-alquilo C1-C7; y está sin sustituir o sustituido.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: carboarilo C6-C12; heteroarilo C5-C12; carboaril C6-C12-alquilo C1-C7; heteroaril C5-C12-alquilo C1-C7; y está sin sustituir o sustituido.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: carboarilo C6-C10; heteroarilo C5-C10; carboaril C6-C10-alquilo C1-C7; heteroaril C5-C10-alquilo C1-C7; y está sin sustituir o sustituido.

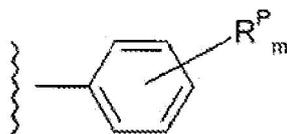
En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: carboarilo C6-C20; carboaril C6-C20-alquilo C1-C7; y está sin sustituir o sustituido. En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, se selecciona independientemente entre: carboarilo C6-C12; carboaril C6-C12-alquilo C1-C7; y está sin sustituir o sustituido.

Con respecto a la frase "sin sustituir o sustituido", cualquier sustituyente, en caso de estar presente, puede ser, en una realización, como se define a continuación para Rp.

Por ejemplo, en una realización, cara grupo carboarilo y heteroarilo, en caso de estar presente, está sin sustituir o sustituido con uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) sustituyentes seleccionados independientemente entre: halo; ciano; nitro; hidroxilo; alcoxi C1-C7; alquilo C1-C7; haloalquilo C1-C7; y alquilo C8-C30.

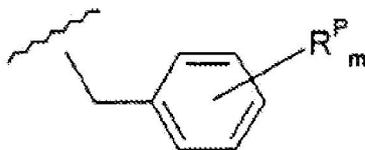
En una realización, los grupos alquilo C8-C30 anteriores son alquilo C10-C24. En una realización, los grupos alquilo C8-C30 anteriores son alquilo C12-C22. En una realización, los grupos alquilo C8-C30 anteriores son alquilo C14-C20. En una realización, los grupos alquilo C8-C30 anteriores son alquilo C16-C18.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, es independientemente un grupo fenilo opcionalmente sustituido de fórmula:



en donde m es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 y cada Rp, en caso de estar presente, es independientemente un sustituyente.

En una realización, el resto hidrófobo o cada resto hidrófobo, es independientemente un grupo bencilo opcionalmente sustituido de fórmula:



en donde m es independientemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 y cada Rp, en caso de estar presente, es independientemente un sustituyente. En una realización, m es 0, 1, 2 o 3. En una realización, m es 0, 1 o 2. En una realización, m es 0 o 1.

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

(1) ácido carboxílico; (2) éster; (3) amido o tioamido; (4) acilo; (5) halo; (6) ciano; (7) nitro; (8) hidroxilo; (9) éter; (10) tiol; (11) tioéter; (12) aciloxi; (13) carbamato; (14) amino; (15) acilamino o tioacilamino; (16) aminoacilamino o aminotioacilamino; (17) sulfonamino; (18) sulfonilo; (19) sulfonato; (20) sulfonamido; (21) aril C5-20-alquilo C1-7; (22) carboarilo C6.20 y heteroarilo C5.20; (23) heterociclilo C3-20; (24) alquilo Ci-7; alquilo C8.30; alqueno C2-7; alqueno C2-7; cicloalquilo C3-7; cicloalqueno C3.7; cicloalquino C3-7.

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

(1) -C(O)OH; (2) -C(=O)OR1, en donde R1 es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (3) -C(=O)NR2R3 o -C(=S)NR2R3, en donde cada uno de R2 y R3 es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R2 y R3, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos de anillo; (4) -C(=O)R4, en donde R4 es independientemente -H o como se define en (21), (22), (23) o (24); (5) -F, -Cl, -Br, -I; (6) -CN; (7) -NO2; (8) -OH; (9) -OR5, en donde R5 es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (10) -SH; (11) -SR6, en donde R6 es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (12) -OC(=O)R7, en donde R7 es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (13) -OC(O)NR8R9, en donde cada uno de R8 y R9 es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R8 y R9, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos de anillo; (14) -NR10R11, en donde cada uno de R10 y R11 es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R10 y R11, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están

unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos de anillo; (15) -NR₁₂C(=O)R₁₃ o -NR₁₂C(=S)R₁₃, en donde R₁₂ es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y R₁₃ es independientemente -H o como se define en (21), (22), (23) o (24); (16) -NR₁₄C(=O)NR₁₅R₁₆ o -NR₁₄C(=S)NR₁₅R₁₆, en donde R₁₄ es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y cada uno de R₁₅ y R₁₆ es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R₁₅ y R₁₆, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos de anillo; (17) -NR₁₇SO₂R₁₈, en donde R₁₇ es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); y R₁₈ es independientemente -H o como se define en (21), (22), (23) o (24); (18) -SO₂R₁₉, en donde R₁₉ es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (19) -OSO₂R₂₀ y en donde R₂₀ es independientemente como se define en (21), (22), (23) o (24); (20) -SO₂NR₂₁R₂₂, en donde cada uno de R₂₁ y R₂₂ es independientemente -H; o como se define en (21), (22), (23) o (24); o R₂₁ y R₂₂, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman un anillo que tiene de 3 a 7 átomos de anillo; (21) aril C₅₋₂₀-alquilo C₁₋₇, por ejemplo, en donde el arilo C₅₋₂₀ es como se define en (22); sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se definen en (1) a (24); (22) carboarilo C₆₋₂₀; heterociclilo C₅₋₂₀; sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se definen en (1) a (24); (23) heterociclilo C₃₋₂₀; sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se definen en (1) a (24); (24) alquilo C₁₋₇; alquilo C₈₋₃₀; alqueno C₂₋₇; alquino C₂₋₇; cicloalquilo C₃₋₇; cicloalqueno C₃₋₇; cicloalquino C₃₋₇; sin sustituir o sustituido, por ejemplo, con uno o más grupos como se definen en (1) a (24), por ejemplo, halo-alquilo C₁₋₇; por ejemplo, amino-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, -(CH₂)_w-amino, w es 1, 2, 3 o 4); por ejemplo, carboxi alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, -(CH₂)_w-COOH, w es 1, 2, 3 o 4); por ejemplo, acil-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, -(CH₂)_w-C(=O)R₄, w es 1, 2, 3 o 4); por ejemplo, hidroxialquilo C₁₋₇ (por ejemplo, -(CH₂)_w-OH, w es 1, 2, 3 o 4); por ejemplo, alcoxi C₁₋₇-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, -(CH₂)_w-O-alquilo C₁₋₇, w es 1, 2, 3 o 4).

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

(1) -C(=O)OH; (2) -C(=O)OMe, -C(=O)OEt, -C(=O)OiPr, -C(=O)OtBu; -C(=O)OcPr; -C(=O)OCH₂CH₂OH, -C(=O)OCH₂CH₂OMe, -C(=O)OCH₂CH₂OEt; -C(=O)OPh, -C(=O)OCH₂Ph; (3) -(C=O)NH₂, -(C=O)NMe₂, -(C=O)NEt₂, -(C=O)N(iPr)₂, -(C=O)N(CH₂CH₂OH)₂; -(C=O)-morfolino, -(C=O)NHPh, -(C=O)NHCH₂Ph; (4) -C(=O)H, -(C=O)Me, -(C=O)Et, -(C=O)tBu, -(C=O)cHex, -(C=O)Ph; -(C=O)CH₂Ph; (5) -F, -Cl, -Br, -I; (6) -CN; (7) -NO₂; (8) -OH; (9) -OMe, -OEt, -OiPr, -OtBu, -OPh, -OCH₂Ph; -OCF₃ -OCH₂CF₃; -OCH₂CH₂OH, -OCH₂CH₂OMe, -OCH₂CH₂OEt; -OCH₂CH₂NH₂, -OCH₂CH₂NMe₂, -OCH₂CH₂N(JPr)₂; -OPh-Me, -OPh-OH, -OPh-OMe, -OPh-F, -OPh-Cl, -OPh-Br, -OPh-I; (10) -SH; (11) -SMe, -SEt, -SPh, -SCH₂Ph; (12) -OC(=O)Me, -OC(=O)Et, -OC(=O)(iPr), -OC(=O)tBu; -OC(=O)cPr; -OC(O)CH₂CH₂OH, -OC(=O)CH₂CH₂OMe, -OC(=O)CH₂CH₂OEt; -OC(=O)Ph, -OC(=O)CH₂Ph; (13) -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NHMe, -OC(=O)NMe₂, -OC(=O)NHEt, -OC(=O)NEt₂, -OC(=O)NHPh₁, -OC(=O)NCH₂Ph; (14) -NH₂, -NHMe, -NHEt, -NH(iPr), -NMe₂, -NEt₂, -N(JPr)₂, -N(CH₂CH₂OH)₂; -NHPh, -NHCH₂Ph; piperidino, piperazino, morfolino; (15) -NH(C=O)Me, -NH(C=O)Et, -NH(C=O)nPr, -NH(C=O)Ph, -NH(C=O)CH₂Ph; -NMe(C=O)Me, -NMe(C=O)Et, -NMe(C=O)Ph, -NMeC(=O)CH₂Ph; (16) -NH(C=O)NH₂, -NH(C=O)NHMe, -NH(C=O)NHEt, -NH(C=O)NPh, -NH(C=O)NHCH₂Ph; -NH(C=S)NH₂, -NH(C=S)NHMe, -NH(C=S)NHEt, -NH(C=S)NPh, -NH(C=S)NCH₂Ph; (17) -NH₂SO₂Me, -NH₂SO₂Et, -NH₂SO₂Ph₁, -NH₂SO₂PhMe, -NH₂SO₂CH₂Ph; -NMeSO₂Me, -NMeSO₂Et₁, -NMeSO₂Ph₁, -NMeSO₂PhMe₁, -NMeSO₂CH₂Ph; (18) -SO₂Me₁, -SO₂CF₃, -SO₂Et, -SO₂Ph, -SO₂PhMe₁, -SO₂CH₂Ph; (19) -OSO₂Me₁, -OSO₂CF₃, -OSO₂Et, -OSO₂Ph, -OSO₂PhMe, -OSO₂CH₂Ph; (20) -SO₂NH₂, -SO₂NHMe, -SO₂NHEt₁, -SO₂NMe₂, -SO₂NEt₂, -SO₂-morfolino, -SO₂NHP h, -SO₂NHCH₂Ph; (21) -CH₂Ph, -CH₂Ph-Me, -CH₂Ph-OH, -CH₂Ph-F, -CH₂Ph-Cl; (22) -Ph₁-Ph-Me, -Ph-OH, -Ph-OMe, -Ph-NH₂, -Ph-F, -Ph-Cl, -Ph-Br, -Ph-I; piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo; furanilo, tiofenilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo; (23) pirrolidinilo, imidazolidinilo, pirazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, azepinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, azetidino; (24) -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -iBu, -sBu, -tBu, -nPe, -nHex; -(CH₂)₇CH₃, -(CH₂)₉CH₃, -(CH₂)₁₁CH₃, -(CH₂)₁₃CH₃, -(CH₂)₁₅CH₃, -(CH₂)₁₇CH₃, -(CH₂)₁₉CH₃; -cPr, -cHex; -CH=CH₂, -CH₂-CH=CH₂; -CF₃, -CHF₂, -CH₂F, -CCl₃, -CBr₃, -CH₂CH₂F, -CH₂CHF₂ y -CH₂CF₃; -CH₂OH, -CH₂OMe, -CH₂OEt, -CH₂NH₂, -CH₂NMe₂; -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂OMe, -CH₂CH₂OEt, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂NMe₂.

En una realización, los sustituyentes, R_p, se seleccionan independientemente entre: halo; ciano; nitro; hidroxilo; alcoxi C₁₋₇; alquilo C₁₋₇; haloalquilo C₁₋₇; y alquilo C₈₋₃₀.

En una realización, los sustituyentes, R_p, se seleccionan independientemente entre: halo; ciano; nitro; hidroxilo; alcoxi C₁₋₄; alquilo C₁₋₄; haloalquilo C₁₋₄; y alquilo C₁₂₋₂₂.

En una realización, los sustituyentes, R_p, se seleccionan independientemente entre: halo; alquilo C₁₋₄; y haloalquilo C₁₋₄.

En una realización, los sustituyentes, R_p, se seleccionan independientemente entre: flúor; alquilo C₁₋₄; y fluoroalquilo C₁₋₄.

En una realización, los sustituyentes, R_p, se seleccionan independientemente entre: F, -CH₃, -CF₃.

Como se usa en el presente documento, el término "halo" incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a restos hidrocarburo saturados monovalentes, monodentados, alifáticos (lineales o ramificados), por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, etc.

- 5 Los ejemplos de grupos alquilo (no sustituidos) incluyen metilo (C1), etilo (C2), propilo (C3), butilo (C4), pentilo (C5), hexilo (C6), heptilo (C7), octilo (C8), nonilo (C9), decilo (C10), undecilo (C11), dodecilo (C12), tridecilo (C13), tetradecilo (C14), pentadecilo (C15) y eicodécilo (C20). Los ejemplos de grupos alquilo lineales (no sustituidos) incluyen metilo (C1), etilo (C2), n-propilo (C3), n-butilo (C4), n-pentilo (amilo) (C5), n-hexilo (C6) y n-heptilo (C7).
- 10 Los ejemplos de grupos alquilo ramificados (no sustituidos) incluyen isopropilo (C3), isobutilo (C4), sec-butilo (C4), terc-butilo (C4), isopentilo (C5) y neopentilo (C5).

Como se usa en el presente documento, el término "alquenilo" se refiere a restos hidrocarburo monovalentes, monodentados, alifáticos (lineales o ramificados) que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono.

- 15 Los ejemplos de grupos alquenilo (no sustituidos) incluyen etenilo (vinilo, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1-propenilo ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-propenilo (alilo, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$), isopropenilo (1-metilvinilo, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$), butenilo (C4), pentenilo (C5) y hexenilo (C6).

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "alquinilo" se refiere a restos hidrocarburo monovalentes, monodentados, alifáticos (lineales o ramificados) que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono.

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

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a restos hidrocarburo monovalentes, monodentados, no aromáticos saturados que tienen al menos un anillo de átomos de carbono (preferentemente que tiene de 3 a 7 átomos de carbono del anillo).

- 30 Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen los procedentes de compuestos hidrocarburo monocíclicos saturados: ciclopropano (C3), ciclobutano (C4), ciclopentano (C5), ciclohexano (C6), cicloheptano (C7), metilciclopropano (C4), dimetilciclopropano (C5), metilciclobutano (C5), dimetilciclobutano (C6), metilciclopentano (C6), dimetilciclopentano (C7), metilciclohexano (C7), dimetilciclohexano (C8), mentano (C10); y compuestos hidrocarburo policíclicos saturados: tujano (C10), carano (C10), pinano (C10), bornano (C10), norcarano (C7), norpinano (C7), norbornano (C7), adamantano (C10), decalina (decahidronaftaleno) (C10).

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquenilo" se refiere a restos hidrocarburo monovalentes, monodentados, no aromáticos que tienen al menos un anillo de átomos de carbono (preferentemente que tiene de 3 a 7 átomos de carbono del anillo) y al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen los procedentes de compuestos hidrocarburo monocíclicos insaturados: ciclopropeno (C3), ciclobuteno (C4), ciclopenteno (C5), ciclohexeno (C6), metilciclopropeno (C4), dimetilciclopropeno (C5), metilciclobuteno (C5), dimetilciclobuteno (C6), metilciclopenteno (C6), dimetilciclopenteno (C7), metilciclohexeno (C7), dimetilciclohexeno (C8); y compuestos de hidrocarburo policíclico insaturados: canfeno (C10), limoneno (C10), pineno.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "cicloalquinilo" se refiere a restos hidrocarburo monovalentes, monodentados, no aromáticos que tienen al menos un anillo de átomos de carbono (preferentemente que tiene de 3 a 7 átomos de carbono del anillo) y al menos un triple enlace carbono-carbono.

- 50 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a restos monovalentes, monodentados que tienen un anillo aromático y que tiene de 3 a 20 átomos de anillo (a menos que se especifique otra cosa). Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos de anillo. Los átomos del anillo pueden ser todos átomos de carbono, como en los grupos "carbonilo" o los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, etc.) (por ejemplo, seleccionados entre N, O y S), como en los grupos "heteroarilo". En este contexto, los sufijos (por ejemplo, C5-C20, C5-C12, C5-C10, etc.) indican el número de átomos en el anillo o el intervalo del número de átomos en el anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos.

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen aquellos derivados de benceno (es decir, fenilo) (C6), naftaleno (C10), azuleno (C10), antraceno (C14), fenantreno (C14), naftaceno (C18) y pireno (C16).

- 60 Los ejemplos de grupos carboarilo que comprenden anillos condensados, siendo al menos uno de ellos un anillo aromático, incluyen grupos derivados de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C9), indeno (C9), isoindeno (C9), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (C10), acenafteno (C12), fluoreno (C13), fenaleno (C13), acefenantreno (C15) y aceantreno (C16).

- 65 Los ejemplos adicionales de grupos carboarilo incluyen grupos derivados de: indeno (C9), indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C9), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) (C10), acenafteno (C12), fluoreno (C13), fenaleno

(C13), acefenantreno (C15), aceantreno (C16), clorantreno (C20).

5 Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclico incluyen aquellos derivados de: N1: pirrol (azol) (C5), piridina (azina) (C6); Ov furano (oxol) (C5); S1: tiofeno (tiol) (C5); N1O1: oxazol (C5), isoxazol (C5), isoxazina (C6); N2O1: oxadiazol (furazano) (C5); N3O1: oxatriazol (C5); NISI: tiazol (C5), isotiazol (C5); N2: imidazol (1,3-diazol) (C5), pirazol (1,2-diazol) (C5), piridazina (1,2-diazina) (C6), pirimidina (1,3-diazina) (C6) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C6); N3: triazol (C5), triazina (C6); y, N4: tetrazol (C5).

10 Los ejemplos de grupos heteroarilo policíclicos incluyen: grupos heterocíclicos (con 2 anillos condensados) derivados de benzofurano (O1), isobenzofurano (O1), indol (N1), isoindol (N1), indolizina (N1), indolina (N1), isoindolina (N1), purina (N4) (por ejemplo, adenina, guanina), bencimidazol (N2), indazol (N2), benzoxazol (N1O1), bencisoxazol (N1O1), benzodioxol (O2), benzofurazano (N2O1), benzotriazol (N3), benzotiofurano (SI), benzotiazol (NISI), benzotiadiazol (N2S); grupos heterocíclicos (con 2 anillos condensados) derivados de cromeno (O1), isocromeno (O1), cromano (O1), isocromano (O1), benzodioxano (O2), quinolina (N1), isoquinolina (N1), quinolizina (N1), benzoxazina (N1O1), benzodiazina (N2), piridopiridina (N2), quinoxalina (N2), quinazolina (N2), cinolina (N2), ftalazina (N2), naftiridina (N2), pteridina (N4); grupos heterocíclicos (con 2 anillos condensados) derivados de benzodiazepina (N2); grupos heterocíclicos C13 (con 3 anillos condensados) derivados de carbazol (N1), dibenzofurano (O1), dibenzotiofeno (SI), carbolina (N2), perimidina (N2), piridoindol (N2); y, grupos heterocíclicos C14 (con 3 anillos condensados) derivados de acridina (N1), xanteno (O1), tioxanteno (SI), oxantreno (O2), fenoxantina (O1S1), fenazina (N2), fenoxazina (N1O1), fenotiazina (NISI), tiantreno (S2), fenantridina (N1), fenantrolina (N2), fenazina (N2).

25 Los grupos heteroarilo que tienen un átomo de anillo de nitrógeno en forma de un grupo -NH pueden estar N-sustituidos, es decir, como -NR-. Por ejemplo, el pirrol puede estar sustituido en N-metilo, para dar N-metilpirrol. Los ejemplos de N-sustituyentes incluyen alquilo C1-C7; carboarilo C6-C20; carboaril C6-C20-alquilo CrC7; alquil C1-C7-acilo; carboaril C6-C20-acilo; carboaril C6-C20-alquil CrC7-acilo; etc. Los grupos heteroarilo que tienen un átomo de anillo de nitrógeno en forma de un grupo -N= pueden estar sustituidos en forma de un N-óxido, es decir, como -N(→O)= (también indicado como -N+(→O")=). Por ejemplo, la quinolina puede sustituirse para dar N-óxido de quinolina; piridina para dar N-óxido de piridina; benzofurazano para dar N-óxido de benzofurazano (también conocido como benzofuroxano).

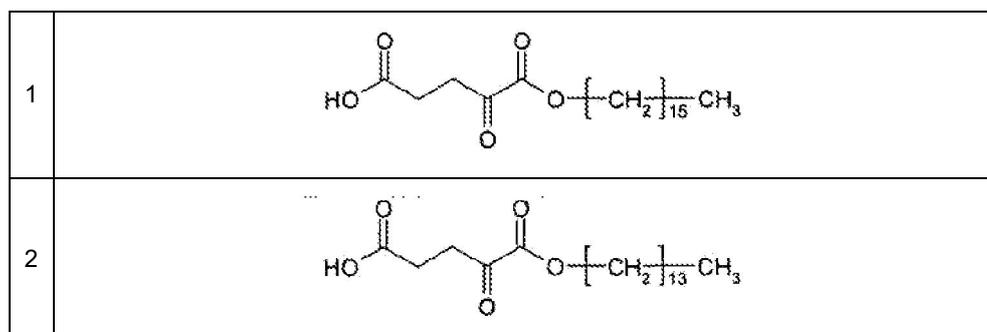
30 Peso molecular

35 En una realización, el compuesto tiene un peso molecular de 250 a 1000. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 275; 300; 325; 350; 375; 400; 425; 450. En una realización, el extremo superior del intervalo es 900; 800; 700; 600; 500; 400. En una realización, el intervalo es de 250 a 900. En una realización, el intervalo es de 250 a 800. En una realización, el intervalo es de 250 a 700. En una realización, el intervalo es de 250 a 600. En una realización, el intervalo es de 250 a 500.

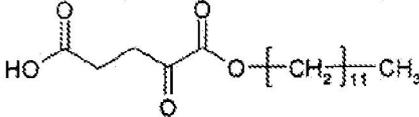
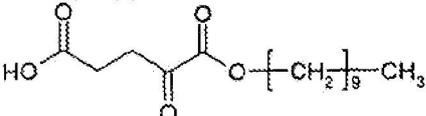
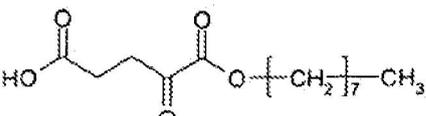
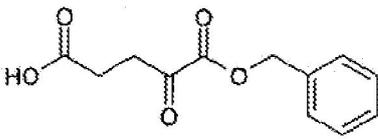
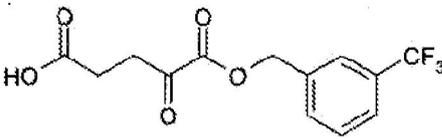
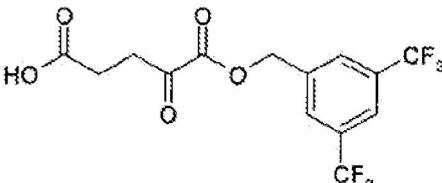
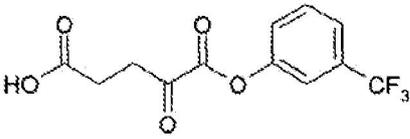
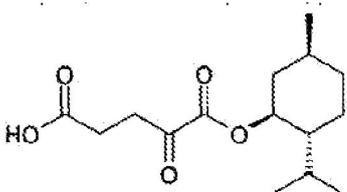
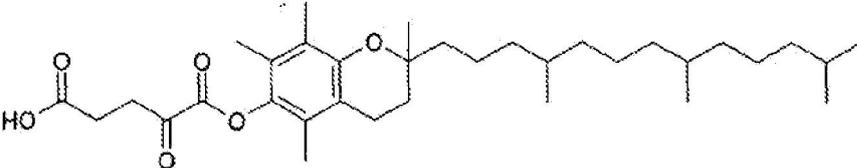
40 Algunos ejemplos preferidos

En el presente documento se divulgan todas las combinaciones plausibles y compatibles de las realizaciones descritas anteriormente. Cada una de estas combinaciones se divulga en el presente documento en la misma medida como si cada combinación individual se citase específica e individualmente.

45 Los ejemplos de algunos compuestos preferidos incluyen los siguientes:

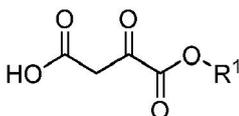


(continuación)

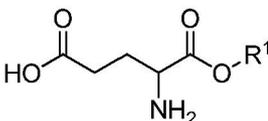
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

En realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula (II), en donde R1 es un resto como se muestra en los

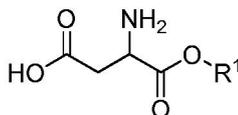
compuestos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 en la tabla anterior:



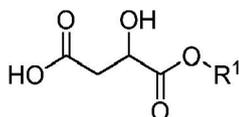
- 5 En realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula (III), en donde R1 es un resto como se muestra en los compuestos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 en la tabla anterior:



- 10 En realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula (IV), en donde R1 es un resto como se muestra en los compuestos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 en la tabla anterior:



- 15 En realizaciones, el compuesto es un compuesto de fórmula (V), en donde R1 es un resto como se muestra en los compuestos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 en la tabla anterior:



20 Compuestos antiglucolíticos

En algunas realizaciones, puede administrarse un compuesto antiglucolítico o un inhibidor glucolítico a un sujeto para el tratamiento de un trastorno proliferativo, tal como un cáncer, tal como un cáncer descrito en el presente documento. Las expresiones "compuesto antiglucolítico" e "inhibidor glucolítico" se usan indistintamente en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras su administración, convierte a un cáncer PET positivo (por ejemplo, un tumor) en un cáncer PET negativo.

30 En algunas realizaciones, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz, inhibe una enzima en la vía glucolítica o inhibe la captación de glucosa (por ejemplo, inhibe directamente la captación y/o formación de glucosa).

35 En una realización, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras su administración, compete directamente con la glucosa (por ejemplo, por el acceso a una diana celular, tal como una enzima).

40 Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras su administración, convierte a un cáncer PET positivo (por ejemplo, un tumor) en un cáncer PET negativo. En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor glucolítico convierte una célula cancerosa dependiente de la glucolisis en una célula cancerosa cuya capacidad para la glucolisis está tan deteriorada que es esencialmente incapaz de efectuar la glucolisis. Los inhibidores glucolíticos ejemplares que pueden hacer que una célula cancerosa sea esencialmente incapaz de efectuar la glucolisis incluyen: agentes alquilantes; nitrosoureas; antibióticos antitumorales; hormonas corticosteroides; antiestrógenos; inhibidores de aromatasa; progestinas; antiandrógenos; agonistas de LHRH; terapias con anticuerpos; y otras terapias contra el cáncer. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen busulfano, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, dacarbazina (DTIC)₅ mecloretamina (mostaza nitrogenada) y melfalano. Los ejemplos de nitrosoureas incluyen carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina (Adriamycin), idarrubicina y mitoxantrona.

45 Los ejemplos de hormonas corticosteroides incluyen prednisona y dexametasona. Los ejemplos de antiestrógenos incluyen tamoxifeno y fulvestrant. Los ejemplos de inhibidores de aromatasa incluyen anastrozol y letrozol. Un ejemplo

de una progestina es el acetato de megestrol. Los ejemplos de antiandrógenos incluyen bicalutamida, flutamida. Los ejemplos de agonistas de LHRH incluyen leuprolida y goserelina. Los ejemplos de terapias con anticuerpos incluyen Herceptin y Avastin. Los ejemplos de otros compuestos anticancerosos incluyen L-asparaginasa y tretinoína. En algunas realizaciones, pueden usarse combinaciones de dos o más compuestos anticancerosos.

Existen numerosos métodos para determinar si un cáncer es dependiente o no de la glucólisis. Se pueden extraer muestras de tumores y examinarse *in vitro* mediante uno cualquiera de varios ensayos bien conocidos para determinar si las células son dependientes de la glucólisis. Dichos métodos pueden determinar si las células utilizan o no glucólisis aeróbica o anaeróbica. La tecnología de escáner de FDG-PET usa altos niveles de captación de glucosa como marcador para la detección. Las células cancerosas que captan el derivado de glucosa detectable, ¹⁸fluoro-2-desoxiglucosa pueden localizarse en una imagen por ordenador de la anatomía del paciente. Los cánceres que pueden detectarse mediante la tecnología de escáner de FDG-PET tienen elevadas probabilidades de ser dependientes de la glucólisis.

Las metodologías de PET se exponen en Czemin, J, 2002 Acta Medica Austriaca 29:162-170. Muchos cánceres se caracterizan por una elevada tasa de glucólisis, en donde el cáncer tiene células que muestran una mayor velocidad de glucólisis que la del tejido que lo rodea. Dichas células cancerosas captan cantidades por encima de la media de glucosa del ambiente. Un cáncer caracterizado por una alta tasa de glucólisis puede identificarse usando tecnología de obtención de imágenes por PET, preferentemente con ¹⁸fluorodesoxiglucosa. La detección positiva de un tumor usando dicha prueba indica que el cáncer se caracteriza por glucólisis.

Como se analiza en otra parte del presente documento, en algunas realizaciones, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras su administración, inhibe una enzima en la vía glucolítica o inhibe la captación de glucosa (por ejemplo, inhibe directamente la captación y/o formación de glucosa). En algunas realizaciones preferidas, el compuesto inhibe de manera selectiva una isoforma de una enzima en la vía glucolítica que está presente en las células cancerosas, por ejemplo, una isoforma específica de cáncer de una cinasa o deshidrogenasa, tal como PKM2 o LDHa. Otras enzimas ejemplares en la vía glucolítica que pueden usarse como diana de un inhibidor glucolítico incluyen glut1, hexocinasa 2, fosfofructocinasa 3 y piruvato deshidrogenasa cinasa 1 (PDK1). Por consiguiente, en el presente documento se incluyen compuestos que inhiben una enzima de la vía glucolítica, tal como una enzima descrita a continuación.

Transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1)

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

GLUT1 está localizado principalmente en la membrana celular y se expresa a diversos niveles en muchos tejidos humanos. Tiene 12 dominios α -helicoidales transmembrana, conteniendo cada una 21 restos de aminoácidos. El precursor de la proteína GLUT1 humana tiene 492 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 54 kDa y está codificado por el gen SLC2A1 (también conocido como GLUT1). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de GLUT1 humano y de ratón se describen, por ejemplo, en Mueckler *et al.*, Science 229:941-945 (1985) y Kaestner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3150-3154(1989), respectivamente.

La expresión aumentada y desregulada de GLUT1 está asociada con un aumento del transporte de la glucosa en una variedad de células cancerosas (Macheda *et al.*, J Cell Physiol. 202:654-62 (2005)). La transformación oncogénica de células de mamífero cultivadas puede provocar un aumento de la expresión de GLUT1 mediante la interacción con elementos potenciadores del promotor de GLUT1. GLUT1 se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama y los niveles de GLUT1 se corresponden con sus potenciales de invasividad. Los niveles de GLUT1 y la captación de glucosa también pueden aumentarse mediante hipoxia en células de cáncer de ovario y de pulmón. En una situación clínica, se observa expresión elevada de GLUT1 en diversos cánceres que incluyen, por ejemplo, carcinoma hepático, pancreático, mamario, esofágico, cerebral, renal, pulmonar, cutáneo, colorrectal, endometrial, ovárico y de cuello de útero. Los altos niveles de expresión de GLUT1 en tumores también se asocian con una mala supervivencia.

Se conocen en la técnica inhibidores de GLUT1. Se describen inhibidores de GLUT1 ejemplares, por ejemplo, en Macheda *et al.*, J. Cell Physiol. 202:654-62 (2005), Singh *et al.*, Mol Cell Endocrinol. 160:61-66 (2000) y Zhang *et al.* Bioconjug. Chem. 14:709-714 (2003).

Hexocinasa 2 (HK2)

La hexocinasa 2 (HK2), también conocida como hexocinasa tipo II o hexocinasa de músculo, es una enzima de la

familia de las hexocinasas. Las hexocinasas son enzimas que fosforilan la hexosa en hexosa fosfato. En los vertebrados, hay cuatro isozimas fosforilantes de glucosa principales, denominadas hexocinasa 1-4, la hexocinasa 2 cataliza la reacción de $\text{ATP} + \text{D-hexosa} = \text{ADP} + \text{D-hexosa 6-fosfato}$. Es una isozima con baja K_m que tiene una alta afinidad por la glucosa a bajas concentraciones (por ejemplo, por debajo de 1 mM) y sigue la cinética de Michaelis-Menton a concentraciones fisiológicas de los sustratos. La hexocinasa 2 es una enzima alostérica inhibida por su producto, glucosa-6-fosfato.

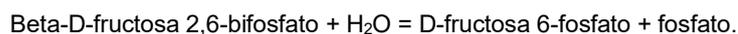
La hexocinasa 2 está ubicada principalmente en la membrana mitocondrial externa y se expresa predominantemente en tejidos sensibles a la insulina, tales como el músculo esquelético. La hexocinasa 2 humana tiene 917 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 102 kDa y está codificada por el gen HK2. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de hexocinasa 2 humana y de ratón se describen, por ejemplo, en Deeb *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:68-74 (1993) y Heikkinen *et al.*, *Mamm. Genome* 11:91-96(2000), respectivamente.

La expresión aumentada de hexocinasa 2 se asocia con diversos cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón, hígado, gastrointestinal y de mama. La hexocinasa 2 también se sobreexpresa en metástasis cerebrales en pacientes de cáncer de mama. En las células cancerosas, el fenotipo altamente glucolítico está soportado por la sobreexpresión de hexocinasa 2. La sobreexpresión de hexocinasa 2 da lugar a la producción de glucosa-6-fosfato a una tasa elevada, por lo que promueve un ambiente desfavorable para las células normales y soporta la proliferación celular. La hexocinasa 2 también puede aumentar la metástasis mediante la supresión de la muerte de células cancerosas (Mathupala *et al.*, *Oncogene* 25:4777-4786 (2006)).

Se conocen en la técnica inhibidores de hexocinasa 2. Se describen inhibidores de hexocinasa 2 ejemplares, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 5.854.067, Mathupala *et al.*, *Oncogene* 25:4777-4786 (2006) y Kim *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 6:2554-2562 (2007).

Fosfofructocinasa 3 (PFKFB3)

La fosfofructocinasa 3 (PFKFB3), también conocida como 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa, 3, 6PF-2-K/isozima de tipo cerebral/placentario Fru-2,6-P2ASE, iPFK-2 o antígeno de carcinoma renal NY-REN-56, es una enzima de la familia de 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFK2/FBPasa) y la familia de fosfoglicerato mutasa. En seres humanos, hay cuatro PFK2/FBPasas principales, denominadas PFK2/FB Pasas 1-4. Las PPK2/FBPasas controlan la concentración estacionaria de fructosa-2,6-bifosfato (Fru-2,6-BP). PFKFB3 puede catalizar la siguiente reacción:



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

La PFKFB3 se sobreexpresa en diversas células cancerosas que incluyen, por ejemplo, de leucemia, de cáncer de colon, próstata, pulmón, mama, páncreas, tiroides y ovario y es necesaria para el crecimiento de ciertas líneas celulares de leucemia y de cáncer de cuello de útero (Clem *et al.*, *Mol Cancer Ther.* 7:110-20 (2008)). Al regular la concentración intracelular de fructosa-2,6-bifosfato, PFKFB3 controla el flujo glucolítico a lactato y la derivación no oxidativa de la pentosa y es necesaria para la alta tasa glucolítica y el crecimiento independiente de anclaje de células transformadas por ras (Chesney, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9:535-539 (2006)).

Se conocen en la técnica inhibidores de PFKFB3. Se describen inhibidores de PFKFB3 ejemplares, por ejemplo, en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2009/0074884 y Clem *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 7:110-20 (2008).

Piruvato cinasa M2 (PKM2)

La piruvato cinasa M2 (PKM2), también conocida como isozima piruvato cinasa muscular, piruvato cinasa 2/3, proteína de unión a hormona tiroidea citosólica, THBP1, p58, M2-PK o M2-PK tumoral, es una enzima de la familia de piruvato cinasa. Hay cuatro isozimas de piruvato cinasa en mamíferos: L, R, M1 y M2. El tipo L es la principal isozima en el hígado, R se encuentra en glóbulos rojos, M1 es la principal forma en músculo, corazón y cerebro y M2 se encuentra en los tejidos fetales tempranos, así como en la mayoría de células cancerosas. PKM2 es una enzima glucolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) a ADP, generando ATP. PKM2 existe como monómero en ausencia de FBP y se asocia de manera reversible para formar un homotetrámero en presencia de FBP. La formación de tetrámero induce la actividad de piruvato cinasa. La forma tetramérica tiene alta afinidad por el sustrato

y se asocia en el complejo de enzima glucolítica. La relación entre la forma tetramérica altamente activa y la forma dimérica prácticamente inactiva determina si los carbonos de la glucosa se canalizan hacia procesos biosintéticos o se usan para la producción glucolítica de ATP. PKM2 se activa alostéricamente por D-fructosa 1,6-bifosfato (FBP) y se inhibe por oxalato y 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3). La actividad de la forma tetramérica se inhibe por PML.

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

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

Se conocen en la técnica inhibidores de PKM2. Se describen inhibidores de PKM2 ejemplares, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2008/0021116, las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 2008/019139 y WO 2006/125323, Spoden *et al.*, Int. J. Cancer 123:312-321 (2008) y el resumen Abstract n.º 4408, AACR 100th annual meeting (Denver, CO, EE. UU., 18-22 de abril de 2009).

Lactato deshidrogenasa A (LDHa)

La lactato deshidrogenasa A (LDHa), también conocida como subunidad muscular de LDH, antígeno de carcinoma renal NY-REN-59, proteína del gen 19 inductor de la proliferación celular, es una enzima de la familia LDH y la superfamilia de LDH/MDH. LDHa cataliza la conversión de L-lactato y NAD⁺ en piruvato y NADH en la etapa final de la glucólisis anaerobia.

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

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

Se conocen en la técnica inhibidores de LDHa. Se describen inhibidores ejemplares de LDHa, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.853.742 y 6.124.498 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.º WO 98/36774.

Piruvato deshidrogenasa cinasa isoforma 1 (PDK1)

La piruvato deshidrogenasa cinasa isoforma 1 (PDK1) es una enzima de la familia de piruvato deshidrogenasa cinasa/alfa-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa cinasa PDK/BCKDK proteína cinasa. Las piruvato deshidrogenasa cinasas inactivan a la piruvato deshidrogenasa fosforilándola usando ATP. PDK tiene cuatro isozimas, denominadas PDK1-4. PDK1 inhibe el complejo de piruvato deshidrogenasa mitocondrial mediante fosforilación de la subunidad E1 alfa, contribuyendo de este modo a la regulación del metabolismo de la glucosa. La actividad catalítica de PDK1 puede ilustrarse como:



PDK1 se ubica principalmente en la matriz mitocondrial y se expresa predominantemente en el corazón. La inhibición de la actividad del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDC) por PDK1 contribuye al fenotipo maligno en diversos cánceres, por ejemplo, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello y se asocia con la estabilización de HIF-1 α . La inhibición de la expresión de PDK1 puede dar lugar a la reducción de los niveles de lactato, la expresión de HIF-1 α y el grado del fenotipo maligno en células cancerosas (McFate *et al.*, J. Biol. Chem. 283:22700-22708 (2008)).

EL precursor de PDK1 tiene 436 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 49 kDa. PDK1 humana está codificada por el gen PDK1. Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de PDK1 humana se describen, por ejemplo,

en Gudi *et al.*, J. Biol. Chem. 270:28989-28994 (1995), el MGC Project Team, Genome Res. 14:2121-2127 (2004) y Caminci *et al.* Science 309:1559-1563(2005).

5 Se conocen en la técnica inhibidores de PDK1. Se describen inhibidores de PDK1 ejemplares, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.878.712, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2009/0209618, las Publicaciones de Solicitud Internacional Patente de los Estados Unidos n.º: WO 2001/052825, WO 2002/081751 y WO 2005/092040, Cairns *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:9445-9450 (2007), Mann *et al.*, Biochim. Biophys Acta. 1480:283-292 (2000) y Aicher *et al.*, J. Med. Chem. 42:2741-2746 (1999).

10 Pueden evaluarse los compuestos candidatos respecto de la inhibición de una enzima descrita en el presente documento, por ejemplo, una enzima glucolítica, usando métodos conocidos en la técnica.

15 Como se ha analizado anteriormente, en algunas realizaciones, un inhibidor glucolítico es un compuesto, que tras su administración, compite directamente con la glucosa. Los compuestos ejemplares incluyen derivados estructurales de la glucosa, tal como 2 desoxiglucosa (es decir, 2dg).

Antioxidantes

20 En algunas realizaciones, puede administrarse un compuesto antioxidante a un sujeto para el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, tal como un cáncer, tal como un cáncer descrito en el presente documento.

25 El término "antioxidante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que frena o previene la oxidación de una molécula, por ejemplo, la transferencia de electrones de un sustrato a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres, que pueden comenzar una reacción en cadena que daña las células. Los antioxidantes pueden terminar estas reacciones en cadena retirando los intermedios de radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose por sí mismos. Los antioxidantes ejemplares incluyen agentes reductores, tales como tioles, ácidos ascórbicos o fenoles (por ejemplo, un polifenol).

30 En general, los antioxidantes se clasifican en dos divisiones amplias, hidrosolubles (es decir, hidrófilos) o liposolubles (es decir, hidrófobos). En general, los antioxidantes hidrosolubles reaccionan con agentes oxidantes en el citosol de la célula y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen la membrana celular de la oxidación de lípidos. Los antioxidantes hidrosolubles ejemplares incluyen ácido ascórbico, glutatión, ácido lipoico y ácido úrico. Los antioxidantes liposolubles ejemplares incluyen carotenos, alfa-tocoferol y ubiquinol. Los antioxidantes fenólicos ejemplares incluyen resveritrol y flavinoides. En algunas realizaciones, el antioxidante es un antioxidante enzimático, tal como superóxido dismutasa, catalasa, peroxirredoxina, tioredoxina y sistemas de glutatión.

35 Puede evaluarse la actividad antioxidante de los compuestos candidatos usando ensayos conocidos en la técnica.

Agentes hipometilantes

40 Se ha descubierto que ciertos genes en pacientes (por ejemplo, AML, MDS o glioma) que portan una mutación de IDH (por ejemplo, una mutación de IDH1 o IDH2) tienen metilación aumentada (por ejemplo, hipermetilación) en la región promotora. En algunas realizaciones, puede administrarse un agente hipometilante a un sujeto para el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, tal como un cáncer, tal como un cáncer descrito en el presente documento.

45 La expresión "agente hipometilante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe la metilación del ADN. La expresión "agente hipometilante" puede usarse indistintamente con la expresión "agente desmetilante".

50 Los agentes hipometilantes ejemplares incluyen los siguientes compuestos, decitabina (5-aza-desoxicidina), zebularina, isotiocianatos, azacitidina (5-azacitidina), 5-fluoro-2'-desoxicidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina, etionina, S-adenosil-L-homocisteína, mitoxantrona, neplanocina A, 3-desazanoplanocina A, cicloleucina, hidralazina, isotiocianato de fenilhexilo, curcumina, partenolida y SGI-1027.

Compuestos terapéuticos adicionales - Compuestos que aumentan el nivel de α -cetoglutarato

60 En algunas realizaciones, un compuesto que (generalmente) aumenta el nivel de α -cetoglutarato (por ejemplo, en una célula) puede usarse en un método descrito en el presente documento. Por ejemplo, un compuesto puede aumentar los niveles de α -cetoglutarato inhibiendo otras enzimas, tales como α -cetoglutarato deshidrogenasa y/o ceto ácido de cadena ramificada deshidrogenasa. El bloqueo de estas enzimas puede tener un efecto dual de aumentar los niveles de α -cetoglutarato y reducir los niveles de succinato.

65 Además, ambas enzimas son homólogos estructurales que usan ácido lipoico como cofactor. Por lo tanto, un análogo del ácido lipoico puede ser otro potencial inhibidor de estas enzimas y por tanto, ser un compuesto que aumenta el

nivel de α -cetoglutarato.

5 Como alternativa, un compuesto puede aumentar el nivel de α -cetoglutarato potenciando la actividad de glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT). El glutamato por sí mismo activará la actividad de GOT, lo que da lugar a niveles aumentados de α -cetoglutarato.

Además, el compuesto puede seleccionarse de metabolitos aguas arriba del ciclo de los TCA, incluyendo oxaloacetato, citrato, isocitrato y derivados de los mismos. Compuestos adicionales - α -cetoglutaratos en general.

10 En el presente documento se describen el ácido α -cetoglutarico, sales de α -cetoglutarato y derivados del ácido α -cetoglutarico (por ejemplo, en general, ésteres del ácido α -cetoglutarico) y, especialmente, su uso en medicina, por ejemplo, en el tratamiento de un cáncer descrito en el presente documento.

15 En una realización, el compuesto es un α -cetoglutarato que porta (por ejemplo, está conjugado a, acoplado a) un resto de aminoácido (por ejemplo, un resto de α -aminoácido) (por ejemplo, un resto de ornitina o arginina).

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

Dichos compuestos se conocen en la bibliografía (véase, por ejemplo, Le Boucher *et al.* (1997)) y/o se encuentran disponibles comercialmente y/o pueden prepararse usando procedimientos sintéticos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

25

Isómeros

30 Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautoméricas, conformacionales o anoméricas particulares, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L; formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinal y anticlinal; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de barco, silla, torsión, sobre, y media silla; y combinaciones de las mismas, citadas en lo sucesivo colectivamente como "isómeros" (o "formas isoméricas").

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

40

45 En una realización, una preparación de un compuesto divulgado en el presente documento está enriquecida respecto de un isómero del compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, correspondiente a un estereocentro seleccionado, por ejemplo, la posición 2 del ácido 2-hidroxiglutarico. Por ejemplo, el compuesto tiene una pureza correspondiente a un compuesto que tiene una estereoquímica de un estereocentro seleccionado de al menos aproximadamente un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

50 En una realización, una composición descrita en el presente documento incluye una preparación de un compuesto divulgado en el presente documento que está enriquecido respecto de una estructura o estructuras que tienen una estereoquímica seleccionada, por ejemplo, R o S, en un estereocentro seleccionado, por ejemplo, la posición 2 del ácido 2-hidroxiglutarico. Las configuraciones R/S ejemplares pueden ser las proporcionadas en un ejemplo descrito en el presente documento.

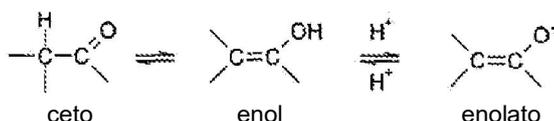
55 Una "preparación enriquecida", como se usa en el presente documento, está enriquecida respecto de una estereoconfiguración seleccionada de uno, dos, tres o más estereocentros seleccionados en el presente compuesto. Los estereocentros seleccionados ejemplares y las estereoconfiguraciones ejemplares de los mismos pueden seleccionarse entre las proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, en un ejemplo descrito en el presente documento. Por enriquecido se entiende al que al menos un 60 %, por ejemplo, de las moléculas del compuesto en la preparación tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado. En una realización, es al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Enriquecido se refiere al nivel de una o más de las presentes moléculas y no indica una limitación de proceso, a menos que se especifique.

60

65 Obsérvese que, excepto como se analiza a continuación para las formas tautómeras, excluidas específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, se encuentran los isómeros *i* estructurales (o constitutivos) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre átomos en lugar de simplemente por la posición de los átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, -OCH₃, no debe interpretarse como una referencia a

su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, -CH₂OH. De manera similar, una referencia a ortoclorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, el metaclorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras también puede incluir formas estructuralmente isoméricas que se encuentran dentro de dicha clase (por ejemplo, alquilo C1-7 incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y *terc*-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y parametoxifenilo).

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



Obsérvese que se incluyen específicamente en el término "isómero" los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, el H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 1H, 2H (D) y 3H (T); el C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 12C, 13C y 14C; el O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 16O y 18O; y similares. A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto en particular incluye todas las formas isómeras, incluyendo mezclas (total o parcialmente) racémicas y otras mezclas de las mismas. Los métodos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccional y medios cromatográficos) de dichas formas isómeras o bien se conocen en la técnica o se obtienen fácilmente adaptando los métodos enseñados en el presente documento o métodos conocidos, de una manera conocida.

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Se analizan ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts". J. Pharm. Sci. Vol. 66, págs. 1-19.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Algunos ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, iones de metales alcalinos tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos, tales como Ca²⁺ y Mg²⁺ y otros cationes, tales como Al³⁺. Algunos ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ion amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Algunos ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, así como aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

En caso de que el compuesto sea catiónico o tenga un grupo funcional que pueda ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Algunos ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Algunos ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos orgánicos: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etandisulfónico, etansulfónico, fumárico, gluqueptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalencarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico y valérico. Algunos ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas del mismo.

Formas químicamente protegidas

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular el compuesto activo en una forma químicamente protegida. La expresión "forma químicamente protegida" se usa en el presente documento en el sentido químico convencional y se refiere a un compuesto en el que se protegen uno o más grupos funcionales reactivos frente a reacciones químicas no deseables en condiciones específicas (por ejemplo, pH, temperatura, radiación, disolvente y similares). En la práctica, se emplean métodos químicos bien conocidos para, de manera reversible, hacer que no sea reactivo un grupo funcional, que de otro modo sería reactivo, en condiciones específicas. En una forma químicamente

protegida, uno o más grupos funcionales reactivos se encuentra en forma de un grupo protegido o protector (también conocido como grupo enmascarado o de enmascaramiento o un grupo bloqueado o de bloqueo). Mediante la protección de un grupo funcional reactivo, pueden realizarse reacciones que implican otros grupos funcionales reactivos no protegidos, sin afectar al grupo protegido; el grupo protector puede eliminarse, normalmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green y P. Wuts; 3.^a Edición; John Wiley and Sons, 1999). A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular también incluye formas químicamente protegidas del mismo.

Se usa ampliamente y se conoce bien en la síntesis orgánica una gran variedad de dichos métodos "protectores", "de bloqueo" o "de enmascaramiento". Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, siendo ambos reactivos en condiciones específicas, puede derivatizarse para hacer que uno de los grupos funcionales esté "protegido", y por tanto no reactivo, en las condiciones específicas; protegido de este modo, el compuesto puede usarse como un reactivo que tiene efectivamente solo un grupo funcional reactivo. Después de que se complete la reacción deseada (que implica al otro grupo funcional), puede "desprotegerse" el grupo protegido para volver a su funcionalidad original.

Por ejemplo, un grupo hidroxilo puede estar protegido como un éter (-OR) o un éster (-OC(=O)R), por ejemplo, como: un éter t-butílico; un éter de bencilo, benzhidrilo (difenilmetilo) o tritilo (trifenilmetilo); un éter de trimetilsililo o t-butildimetilsililo; o un éster de acetilo (-OC(=O)CH₃, -OAc).

Por ejemplo, puede protegerse un grupo aldehído o cetona en forma de un acetal (R-CH(OR)₂) o cetal (R₂C(OR)₂), respectivamente, en el que el grupo carbonilo (>C=O) se convierte en un diéter (>C(OR)₂), mediante reacción con, por ejemplo, un alcohol primario. El grupo aldehído o cetona se regenera fácilmente mediante hidrólisis usando un gran exceso de agua en presencia de ácido.

Por ejemplo, puede protegerse un grupo amina, por ejemplo, en forma de una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo, como: una metil amida (-NHCO-CH₃); una benciloxi amida (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz); como una t-butoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); una 2-bifenil-2-propoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), en forma de una 9-fluorenilmetoxi amida (-NH-Fmoc), en forma de una 6-nitroveratriloxi amida (-NH-Nvoc), en forma de una 2-trimetilsililetiloxi amida (-NH-Teoc), en forma de una 2,2,2-tricloroetiloxi amida (-NH-Troc), en forma de una aliloxi amida (-NH-Alloc), en forma de una 2(-fenilsulfonil)etiloxi amida (-NH-Psec); o, en casos adecuados (por ejemplo, aminas cíclicas), en forma de un radical nitróxido (>N-O \cdot).

Por ejemplo, puede protegerse un grupo de ácido carboxílico como un éster, por ejemplo, como: un éster de alquilo Cⁿ (por ejemplo, un éster de metilo; un éster t-butílico); un éster de haloalquilo C_nr (por ejemplo, un éster de trihaloalquilo Cl-7); un éster de trialquil C₁₋₇silil-alquilo Ci.7; o un éster de aril C₅₋₂₀-alquilo C₁₋₇ (por ejemplo, un éster bencilico; un éster nitrobencilico); o en forma de una amida, por ejemplo, en forma de una metil amida.

Por ejemplo, puede protegerse un grupo tiol en forma de un tioéter (-SR), por ejemplo, como: un tioéter bencilico; un éster acetamidometílico (-S-CH₂NHC(=O)CH₃).

Profármacos

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

A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular también incluye los profármacos del mismo.

Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo, un éster metabólicamente lábil fisiológicamente aceptable). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) se escinde para dar el fármaco activo. Dichos ésteres pueden formarse mediante esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos de ácido carboxílico (-C(=O)OH) en el compuesto precursor, con, cuando sea adecuado, antes de la protección de cualquier otro grupo reactivo presente en el compuesto precursor, seguido de desprotección, en caso necesario.

Asimismo, algunos profármacos se activan enzimáticamente para dar el compuesto activo o un compuesto que, tras su reacción química adicional, proporciona el compuesto activo (por ejemplo, como en ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado de glucósido o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

Síntesis químicas

El método de síntesis puede emplear grupos protectores, por ejemplo, grupos protectores de O, tales como grupos

conocidos como adecuados para proteger grupos hidroxilo primarios y/o secundarios, por ejemplo, los grupos protectores de O mencionados en "Protective Groups in Organic Chemistry", editado por J.W.F. McOmie, Plenum Press (1973) y "Protective Groups in Organic Synthesis", 3.^a edición, T. W. Greene y P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1999). Algunos grupos protectores de O preferidos incluyen grupos alquilcarbonilo y arilcarbonilo (por ejemplo, acilo, por ejemplo, benzoilo), grupos triarilmetilo (por ejemplo, trifenilmetilo (trilito) y dimetoxitritilo) y grupos sililo (por ejemplo, trialkilsililo, tal como trimetilsililo).

Inhibidores a base de ácido nucleico

Los inhibidores a base de ácido nucleico para la inhibición de IDH, por ejemplo, IDH1, pueden ser, por ejemplo, ARN bicatenario (ARNbc) que funciona, por ejemplo, mediante interferencia de ARN (mecanismo de iARN), un ARN antisentido o un microARN (miARN). En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico se une al ARNm diana e inhibe la producción de proteína a partir del mismo, por ejemplo, mediante escisión del ARNm diana.

15 *ARN bicatenario (ARNbc)*

Un inhibidor a base de ácido nucleico útil para reducir la función de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} es, por ejemplo, un ARNbc, tal como un ARNbc que actúa mediante un mecanismo de iARN. iARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN pequeños de interferencia (ARNpi). Se entiende que los ARNbc usados en el presente documento incluyen ARNpi. Normalmente, la inhibición de IDH, por ejemplo, IDH1, mediante ARNbc no desencadena la respuesta de interferón que resulta de la activación mediada por ARNbc de la proteína cinasa PKR y 2',5'-oligoadenilato sintetasa, dando como resultado una escisión no específica del ARNm por ribonucleasa L.

Los ARNbc que se dirigen a una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, una IDH1 o IDH2 de tipo silvestre o mutante, pueden estar sin modificar o químicamente modificados. El ARNbc puede sintetizarse químicamente, expresarse a partir de un vector o sintetizarse enzimáticamente. La invención también presenta diversas moléculas de ARNbc sintético químicamente modificado capaces de modular la expresión génica o la actividad de IDH1 o IDH2 en células mediante interferencia de ARN (iARN). El uso de ARNbc químicamente modificado mejora varias propiedades de las moléculas de ARNbc nativas, tal como mediante el aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo* y/o mediante captación celular mejorada.

Los ARNbc dirigidos a un ácido nucleico pueden estar compuestos de dos ARN separados o de una hebra de ARN, que se pliega para formar una estructura en horquilla. Los ARNbc en horquilla se citan normalmente como ARNhc.

Un ARNhc que se dirige a IDH, por ejemplo, un gen de IDH1 o IDH2 mutante o de tipo silvestre puede expresarse a partir de un vector, por ejemplo, vector vírico, tal como un vector lentivírico o adenovírico. En determinadas realizaciones, un ARNbc adecuado para inhibir la expresión de un gen IDH1 se identificará explorando una biblioteca de ARNpi, tal como una biblioteca de ARNpi adenovírica o lentivírica.

En una realización, un ARNbc que se dirige a IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 pares de bases de longitud (por ejemplo, aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) pares de bases de longitud. En otra realización, el ARNbc incluye extremos protuberantes de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2 o 3) nucleótidos. Por "protuberancia" se entiende que el extremo 3' de una hebra del ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra o viceversa. El ARNbc puede tener una protuberancia en uno o ambos extremos de la molécula de ARNbc. En algunas realizaciones, la protuberancia monocatenaria está ubicada en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido o, como alternativa, en el extremo 3' terminal de la hebra sentido. En algunas realizaciones, la protuberancia es una protuberancia de dinucleótido de TT o UU, por ejemplo, una protuberancia de dinucleótido de TT o UU. Por ejemplo, en una realización, el ARNbc incluye una hebra antisentido de 21 nucleótidos, una región dúplex de 19 pares de bases y un dinucleótido 3' terminal. En otra realización más, un ARNbc incluye un ácido nucleico dúplex donde ambos extremos son romos o como alternativa, donde uno de los extremos es romo.

En una realización, el ARNbc incluye una primera y una segunda hebra, teniendo cada hebra de aproximadamente 18 a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, la primera hebra del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente complementariedad respecto del ARN de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2, para que el ARNbc dirija la escisión directa del ARNm de IDH, por ejemplo, IDH1, mediante interferencia de ARN y la segunda hebra del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la primera hebra.

En una realización, un ARNbc que se dirige a un gen de IDH, por ejemplo, IDH1 o IDH2 puede estar dirigido a formas de tipo silvestre y mutantes del gen o puede dirigirse a diferentes isoformas alélicas del mismo gen. Por ejemplo, el ARNbc se dirigirá a una secuencia que es idéntica en dos o más de las diferentes isoformas.

En una realización, un ARNbc se dirigirá preferentemente o específicamente a una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D.

En una realización, un ARNbc se dirigirá preferentemente o específicamente a un mutante de IDH2-137^{neo}.

5 En una realización, un ARNbc que se dirige a un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, incluye una o más modificaciones químicas. Los ejemplos no limitantes de dichas modificaciones químicas incluyen, sin limitación, enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos de 2'-O-metilo, ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "acíclicos", nucleótidos de 5-C-metilo e incorporación terminal de un resto de glicerilo y/o abásico de desoxi invertido. Se ha demostrado que dichas modificaciones químicas preservan la actividad de iARN en las células mientras que al mismo tiempo, aumentan drásticamente la estabilidad en suero de estos compuestos. Además, se toleran bien una o más sustituciones de fosforotioato y se ha demostrado que confieren aumentos sustanciales en la estabilidad en suero para las construcciones de ARNbc modificadas.

15 En una realización, un ARNbc que se dirige a un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, incluye nucleótidos modificados, mientras que mantiene la capacidad para mediar la iARN. Los nucleótidos modificados pueden usarse para mejorar características *in vitro* o *in vivo*, tales como la estabilidad, actividad y/o biodisponibilidad. Por ejemplo, el ARNbc puede incluir nucleótidos modificados en forma de un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula. Como tal, el ARNbc puede incluir generalmente de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 100 % de nucleótidos modificados (por ejemplo, aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de nucleótidos modificados).

25 En algunas realizaciones, el ARNbc que se dirige a un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante tiene aproximadamente 21 nucleótidos de longitud. En otra realización, el ARNbc no contiene ningún ribonucleótido y en otra realización, el ARNbc incluye uno o más ribonucleótidos. En una realización, cada hebra de la molécula de ARNbc incluye independientemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos, en donde cada hebra incluye de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos que son complementarios a los nucleótidos de la otra hebra. En una realización, una de las hebras del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos o a una porción de la misma de un gen de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, y la segunda hebra del ARNbc incluye una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a la secuencia de nucleótidos de la IDH1 o IDH2 o una porción de la misma.

35 En una realización, el ARNbc dirigido a un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, incluye una región antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen de IDH1 o IDH2 o una porción del mismo y una región codificante que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a la secuencia de nucleótidos del gen de IDH1 o IDH2 o una porción del mismo. En una realización, la región antisentido y la región sentido incluyen independientemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos, donde la región antisentido incluye de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos que son complementarios a nucleótidos de la región codificante.

45 Como se usa en el presente documento, el término "ARNbc" pretende incluir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar la iARN específica de secuencia, tal como ARN pequeño de interferencia (ARNpi), ARN en horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido corto de interferencia, ácido nucleico corto de interferencia, oligonucleótido corto de interferencia modificado, ARNpi químicamente modificado, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt) y otros. Además, como se usa en el presente documento, el término "iARN" pretende incluir interferencia de ARN específica de secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición de la traducción o epigenética.

Inhibidores de IDH a base de ácido nucleico

55 En una realización, el inhibidor es un inhibidor a base de ácido nucleico, tal como un ARN bicatenario (ARNbc) o ARN antisentido que se dirige a un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D.

60 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico reduce o inhibe la expresión de una IDH1 que tenga un resto distinto de Gly en el resto 97, por ejemplo, que tiene Asp, Ser, Arg, Cys, Ala o Val en el resto 97, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 2). En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico reduce o inhibe la expresión de una enzima IDH1 que tiene Asp en el resto 97.

65 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNbc que se dirige a un ARNm que codifica un alelo de IDH1 descrito en el presente documento, por ejemplo, un alelo de IDH1 que tiene un resto distinto de Gly en el resto 97. *Por ejemplo*, el alelo puede tener Asp, Ser, Arg, Cys, Ala o Val en el resto 97, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 2).

En una realización, el alelo codifica una IDH1 que tiene Asp en el resto 97.

5 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNbc que se dirige a IDH1, por ejemplo, una IDH1 que tiene una A o C o T (o un nucleótido distinto de G) en la posición de nucleótido 289 o una A o T o C (o un nucleótido distinto de G) en la posición de nucleótido 290, por ejemplo, un alelo mutante que porta una mutación G289A o G289C o G289T o una mutación G290A o G290C o G290T de acuerdo con la secuencia de IDH1 de la SEQ ID NO: 9 (FIG. 2A).

10 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNbc que se dirige a IDH1, por ejemplo, una IDH1 que tiene una A en la posición de nucleótidos 289 o una C en la posición de nucleótidos 289 o una T en la posición de nucleótidos 289, de acuerdo con la secuencia de IDH1 de SEQ ID NO: 9.

15 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNbc que se dirige a IDH1, por ejemplo, una IDH1 que tiene una A en la posición de nucleótidos 290 o una C en la posición de nucleótidos 290 o una T en la posición de nucleótidos 290, de acuerdo con la secuencia de IDH1 de SEQ ID NO: 9.

20 En una realización, el ARNbc se dirige a una IDH1 que tiene un resto distinto de G, por ejemplo, una A o C o T, en la posición de nucleótidos 289 o un resto distinto de G, por ejemplo, una A o C o T en la posición 290 o un resto distinto de C, por ejemplo, A o G o T en la posición de nucleótidos 291 (por ejemplo, un mutante) y una IDH1 que tiene una G en la posición de nucleótidos 289 o una G en la posición de nucleótidos 290 o una C en la posición 291 (por ejemplo, una de tipo silvestre), por ejemplo, dirigiéndose a una región del ARNm de IDH1 que es idéntica entre los transcritos de tipo silvestre y mutantes. En otra realización más, el ARNbc se dirige a un mutante o polimorfismo particular (tal como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), pero no a un alelo de tipo silvestre. En este caso, el inhibidor a base de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, se dirige a la región de la IDH1 que contiene la mutación.

25 En algunas realizaciones, el inhibidor a base de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNbc, inhibe preferencial o específicamente el producto de un IDH1 mutante en comparación con el producto de un IDH1 de tipo silvestre. Por ejemplo, en una realización, un ARNbc se dirige a una región de un ARNm de IDH1 que porta la mutación (por ejemplo, una mutación G289A o G289C o G289T o G290A o G290C o G290T de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 (FIG. 2A).

30 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNbc que incluye una hebra sentido y una hebra antisentido que tiene una secuencia primaria presentada en las tablas 1-7. En otra realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido que incluye la totalidad o parte de una secuencia primaria presentada en las tablas 1-7 o que se dirige a la misma o sustancialmente a la misma región que un ARNbc de las tablas 1-7.

35 En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico se suministra al cerebro, por ejemplo, directamente al cerebro, por ejemplo, mediante administración intratecal o intraventricular. El inhibidor a base de ácido nucleico también puede administrarse a partir de un dispositivo implantable. En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico se administra por infusión usando, por ejemplo, un catéter y opcionalmente, una bomba.

Antisentido

45 Los inhibidores a base de ácido nucleico adecuados incluyen ácidos nucleicos antisentido. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que la inhibición antisentido normalmente se basa en la hibridación a base de formación de enlaces de hidrógeno de hebras o segmentos de oligonucleótidos, de tal forma una hebra o segmento se escinde, degrada o de otro modo se vuelve no operativa.

50 Un agente antisentido puede unirse a un ADN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. En algunas realizaciones, inhibe la replicación y la transcripción. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que un agente antisentido también puede funcionar inhibiendo la translocación de ADN diana, por ejemplo, a un sitio de traducción de proteína, la traducción de la proteína a partir del ARN, el corte y empalme del ARN para dar una o más especies de ARN y actividad catalítica o formación de complejos que implica el ARN.

55 Un agente antisentido puede tener una modificación química descrita anteriormente como adecuada para el ARNbc.

60 Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleótidos), por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases o de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS, por sus siglas en inglés) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos antisentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementario a su secuencia del ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido puede hibridarse específicamente cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para provocar una pérdida de utilidad y hay un grado de homología suficiente para evitar la unión no específica del

oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

5 La hibridación de oligonucleótidos antisentido con un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante, puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Sin desear quedar ligados a la teoría, se cree que las funciones del ARNm con las que se interfiere incluyen todas las funciones clave, tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de la proteína, la traducción de la proteína a partir del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y la actividad catalítica en que puede participar el ARN. La unión de proteínas específicas al ARN también puede interferirse mediante la hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARN.

15 Compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, por ejemplo, un ARN de IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. La región complementaria puede extenderse entre aproximadamente 8 y aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden incluir, por ejemplo, pirimidinas 5-sustituidas tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina y C5-propinil pirimidinas, tales como C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen N⁴-alquil (C₁-C₁₂) aminocitosinas y N⁴,N⁴-dialquil (C₁-C₁₂) aminocitosinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 5-aza-20 7-desazapurinas 7-sustituidas y 7-desazapurinas 7-sustituidas, tales como, por ejemplo, 7-yodo-7-desazapurinas, 7-ciano-7-desazapurinas, 7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Los ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-yodo-7-desazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-desazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-desazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-desazapurinas y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-desazapurinas. Además, las N⁶-alquil (C₁-C₁₂) aminopurinas y N⁶,N⁶-dialquil (C₁-C₁₂) aminopurinas, incluyendo N⁶-25 metilaminoadenina y N⁶,N⁶-dimetilaminoadenina, también son nucleobases modificadas adecuadas. De manera similar, otras purinas 6-sustituidas que incluyen, por ejemplo, 6-tioguanina pueden constituir nucleobases modificadas adecuadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina y 2-fluoroguanina. También son adecuados los derivados de cualquiera de las nucleobases modificadas anteriormente mencionadas. Los sustituyentes de cualquiera de los compuestos anteriores pueden incluir alquilo C₁-C₃₀, alquenilo C₂-C₃₀, alquinilo C₂-C₃₀, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo y similares.

MicroARN

35 En algunas realizaciones, el inhibidor a base de ácido nucleico adecuado para dirigirse a un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, mutante de IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, es un microARN (miARN). Un miARN es un ARN monocatenario que regula la expresión de ARNm diana ya sea mediante escisión de ARNm, represión/inhibición traduccional o silenciamiento heterocromático. El miARN es de 18 a 25 nucleótidos, normalmente de 21 a 23 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el miARN incluye modificaciones químicas, tales como una o más modificaciones descritas en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, un inhibidor a base de ácido nucleico que se dirige a IDH tiene complementariedad parcial (es decir, menos de un 100 % de complementariedad) con el ARNm diana de IDH1 o IDH2. Por ejemplo, la complementariedad parcial puede incluir diversos emparejamientos erróneos o nucleótidos con bases no emparejadas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más emparejamientos erróneos o nucleótidos con bases no emparejadas, tales como bultos de nucleótidos), que pueden dar como resultado bultos, bucles o protuberancias que resultan entre la hebra antisentido o la región antisentido del inhibidor a base de ácido nucleico y la molécula de ácido nucleico diana correspondiente.

50 Los inhibidores a base de ácido nucleico descritos en el presente documento, por ejemplo, el ácido nucleico antisentido descrito en el presente documento, puede incorporarse en una construcción génica para su uso como parte de un protocolo de terapia génica para administrar ácidos nucleicos que pueden usarse para expresar y producir agentes en las células. Las construcciones de expresión de dichos componentes pueden administrarse en cualquier vehículo biológicamente eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen componente a las células *in vivo*. Las estrategias incluyen la inserción del presente gen en vectores víricos, incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus y virus del herpes simple 1 o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores víricos transfectan directamente a las células; el ADN plasmídico puede administrarse con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectin) o conjugados de polilisina derivatizados (por ejemplo, conjugados con anticuerpos), gramacidina S, envueltas víricas artificiales u otros portadores intracelulares de este tipo, así como la inyección directa de la construcción génica o precipitación con CaPO₄ llevada a cabo *in vivo*.

65 En una realización, la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula incluye el uso de un vector vírico que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana puede recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas en el vector vírico, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector vírico, se expresan eficazmente en células que han captado el

ácido nucleico del vector vírico.

Pueden usarse vectores retrovíricos y vectores de virus adenoasociado como sistema de suministro génico recombinante para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, en particular en seres humanos. Estos vectores proporcionan una administración eficaz de genes en las células y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del hospedador. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) Greene Publishing Associates (1989), secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales. Los ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de líneas de virus empacadoras adecuadas para preparar sistemas retrovíricos ecotrópicos y anfotrópicos incluyen Crip, Cre, 2 y Am. Se han usado retrovirus para introducir diversos genes en muchos tipos celulares diferentes, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis *et al.* (1985) Science 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464; Wilson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury *et al.* (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644; Kay *et al.* (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu *et al.* (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; Patentes de los Estados Unidos n.º 4.868.116 y 4.980.286; Publicaciones PCT n.º WO 89/07136, WO 89/02468, WO 89/05345 y WO 92/07573).

Otro sistema de administración de genes víricos utiliza vectores derivados de adenovirus. Véase, por ejemplo, Berkner *et al.* (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld *et al.* (1991) Science 252:431-434; y Rosenfeld *et al.* (1992) Cell 68:143-155. Los vectores adenovíricos adecuados procedentes del adenovirus cepa Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (por ejemplo, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son conocidos por los expertos en la materia.

Otro sistema de vector vírico adicional útil para el suministro del presente gen es el virus adenoasociado (AAV). Véase, por ejemplo, Flotte *et al.* (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski *et al.* (1989) J. Virol. 63:3822-3828; y McLaughlin *et al.* (1989) J. Virol. 62:1963-1973.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones delineadas en el presente documento incluyen los compuestos delineados en el presente documento, así como agentes terapéuticos adicionales si estuvieran presentes, en cantidades eficaces para lograr una modulación de la enfermedad o síntomas de la enfermedad, incluyendo los descritos en el presente documento.

La expresión "vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o adyuvante que pueda administrarse a un paciente, junto con un compuesto de la presente invención y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y que no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para suministrar una cantidad terapéutica del compuesto.

Los portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de suministro de fármacos autoemulsionantes (SEDDS, de sus siglas en inglés) tales como succinato de D- α -tocoferol polietilenglicol 1000, tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéutica como Tweens u otras matrices de suministro poliméricas similares, proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. Ciclodextrinas tales como α -, β - y γ -ciclodextrina o derivados químicamente modificados, tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2- y 3-hidroxipropil- β -ciclodextrinas u otros derivados solubilizados también pueden usarse ventajosamente para mejorar el suministro de compuestos de las fórmulas descritas en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas que contienen inhibidores de IDH1 o IDH2, pueden administrarse directamente al sistema nervioso central, tal como al líquido cefalorraquídeo o al cerebro. El suministro puede ser, por ejemplo, en una inyección en embolada o mediante una bomba de infusión continua. En determinadas realizaciones, la administración es mediante administración intratecal o mediante inyección intraventricular directamente al cerebro. Para la administración, puede usarse un catéter y opcionalmente una bomba. Los inhibidores pueden administrarse y liberarse a partir de un dispositivo implantable, por ejemplo, un dispositivo que se implanta en asociación con la extracción quirúrgica de tejido tumoral. Por ejemplo, para la administración al cerebro, el suministro puede ser análogo al usado con Gliadel, una oblea de biopolímero diseñada para suministrar carmustina directamente a la cavidad quirúrgica creada cuando se extirpa un tumor cerebral. La oblea de Gliadel se disuelve lentamente y suministra carmustina.

Los agentes terapéuticos divulgados en el presente documento, por ejemplo, inhibidores a base de ácido nucleico, por ejemplo, ARNpi, pueden administrarse directamente al SNC, por ejemplo, el cerebro, por ejemplo, usando un sistema

de bomba y/o catéter. En una realización, la bomba se implanta debajo de la piel. En una realización, se inserta un catéter acoplado a una bomba en el SNC, por ejemplo, en el cerebro o la médula espinal. En una realización, la bomba (tal como la bomba para fármacos IsoMed de Medtronic) administra la dosificación, por ejemplo, dosificación constante, de un inhibidor a base de ácido nucleico. En una realización, la bomba es programable para administrar dosis variables o constantes a intervalos de tiempo predeterminados. Por ejemplo, la bomba para fármacos IsoMed de Medtronic (o un dispositivo similar) puede usarse para administrar un suministro constante del inhibidor o puede usarse la bomba para fármacos SynchroMedII (o un dispositivo similar) para administrar una pauta posológica variable.

Pueden usarse los métodos y dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos 7.044.932, 6.620.151, 6.283.949 y 6.685.452.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por medio de un depósito implantado, preferentemente por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener cualquier transportador, adyuvante o vehículo no tóxico convencional farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, puede ajustarse el pH de la formulación con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para potenciar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de suministro. El término parenteral, cuando se usa en el presente documento, incluye inyección o técnicas de infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, normalmente se emplean aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables, tales como emulsiones y/o suspensiones. Otros tensioactivos comúnmente usados, tales como Tween o Span y/u otros agentes emulsionantes similares o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras farmacéuticamente aceptables también pueden usarse con fines de formulación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz deshidratado. Cuando las suspensiones y/o emulsiones se administran por vía oral, el principio activo que puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa se combina con agentes de emulsión y/o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse algunos agentes endulzantes y/o aromatizantes y/o colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Estas composiciones se pueden preparar mezclando un compuesto de la presente invención con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura del recto y, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar los compuestos activos. Dichos materiales incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

La administración tópica de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es útil cuando el tratamiento deseado implica áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica. Para la aplicación tópica a la piel, la composición farmacéutica debe formularse con una pomada adecuada que contenga los compuestos activos suspendidos o disueltos en un vehículo. Los vehículos para administración tópica de los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina filante, propilenglicol, compuestos de polioxipropileno polioxietileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contenga el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo con agentes emulsionantes adecuados. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, ésteres cetílicos de cera, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden aplicarse tópicamente al tracto intestinal inferior mediante una formulación de supositorio rectal o en una formulación de enema adecuada. Los parches tópicos-transdérmicos también se incluyen en la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la especialidad de formulación farmacéutica y pueden prepararse en forma de soluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la materia.

Cuando las composiciones de la presente invención comprenden una combinación de un compuesto de las fórmulas descritas en el presente documento y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional se encontrarían presentes a niveles de dosis de entre aproximadamente el 1 al 100 % y más preferentemente entre aproximadamente el 5 al 95 % de la dosis normalmente administrada en un régimen de monoterapia. Los agentes adicionales pueden administrarse por separado, como parte de un régimen de dosificación múltiple, de los compuestos de la presente invención. Como alternativa, esos agentes pueden ser parte de una forma farmacéutica única, mezclados junto con los compuestos de la presente invención en una única composición.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden, por ejemplo, administrarse por inyección, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía subdérmica, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular o subcutánea; o por vía oral, bucal, nasal, transmucosa, tópica, en una preparación oftálmica o por inhalación, con una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, como alternativa, dosis de entre 1 mg y 1000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas o de acuerdo con los requisitos del fármaco en particular. Los métodos en el presente documento contemplan la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición de compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces al día o como alternativa, como una infusión continua. Dicha administración se puede utilizar como terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una forma farmacéutica única variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 95 % de compuesto activo (p/p). Como alternativa, dichas preparaciones contienen de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 80 % de compuesto activo.

Pueden ser necesarias dosis menores o mayores que las citadas anteriormente. La dosificación y los regímenes de tratamiento específicos para cualquier paciente concreto dependerán de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y la evolución de la enfermedad, afección o síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, afección o síntomas y el juicio del médico tratante.

Tras la mejora del estado de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de la presente invención, en caso necesario. Posteriormente, puede reducirse la dosis o la frecuencia de administración o ambas, en función de los síntomas, hasta un nivel en el cual se mantiene el estado mejorado cuando los síntomas se han aliviado hasta el nivel deseado. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente a largo plazo tras cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Kits

Un compuesto descrito en el presente documento puede proporcionarse en un kit.

En una realización, el kit incluye (a) un compuesto descrito en el presente documento, por ejemplo, una composición que incluye un compuesto descrito en el presente documento (en donde, por ejemplo, el compuesto puede ser un inhibidor descrito en el presente documento) y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, comercial u otro material relacionado con los métodos descritos en el presente documento y/o el uso de un compuesto descrito en el presente documento para los métodos descritos en el presente documento.

En una realización, el kit proporciona materiales para evaluar a un sujeto. La evaluación puede ser, por ejemplo, para: identificar a un sujeto que tiene niveles no deseados (por ejemplo, mayores que los presentes en células normales o de tipo silvestre) de cualquiera de 2HG, neoactividad de 2HG o proteína IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG (o el ARN correspondiente) o que tiene una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, caracterizada por neoactividad de 2HG; diagnosticar, pronosticar o determinar el estado de, un sujeto, por ejemplo, basándose en que tiene niveles no deseados de 2HG, neoactividad de 2HG o de una proteína IDH1-97^{neo} mutante por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG (o el ARN correspondiente) o que tiene una mutación de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, caracterizada por neoactividad de 2HG; seleccionar un tratamiento para o evaluar la eficacia de, un tratamiento, por ejemplo, basándose en que el sujeto tiene niveles no deseados de 2HG, neoactividad de 2HG o una proteína IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG (o el ARN correspondiente) o que tiene una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, caracterizada por neoactividad de 2HG. El kit puede incluir uno o más reactivos útiles en la evaluación, por ejemplo, reactivos mencionados en otras partes del presente documento. Puede incluirse un reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo u otro reactivo de unión específico.

Pueden incluirse patrones o muestras de referencia, por ejemplo, un patrón de control positivo o negativo. *Por ejemplo*, en caso de que la evaluación se base en la presencia de 2HG, el kit puede incluir un reactivo, por ejemplo, patrones de control positivo o negativo para un ensayo, por ejemplo, un ensayo de CL-EM. En caso de que la evaluación se base en la presencia de neoactividad de 2HG, el kit puede incluir un reactivo, por ejemplo, uno o más de los mencionados en otras partes del presente documento, para evaluar la neoactividad de 2HG. En caso de que la evaluación se base en la secuenciación, el kit puede incluir cebadores u otros materiales útiles para secuenciar los ácidos nucleicos relevantes. Por ejemplo, el kit puede contener un reactivo que posibilita cuestionar la identidad, es decir, la secuenciación de, el resto 97 de IDH1 para determinar si está presente un mutante de IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D, o el resto 137 de IDH2 para determinar si está presente un mutante de IDH2-137^{neo}. El kit puede incluir ácidos nucleicos, por ejemplo, un oligómero, por ejemplo, cebadores, que permiten la secuenciación de los nucleótidos que codifican el resto 97 de IDH1 o 137 de IDH2. En una realización, el kit incluye un ácido nucleico cuya hibridación o capacidad para ser amplificado, es dependiente de la identidad del resto 97 de IDH1 o del resto 137 de IDH2. En otras realizaciones, el kit incluye un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo u otra molécula de unión específica, que puede identificar la presencia de una proteína IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante. Como se describe a continuación, un kit también puede incluir tampones, disolventes e información relacionada con la evaluación.

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

En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito en el presente documento de un modo adecuado para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en una dosis, forma farmacéutica o modo de administración adecuado (por ejemplo, una dosis, forma farmacéutica o modo de administración descrito en el presente documento). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito en el presente documento a un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, a un ser humano que tiene o que se encuentra en riesgo de tener un trastorno descrito en el presente documento.

El material informativo de los kits no está limitado en cuanto a su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona de manera impresa, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta o lámina impresa. Sin embargo, el material informativo también puede proporcionarse en otros formatos, tal como en Braille, material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustantiva acerca de un compuesto descrito en el presente documento y/o su uso en los métodos descritos en el presente documento. Obviamente, el material informativo también puede proporcionarse en cualquier combinación de formatos.

Además en un compuesto descrito en el presente documento, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un disolvente o tampón, un estabilizante, un conservante, un agente aromatizante (por ejemplo, un antagonista del sabor amargo o un edulcorante), una fragancia u otro ingrediente cosmético y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno descrito en el presente documento. Como alternativa, los otros ingredientes pueden incluirse en el kit, pero en diferentes composiciones o envases que un compuesto descrito en el presente documento. En dichas realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para mezclar un compuesto descrito en el presente documento y los otros ingredientes o para usar un compuesto descrito en el presente documento junto con los otros ingredientes.

Un compuesto descrito en el presente documento puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada. Es preferible que un compuesto descrito en el presente documento esté sustancialmente puro y/o sea estéril. Cuando se proporciona un compuesto descrito en el presente documento en una solución líquida, la solución líquida se encuentra preferentemente en una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Cuando se proporciona un compuesto descrito en el presente documento en una forma seca, la reconstitución es normalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua o tampón estéril, puede proporcionarse opcionalmente en el kit.

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene un compuesto descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes separados, divisores o compartimentos para la composición y material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos en un solo recipiente no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa al que se une el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de envases individuales, conteniendo cada uno una o más formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, una forma farmacéutica descrita en el presente documento) de un compuesto descrito en el presente documento. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio o blíster, conteniendo cada uno una sola dosis unitaria de un compuesto descrito en el presente documento. Los envases de los kits pueden ser herméticos, impermeables (por ejemplo, impermeables a los cambios en la

humedad o evaporación) y/o hermética a la luz.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalador, pipeta, pinzas, cuchara de medición, gotero (por ejemplo, gotero ocular), hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o un hisopo de madera) o cualquier dispositivo de suministro similar. En una realización, el dispositivo es un dispositivo de implante médico, por ejemplo, envasado para su inserción quirúrgica.

Terapias de combinación

En algunas realizaciones, un compuesto o composición descrita en el presente documento se administra junto con un tratamiento adicional contra el cáncer. Los tratamientos para el cáncer ejemplares incluyen, por ejemplo: cirugía, quimioterapia, terapias dirigidas, tales como terapias con anticuerpos, inmunoterapia y terapia hormonal. A continuación se proporcionan ejemplos de cada uno de estos tratamientos.

Quimioterapia

En algunas realizaciones, se administra un compuesto o composición descrito en el presente documento con una quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con fármacos que pueden destruir células cancerosas. "Quimioterapia" se refiere normalmente a fármacos citotóxicos que afectan en general a las células en rápida división, a diferencia de la terapia dirigida. Los fármacos de quimioterapia interfieren con la división celular de varias maneras posibles, por ejemplo, con la duplicación del ADN o la separación de cromosomas recién formados. La mayoría de formas de quimioterapia se dirigen a todas las células en rápida división y no son específicas para células cancerosas, aunque se puede obtener cierto grado de especificidad por la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar el daño en el ADN, mientras que las células normales generalmente pueden.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos utilizados en la terapia del cáncer incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, ácido fólico, purina y derivados de pirimidina) y agentes alquilantes (por ejemplo, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, platino, sulfonatos de alquilo, hidrazinas, triazenos, aziridinas, veneno del huso mitótico, agentes citotóxicos, inhibidores de topoisomerasa y otros). Los agentes ejemplares incluyen aclarrubicina, actinomicina, alitretinón, alretamina, aminopterina, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, trióxido arsénico, asparaginasa, atrasentán, belotecán, bexaroteno, endamustina, bleomicina, bortezomib, busulfán, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carbocina, carmofur, carmustina, celecoxib, clorambucilo, clormetina, cisplatino, cladribina, clofarabina, crisantaspasa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, demecolcina, docetaxel, doxorubicina, efaproxiral, elesclomol, elsamitrucina, enocitabina, epirubicina, estramustina, etoglúcido, etopósido, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo (5FU), fotemustina, gemcitabina, implantes de Gliadel, hidroxycarbamida, hidroxiiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, irofulveno, ixabepilona, larotaxel, leucovorina, doxorubicina liposomal, daunorrubicina liposomal, lonidamina, lomustina, lucantona, manosulfán, masoprocol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, aminolevulinato de metilo, mitobronitol, mitoguazona, mitotano, mitomicina, mitoxantrona, nedaplatino, nimustina, oblimersen, omacetaxina, ortataxel, oxaliplatino, paclitaxel, pegaspargasa, pemetrexed, pentostatina, pirarrubicina, pixantrona, plicamicina, porfímero sódico, prednimustina, procarbazona, raltitrexed, ranimustina, rubitecán, sapacitabina, semustina, ceradenovec sitimagén, estrataplato, estreptozocina, talaporfina, tegafur-uracilo, temoporfina, temozolomida, tenipósido, tesetaxel, testolactona, tetranitrato, tiotepa, tiazofurina, tioguanina, tipifarnib, topotecán, trabectedina, triazicuona, trietilenomelamina, triplato, tretinoína, treosulfán, trofosfamida, uramustina, valrubicina, verteporfina, vinblastina, vincristina, vindesina, vinflunina, vinorelbina, vorinostat, zorrubicina y otros agentes citostáticos o citotóxicos descritos en el presente documento.

Debido a que algunos fármacos funcionan mejor juntos que solos, a menudo se administran dos o más fármacos al mismo tiempo. A menudo, dos o más agentes de quimioterapia se utilizan como quimioterapia de combinación. En algunas realizaciones, los agentes de quimioterapia (incluyendo la quimioterapia de combinación) pueden usarse en combinación con un compuesto descrito en el presente documento, por ejemplo, fenformina.

Terapia dirigida

En algunas realizaciones, un compuesto o una composición descrita en el presente documento, se administra con una terapia dirigida. La terapia dirigida constituye la utilización de agentes específicos para las proteínas desreguladas de las células cancerosas. Los fármacos de terapia dirigida de molécula pequeña son generalmente inhibidores de los dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas o de otro modo críticas en la célula cancerosa. Son ejemplos destacados los inhibidores de tirosina cinasa, tales como axitinib, bosutinib, cediranib, dasatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, lestaurtinib, nilotinib, semaxanib, sorafenib, sunitinib y vandetanib y también los inhibidores de cinasa dependiente de ciclina, tales como alvociclib y seliciclib. La terapia con anticuerpos monoclonales es otra estrategia en la que el agente terapéutico es un anticuerpo que se une específicamente a una proteína en la superficie de las células cancerosas. Los ejemplos incluyen el anticuerpo anti-HER2/neu trastuzumab (HERCEPTIN®) que se usa normalmente en el cáncer de mama, y el anticuerpo anti-CD20 rituximab y Tositumomab que se usan normalmente en una variedad de tumores malignos de linfocitos B. Otros anticuerpos ejemplares incluyen cetuximab, panitumumab, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, edrecolomab y gemtuzumab. Las proteínas de fusión ejemplares incluyen

aflibercept y denileukin difitox. En algunas realizaciones, la terapia dirigida se puede utilizar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento, por ejemplo, una biguanida, tal como metformina o fenformina, preferentemente fenformina.

- 5 La terapia dirigida también puede implicar pequeños péptidos como "dispositivos de orientación" que se pueden unir a los receptores de la superficie celular o a la matriz extracelular afectada que rodea el tumor. Los radionúclidos que se unen a estos péptidos (por ejemplo, RGD) acaban eliminando a la célula cancerosa en caso de que el núcleo se desintegre en la proximidad de la célula. Un ejemplo de dicha terapia incluye BEXXAR®.

10 *Inmunoterapia*

En algunas realizaciones, se administra un compuesto o composición descrito en el presente documento con una inmunoterapia. La inmunoterapia para el cáncer se refiere a un conjunto diverso de estrategias terapéuticas diseñadas para inducir al sistema inmunitario del propio paciente para que combata el tumor. Los métodos contemporáneos para generar una respuesta inmunitaria contra tumores incluyen inmunoterapia de BCG intravesicular para el cáncer de vejiga superficial y el uso de interferones y otras citocinas para inducir una respuesta inmunitaria en pacientes con carcinoma de células renales y con melanoma.

20 El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas se puede considerar una forma de inmunoterapia, ya que las células inmunitarias del donante normalmente atacarán al tumor en un efecto de injerto contra tumor. En algunas realizaciones, los agentes de inmunoterapia se pueden utilizar en combinación con un compuesto o composición descrita en el presente documento.

25 *Terapia hormonal*

En algunas realizaciones, un compuesto o una composición descrita en el presente documento, se administra con una terapia hormonal. El crecimiento de algunos tipos de cáncer se puede inhibir proporcionando o bloqueando ciertas hormonas. Los ejemplos comunes de tumores sensibles a hormonas incluyen determinados tipos de cáncer de mama y próstata. Eliminar o bloquear el estrógeno o la testosterona es a menudo un tratamiento adicional importante. En determinados cánceres, la administración de agonistas hormonales, como los progestágenos, puede ser terapéuticamente beneficiosa. En algunas realizaciones, los agentes de terapia hormonal se pueden utilizar en combinación con un compuesto o una composición descrita en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, un compuesto o una composición descrita en el presente documento, se administra junto con un tratamiento adicional contra el cáncer (por ejemplo, eliminación quirúrgica), en el tratamiento de un cáncer del sistema nervioso, por ejemplo, cáncer del sistema nervioso central, por ejemplo, tumor cerebral, por ejemplo, glioma, por ejemplo, glioblastoma multiforme (GBM).

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

45 La temozolomida es un agente alquilante activo por vía oral que se usa para personas recién diagnosticadas con glioblastoma multiforme. Se aprobó por la Administración para Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) en marzo de 2005. Varios estudios han demostrado que el fármaco se tolera bien y proporciona un beneficio de supervivencia. La temozolomida adyuvante y concomitante con radiación se asoció con mejoras significativas en la mediana de la supervivencia libre de progresión frente a solo radiación (6,9 frente a 5 meses), la supervivencia general (14,6 frente a 12,1 meses) y la probabilidad de seguir vivo a los 2 años (26 % frente a 10 %).

50 Nitrosoureas: Las obleas de BCNU (carmustina)-polímero (Gliadel) fueron aprobadas por la FDA en 2002. Aunque las obleas de Gliadel se usan por algunos para el tratamiento inicial, han mostrado un aumento tan solo modesto en la mediana de la supervivencia frente al placebo (13,8 frente a 11,6 meses) en el mayor ensayo de fase II de este tipo y se asocian con tasas aumentadas de filtraciones de CSF y aumento de la presión intracraneal secundaria a edema y efecto de masa.

55 MGMT es una enzima de reparación de ADN que contribuye a la resistencia a la temozolomida. La metilación del promotor de MGMT, observada en aproximadamente un 45 % de los glioblastomas multiformes, da como resultado un silenciamiento epigenético del gen, reduciendo la capacidad de la célula para reparar el ADN y aumentando la susceptibilidad a la temozolomida.

60 Cuando se trató con temozolomida a pacientes con y sin metilación del promotor de MGMT, los grupos tuvieron medianas de supervivencia de 21,7 frente a 12,7 meses y tasas de supervivencia a los 2 años del 46 % frente al 13,8 %, respectivamente.

65 Aunque la temozolomida es en la actualidad un agente de primera línea en el tratamiento del glioblastoma multiforme, un estado de metilación de MGMT desfavorable puede ayudar a seleccionar pacientes adecuados para futuras

investigaciones terapéuticas.

5 La O6-bencilguanina y otros inhibidores de MGMT, así como el silenciamiento mediado por interferencia de ARN de MGMT ofrecen vías prometedoras para aumentar la eficacia de la temozolomida y otros agentes antineoplásicos alquilantes y dichos agentes se encuentran en estudio activo.

10 La carmustina (BCNU) y el cisplatino han sido los principales agentes quimioterapéuticos usados contra gliomas malignos. Todos los agentes en uso tienen una tasa de respuesta de no más de un 30-40 % y la mayoría se encuentran en el intervalo del 10-20 %.

15 Datos de la University of California at San Francisco indican que, para el tratamiento de glioblastomas, la cirugía seguida de radioterapia da lugar a tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años del 44 %, 6 % y 0 %, respectivamente. En comparación, la cirugía seguida de radiación y quimioterapia usando regímenes a base de nitrosourea dieron como resultado tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años del 46 %, 18 % y 18 %, respectivamente.

20 Un importante impedimento para el uso de agentes quimioterapéuticos para tumores cerebrales es el hecho de que la barrera hematoencefálica (BBB) excluye eficazmente a muchos agentes del SNC. Por este motivo, se están desarrollando nuevos métodos de administración intracraneal de fármacos para suministrar mayores concentraciones de agentes quimioterapéuticos a las células tumorales, a la vez que se evitan los efectos sistémicos adversos de estas medicaciones.

25 La infusión impulsada por presión de agentes quimioterapéuticos mediante un catéter intracraneal, también conocida como suministro potenciado por convección (CED), tiene la ventaja de suministrar fármacos a lo largo de un gradiente de presión en lugar de por simple difusión. La CED ha mostrado resultados prometedores en modelos animales con agentes que incluyen BCNU y topotecán.

Los intentos iniciales investigaron el suministro de agentes quimioterapéuticos por una vía intraarterial en lugar de intravenosa. Desafortunadamente, no se observó una ventaja de supervivencia.

30 La quimioterapia para el glioblastoma multiforme recurrente proporciona beneficios modestos o nulos y se usan varias clases de agentes. Las obleas de carmustina aumentaron la supervivencia a los 6 meses, del 36 % al 56 % frente al placebo en un estudio aleatorizado de 222 pacientes, aunque hubo una asociación significativa entre el grupo de tratamiento e infecciones intracraneales graves.

35 El genotipado de los tumores cerebrales puede tener aplicaciones para estratificar pacientes para ensayos clínicos de varias terapias novedosas.

40 El agente antiangiogénico bevacizumab, cuando se usó con irinotecán, mejoró la supervivencia a los 6 meses en pacientes con glioma recurrente hasta el 46 % en comparación con el 21 % en pacientes tratados con temozolomida. Esta combinación de bevacizumab e irinotecán para el glioblastoma multiforme recurrente ha mostrado mejorar la supervivencia frente a solo bevacizumab. Los agentes antiangiogénicos también reducen el edema peritumoral, reduciendo potencialmente la dosis de corticosteroides necesaria.

45 Algunos glioblastomas responden a gefitinib o erlotinib (inhibidores de tirosina cinasa). La presencia simultánea en las células de glioblastoma de EGFR mutante (EGFR^{viii}) y PTEN se asoció con la sensibilidad a los inhibidores de tirosina cinasa, mientras que p-akt aumentada predice un efecto reducido. Otras dianas incluyen PDGFR, VEGFR, mTOR, farnesiltransferasa y PI3K.

50 Otras posibles modalidades de terapia incluyen imatinib, terapia génica, vacunas peptídicas y de células dendríticas, clorotoxinas sintéticas y fármacos y anticuerpos radiomarcados.

Selección/monitorización de pacientes

55 En el presente documento se describen métodos de tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, cáncer, en un sujeto y métodos para identificar a un sujeto para un tratamiento descrito en el presente documento. Asimismo, en el presente documento se describen métodos para predecir a un sujeto que se encuentre en riesgo de desarrollar un cáncer caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. En general, el cáncer se caracteriza por la presencia de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. El sujeto puede seleccionarse basándose en que tenga una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Como se usa en el presente documento, "seleccionar" significa seleccionar total o parcialmente basándose en esto.

65 En algunas realizaciones, se selecciona al sujeto para el tratamiento con un compuesto descrito en el presente documento basándose en la determinación de que el sujeto tiene una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, mutante. En algunas realizaciones, el paciente se selecciona basándose en que tiene neoactividad de

IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. La neoactividad de la enzima puede identificarse, por ejemplo, evaluando al sujeto o una muestra (por ejemplo, tejido o fluido temporal) del mismo, respecto de la presencia o cantidad de un sustrato, cofactor y/o producto de la enzima. La presencia y/o cantidad de sustrato, cofactor y/o producto puede corresponder a la actividad de tipo silvestre/no mutante o puede corresponder a la neoactividad de la enzima. El fluido corporal ejemplar que puede usarse para identificar (por ejemplo, evaluar) la neoactividad de la enzima incluye el fluido amniótico que rodea a un feto, humor acuoso, sangre (por ejemplo, plasma sanguíneo), líquido cefalorraquídeo, cerumen, quimo, fluido de Cowper, eyaculación femenina, líquido intersticial, linfa, leche materna, moco (por ejemplo, drenaje nasal o flema), líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, lágrimas, orina, secreción vaginal, materia fecal o vómito.

En algunas realizaciones, puede evaluarse en un sujeto la neoactividad de una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo} mutante usando resonancia magnética. Por ejemplo, cuando la neoactividad es la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxi-glutarato, puede evaluarse en el sujeto la presencia y/o una cantidad elevada de 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato en relación con la cantidad de 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato presente en un sujeto que no tiene una mutación en IDH1 que tiene la neoactividad anterior. En algunas realizaciones, la neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, puede determinarse por la presencia o la cantidad elevada de un pico correspondiente a 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato determinada mediante resonancia magnética. Por ejemplo, puede evaluarse en un sujeto la presencia y/o la fuerza de una señal a aproximadamente 2,5 ppm para determinar la presencia y/o la cantidad de 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato en el sujeto. Esto puede estar correlacionado con y/o ser predictivo de una neoactividad descrita en el presente documento para la enzima IDH mutante. De manera similar, la presencia, la fuerza y/o ausencia de una señal a aproximadamente 2,5 ppm puede ser predictiva de una respuesta al tratamiento y por tanto usarse como biomarcador no invasivo para la respuesta clínica.

La neoactividad de una enzima IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, mutante también puede evaluarse usando otras técnicas conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, puede medirse la presencia o la cantidad de un sustrato, cofactor y/o producto de reacción marcado, tal como un sustrato, cofactor y/o producto de reacción marcado con ¹³C o ¹⁴C. La neoactividad puede evaluarse analizando la reacción directa de la enzima de tipo silvestre/no mutante (tal como la descarboxilación oxidativa del isocitrato en α -cetoglutarato en una enzima IDH1 mutante) y/o la reacción correspondiente a la neoactividad (por ejemplo, la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxi-glutarato, por ejemplo, R-2-hidroxi-glutarato en una enzima IDH1 mutante).

Trastornos

Los métodos relacionados con IDH1 divulgados en el presente documento, por ejemplo, métodos para evaluar o tratar sujetos, se refieren a sujetos que tienen un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una IDH1-97^{neo} mutante, por ejemplo, una IDH1-G97D mutante o IDH2-137^{neo} mutante, que tiene, por ejemplo, neoactividad de 2HG. Por ejemplo, se ha demostrado que las líneas celulares de cáncer procedentes de un cáncer de colon se caracterizan por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Otras, por ejemplo, las listadas a continuación, pueden analizarse, por ejemplo, secuenciando muestras celulares para determinar la presencia de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se espera que una parte de los tumores de un tipo de cáncer dado tenga una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, que tiene neoactividad de 2HG.

Los métodos divulgados son útiles para evaluar o tratar trastornos proliferativos, por ejemplo, evaluar o tratar tumores sólidos, tumores de tejidos sólidos y metástasis de los mismos, en donde el tumor sólido, el tumor de tejido blando o la metástasis del mismo es un cáncer descrito en el presente documento. Los tumores sólidos ejemplares incluyen neoplasias malignas (por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas) de los diversos sistemas de órganos, tales como aquellos de cerebro, de pulmón, mama, linfoides, tracto gastrointestinal (por ejemplo, colon) y genitourinario (por ejemplo, tumores renales, uroteliales o testiculares), faringe, próstata y ovario. Los adenocarcinomas ejemplares incluyen cánceres colorrectales, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma de pulmón no microcítico y cáncer de intestino delgado. Los métodos divulgados también son útiles para evaluar o tratar cánceres no sólidos.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse con cualquier cáncer, por ejemplo, los descritos en el presente documento, incluyendo glioma, AML, ALL (por ejemplo, B-ALL o T-ALL), cáncer próstata o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, cáncer de tiroides, tal como cáncer folicular de tiroides, fibrosarcoma, paraganglioma, melanoma, neoplasias mieloproliferativas, tales como CML o cáncer colorrectal. También pueden tratarse o prevenirse las metástasis de los cánceres anteriormente mencionados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles en el tratamiento de cáncer en el sistema nervioso, por ejemplo, tumor cerebral, por ejemplo, glioma, por ejemplo, glioblastoma multiforme (GBM), por ejemplo, inhibiendo una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D.

Los gliomas, un tipo de tumores cerebrales, se pueden clasificar de grado I a grado IV según los criterios histopatológicos y clínicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los gliomas de grado I de la

OMS a menudo se consideran benignos. Los gliomas de grado II o III de la OMS son invasivos, progresan a lesiones de mayor grado. Los tumores de grado IV de la OMS (glioblastomas) son la forma más invasiva. Los tumores cerebrales ejemplares incluyen, por ejemplo, tumor astrocítico (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma subependimario de células gigantes, astrocitoma difuso, xantoastrocitoma pleomórfico, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, glioblastoma de células gigantes, glioblastoma, glioblastoma secundario, glioblastoma primario en adultos, y glioblastoma pediátrico primario); tumor oligodendroglial (por ejemplo, oligodendroglioma y oligodendroglioma anaplásico); tumor oligoastrocítico (por ejemplo, oligoastrocitoma y oligoastrocitoma anaplásico); ependimoma (*por ejemplo*, ependimoma mixopapilar y ependimoma anaplásico); meduloblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo, schwannoma, meningioma, meningioma meatípico, meningioma anaplásico; y adenoma hipofisario. Se describen cánceres ejemplares en Acta Neuropathol (2008) 116: 597-602 y N Engl J Med. 19 de febrero de 2009;360(8):765-73.

En algunas realizaciones, el trastorno es glioblastoma.

En una realización, el trastorno es cáncer de próstata caracterizado por una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, una mutación IDH1-G97D o IDH2-137^{neo}, por ejemplo, estadio T1 (por ejemplo, T1a, T1b y T1c), T2 (por ejemplo, T2a, T2b y T2c), T3 (por ejemplo, T3a y T3b) y T4, en el sistema de estadificación TNM. En realizaciones, el cáncer de próstata es de grado G1, G2, G3 o G4 (donde un número más alto indica una mayor diferencia con el tejido normal). Los tipos de cáncer de próstata incluyen, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata, carcinoma microcítico, carcinoma escamoso, sarcomas y carcinoma de células transicionales.

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

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar el cáncer de colon, por ejemplo, inhibiendo una neoactividad de una mutación IDH1-97^{neo}, por ejemplo, IDH1-G97D. Los tipos de cáncer de colon incluyen adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma, melanoma y tumores neuroendocrinos.

Los métodos y composiciones de la invención pueden combinarse con un tratamiento conocido en la técnica. El tratamiento conocido en la técnica para el cáncer de colon puede incluir cirugía, quimioterapia, radioterapia y/o terapia dirigida.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de IDH1, mutagénesis, expresión y purificación

1. Se clonó IDH1 de tipo silvestre en pET41a, creando un marcador de His8 en el extremo C-terminal.

Se adquirió la región codificante del gen IDH1 (ADNc) de Invitrogen en el vector pENTR221 (www.invitrogen.com, n.º de Cat B-068487_Ultimate_ORF). Los oligonucleótidos se diseñaron para extraer mediante la PCR la región codificante de IDH1 con NdeI en el extremo 5' y XhoI en el 3'. (IDH1-f: TAATCATATGTCCAAAAAATCAGT (SEQ ID NO: 1), IDH1-r: TAATCTCGAGTGAAAGTTTGGCTGAGCTAGTT (SEQ ID NO: 2)). El producto de la PCR se clona en el vector pET41a escindido con NdeI/XhoI. La escisión con NdeI/XhoI del vector pET41a libera la porción de GST del plásmido y crea un marcador His8 C-terminal (SEQ ID NO: 3) sin la fusión de GST N-terminal. El codón de parada original de IDH1 se cambia a serina, de tal forma que la secuencia unida en la proteína IDH1 final es: Ser-Leu-Glu-His-His-His-His-His-His-Parada (SEQ ID NO: 4).

Se seleccionó la estrategia de marcador de His C-terminal en lugar del marcador de His N-terminal, debido a que el marcador C-terminal puede no tener un impacto negativo en el plegamiento o la actividad de la proteína IDH1. Véase, por ejemplo, Xu X *et al*, J Biol Chem. 6 de agosto de 2004; 279(32):33946-57.

La secuencia para el plásmido pET41a-IDH1 se confirma mediante secuenciación de ADN. La FIG. 1 muestra la verificación de secuencia detallada de ADN de pET41a-IDH1 y un alineamiento frente al CDS de IDH1 publicado a continuación.

2. Mutagénesis dirigida al sitio de IDH1 para crear el mutante IDH1-G97D.

Se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio para convertir el resto Gly97 en Asp de la proteína IDH1 usando los dos cebadores a continuación; Cebador 1: CAAATGTGGAAATCACCAAATGAC ACCATACGAAATATTCTGGG, Cebador 2: CCCAGAATATTTTCGTATGGTGTCAATTTGGTGATTTCCACATTTG. (SEQ ID NO:12) Se describe un método detallado para mutagénesis dirigida al sitio en el manual de usuario para el kit de mutagénesis dirigida a múltiples

sitios QuikChange® (Stratagene, n.º de cat. 200531). La secuenciación de ADN confirmó que el nucleótido G290 de GGC se había mutado a GAC, creando la mutación del resto 97Gly→Asp en la proteína IDH1.

3. Expresión y purificación de la proteína IDH1.

La proteína IDHts, IDH1-G97D se expresó en la cepa de *E. coli* Rosetta y se purificó de acuerdo con el procedimiento detallado a continuación. Las proteínas IDH1 activas se encuentran en forma de dímero y la fracción/pico de la columna de SEC que corresponde a la forma de dímero se recogió para análisis de enzimología y comparación cruzada de las actividades catalíticas de estas proteínas.

A. Cultivo celular:

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

B. Sistema de tampón:

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

Tampón A de la columna de Ni: Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10 %.

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

Tampón C de filtración en gel: NaCl 200 mM, Tris 50 mM, 7,5, β-mercaptoetanol 5 mM, MnSO₄ 2 mM, glicerol al 10 %.

C. Procedimiento de purificación de proteínas

1. Los sedimentos celulares se resuspendieron en el tampón de lisis (1 gramo de células/5-10 ml de tampón).
2. Las células se rompieron haciéndolas pasar 3 veces a través de un microfluidificador con una presión de 103,4 MPa (15.000 psi).
3. La proteína soluble se recogió del sobrenadante después de la centrifugación a 20.000 g (Beckman Avanti J-26XP) durante 30 min a 4 °C.
4. Se equilibró una columna de Ni de 5-10 ml con tampón A hasta que el valor de A280 alcanzó el valor de referencia. El sobrenadante se cargó en una columna de Ni-Sepharose de 5 ml (2 ml/min). La columna se lavó con 10-20 BC de tampón de lavado (tampón A al 90 % + tampón B al 10 %) hasta que la A280 alcanza el valor de referencia (2 ml/min).
5. La proteína se eluyó mediante un gradiente lineal de tampón B al 10-100 % (20 VC) con la siguiente velocidad de 2 ml/min y las fracciones de muestras se recogieron como 2 ml/tubo.
6. Las muestras se analizaron en un gel de SDS-PAGE.
7. Las muestras se recogieron y dializaron frente a tampón de filtración en gel 200x 2 veces (1 hora y > 4 horas).
8. Las muestras se concentraron hasta 10 ml.
9. Se equilibró una columna de filtración en gel S-200 de 200 ml con tampón C hasta que el valor de A280 alcanzó el valor de referencia. Las muestras se cargaron en una columna de filtración en gel (0,5 ml/min).
10. La columna se lavó con 10 VC de tampón C, las fracciones se recogen como 2-4 ml/tubo.
11. Las muestras se analizaron en un gel de SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína.

Ejemplo 2: IDH1-G97D oxidó el NADPH en presencia de alfa-cetoglutarato (alfaKG).

Se clonó una enzima isocitrato deshidrogenasa 1 que contiene la mutación G97D (IDH1-G97D), se expresó y se purificó como se ha descrito anteriormente. Se establecieron las reacciones enzimáticas y se siguió el progreso de la reacción mediante monitorización espectrofotométrica del estado de oxidación del NADPH a 340 nM. El mutante G97D demostró la neactividad de oxidar el NADPH en presencia de alfa-KG (FIG. 3). A partir de esta actividad, se determinaron las constantes de Michaelis de la reacción (FIG. 4A y 4B).

Métodos: Para determinar la eficiencia catalítica de las enzimas en la reducción del α-cetoglutarato (α-KG), se llevaron a cabo las reacciones para determinar la V_{máx} y K_m para α-KG. En estas reacciones, se varió el sustrato, mientras que el cofactor se mantuvo constante a 500 µM. Todas las reacciones se llevaron a cabo en tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 6,5, glicerol al 10 %, BSA al 0,03 % (p/v), MgCl₂ 5 mM e hidrocbonato de sodio 40 mM. Se siguió el progreso de la reacción mediante espectroscopía a 340 nM monitorizando el cambio en el estado de oxidación del cofactor. La reacción se llevó a cabo en un espectrofotómetro SFN-400 Stop Flow usando enzima suficiente para una reacción de 3 s.

Ejemplo 3. La oxidación de IDH1-G97D descrita de NADPH en presencia de alfaKG dio como resultado la reducción

de alfaKG en 2-hidroxiglutarato.

Se establecieron reacciones enzimáticas con o sin la adición de NaHCO₃ para suministrar una fuente de CO₂ y se ejecutaron hasta su compleción, valorada por una vuelta al valor de referencia de la DO₃₄₀. Las reacciones se extrajeron con acetonitrilo, se secaron y se resuspendieron en la fase móvil A antes de someterse a análisis CL-EM/EM (cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas) usando el método descrito. Se observó un solo pico correspondiente a la transición de la monitorización de reacción múltiple (MRM) y el tiempo de retención de 2-hidroxiglutarato (FIG. 5A y 5B). La presencia de 2-hidroxiglutarato no fue dependiente de NaHCO₃ y en ninguno de los dos casos se detectó alfaKG o isocitrato.

Métodos: Usando métodos experimentales convencionales, se configuró un espectrómetro de masas API2000 para la detección óptima de 2-hidroxiglutarato. Se investigó la presencia de 2-hidroxiglutarato en los productos de reacción de las reacciones de control y que contienen enzima anteriores. En la reacción de control, no se detectó 2-hidroxiglutarato, mientras que en la reacción que contenía G97D, se detectó 2-hidroxiglutarato. Estos datos confirman que una neoactividad del mutante de G97D es la reducción de α-KG en 2-hidroxiglutarato.

Ejemplo 4: Se evalúan los niveles de 2-hidroxiglutarato en líneas celulares que portan la mutación de IDH-1 G97D.

Cultivo celular. Se ha comunicado con anterioridad que las células HCT-15 y DLD-1 portan la mutación IDH1-G97D, mientras que las células HCT116 no tienen ninguna mutación en IDH1 (Bleeker *et al.*, 2009, Hum. Mutat. 2009, Ene; 30(1) 7-11).

Extracción de metabolitos. Las células se cultivaron en placas de cultivo tisular de 10 cm y el medio se reemplazó con medio fresco idéntico 1h antes de la extracción de metabolitos. Se cultivaron un millón de células durante dos días antes de recoger los lisados celulares para el análisis de metabolitos. Se inactivó el metabolismo y los metabolitos se extrajeron mediante la aspiración de medios y la adición inmediata de 1,6 ml de metanol:agua 80:20 a -80 °C y se transfirieron a un lecho enfriado con hielo para lisar simultáneamente las células e inactivar el metabolismo. Los restos celulares se rasparon de la placa de cultivo tisular y se transfirieron, junto con el metanol:agua, en un tubo cónico para centrifugación de 15 ml. La mezcla resultante se centrifugó a 14.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se movió a un nuevo tubo. Se combinó una porción de 50 µl del sobrenadante de extracción con 50 µl de tampón LC acuoso (tributilamina 10 mM, ácido acético 10 mM), se centrifugó a 13.000 x g durante 10 min para retirar cualquier residuo restante y se inyectaron 10 µl en el CL para el análisis por CL-EM, como se describe a continuación.

Mediciones de metabolitos de 2-hidroxiglutarato (2-HG) y de TCA mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas dirigida. Para medir los metabolitos asociados con células completas, se aspiró el medio y se recogieron las células como se ha descrito anteriormente. Se usó un método de separación de cromatografía líquida (CL) para separar metabolitos, acoplado mediante ionización de electropulverización negativa (IEN, -3,0 kV) a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo que funciona en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), con parámetros de EM optimizados en soluciones patrón de metabolitos infundidos. Los metabolitos se separaron mediante cromatografía en fase reversa usando tributilamina 10 mM como agente de emparejamiento de iones en la fase móvil acuosa, de acuerdo con una variante de un método anteriormente publicado (Luo *et al.*, "Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry" J. Chromatogr A 1147:153-64, 2007). El método permitió la resolución de los metabolitos de TCA: t = 0, B al 50 %; t = 5, B al 95 %; t = 7, B al 95 %; t = 8, B al 0 %, donde B se refiere a una fase móvil orgánica de metanol al 100%; la columna fue una Synergi Hydro-RP, 100 mm x 2 mm, tamaño de partícula de 2,1 µm (Phenomex). Los metabolitos se cuantificaron mediante la comparación de áreas de picos con patrones de metabolitos puros a concentraciones conocidas. Los datos y resultados se muestran en la tabla 8 y las FIG. 6 y 7.

Resultados. De manera más destacable, los niveles celulares de 2-HG son significativamente mayores en líneas celulares que portan la mutación G97D de IDH-1. También fue destacable que las líneas celulares con niveles elevados de 2-HG también mostraron niveles elevados de alfa-cetoglutarato.

Tabla 8. Concentraciones de metabolitos de TCA extraídos, comunicadas en ng/m.

	2-HG (ng/ml)	a-KG (ng/ml)	Succinato (ng/ml)	Fumarato (ng/ml)	Malato (ng/ml)	ISOCIT (ng/ml)	CIT (ng/ml)
2(HCT116P6)	94	231	7,297	926	515	384	1,071
3(HCT15)	1,215	398	8,258	1,493	829	511	1,308
4(DLD-1)	684	484	9,749	1,757	976	821	4,405

EJEMPLO 5: ARNpi

IDH1

Los ARNpi ejemplares se presentan en las siguientes tablas. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica para

5 seleccionar otros ARNpi. Los ARNpi pueden evaluarse, por ejemplo, determinando la capacidad de un ARNpi para silenciar una IDH, por ejemplo, IDH1, por ejemplo, en un sistema *in vitro*, por ejemplo, en células cultivadas, por ejemplo, células HeLa o células de glioma cultivadas. También pueden usarse ARNpi conocidos en la técnica para silenciar la diana, véase, por ejemplo, *Silencing of cytosolic NADP+ dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine*, Lee *et al.*, 2009, Free Radical Research, 43: 165-173.

10 Los ARNpi en las tablas 1-7 representan candidatos que abarcan el ARNm de IDH1 en las posiciones de nucleótidos 523, 524 y 525 de acuerdo con la secuencia de ARNm presentada en el n.º de referencia de GenBank NM_005896.2 (registro con fecha del 10 de mayo de 2009; GI28178824) (SEQ ID NO: 10, FIG. 2B); equivalente a las posiciones de nucleótidos 289, 290 y 291 de la secuencia de ADNc presentada en el n.º de referencia de GenBank NM_005896.2 (registro con fecha del 10 de mayo de 2009; GI28178824) (SEQ ID NO: 9, FIG. 2A).

15 Pueden modificarse los ARN en las tablas, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Las modificaciones incluyen modificaciones químicas para potenciar propiedades, tales como la resistencia a la degradación y el uso de protuberancias. Por ejemplo, una o ambas de las hebras sentido y antisentido en las tablas pueden incluir un dinucleótido adicional (por ejemplo, TT, UU, dTdT) en uno o ambos extremos, por ejemplo, en el extremo 3'.

20 **Tabla 1. ARNpi que se dirigen a IDH1 de tipo silvestre**

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUUGGC	13	GCCAUUUGGUGAUUCCAC	24
508	UGGAAAUCACCAAUUGGCA	15	UGCCAUUUGGUGAUUCCA	16
509	GGAAAUCACCAAUUGGCAC	17	GUGCCAUUUGGUGAUUCC	18
510	GAAAUACACCAAUUGGCACC	19	GGUGCCAUUUGGUGAUUUC	20
511	AAAUACACCAAUUGGCACCA	21	UGGUGCCAUUUGGUGAUUU	22
512	AAUACACCAAUUGGCACCAU	23	AUGGUGCCAUUUGGUGAUU	24
513	AUACACCAAUUGGCACCAUA	25	UAUGGUGCCAUUUGGUGAU	26
514	UCACCAAUUGGCACCAUAC	27	GUAUGGUGCCAUUUGGUGA	28
515	CACCAAUUGGCACCAUACG	29	CGUAUGGUGCCAUUUGGUG	30
516	ACCAAUUGGCACCAUACGA	31	UCGUAUGGUGCCAUUUGGU	32
517	CCAAUUGGCACCAUACGAA	33	UUCGUAUGGUGCCAUUUGG	34
518	CAAUUGGCACCAUACGAAA	35	UUUCGUAUGGUGCCAUUUG	36
519	AAUUGGCACCAUACGAAAU	37	AUUUCGUAUGGUGCCAUUU	38
520	AAUGGCACCAUACGAAUA	39	UAUUUCGUAUGGUGCCAUU	40
521	AUGGCACCAUACGAAUAU	41	AUAUUUCGUAUGGUGCCAU	42
522	UGGCACCAUACGAAUAUU	43	AAUAUUUCGUAUGGUGCCA	44
523	GGCACCAUACGAAUAUUC	45	GAAUAUUUCGUAUGGUGCC	46

Tabla 2. ARNpi que se dirigen al mutante de G289A de IDH1 (equivalente a G523A de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUAGC	47	GCUAUUUGGUGAUUCCAC	48
508	UGGAAAUCACCAAUAGCA	49	UGCUAUUUGGUGAUUCCA	50
509	GGAAAUCACCAAUAGCAC	51	GUGCUAUUUGGUGAUUCC	52

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
510	GAAAUCACCAAAUAGCACC	53	GGUGCUAUUUGGUGAUUUC	54
511	AAAUCACCAAAUAGCACCA	55	UGGUGCUAUUUGGUGAUUU	56
512	AAUCACCAAAUAGCACCAU	57	AUGGUGCUAUUUGGUGAUU	58
513	AUCACCAAAUAGCACCAUA	59	UAUGGUGCUAUUUGGUGAU	60
514	UCACCAAAUAGCACCAUAC	61	GUAUGGUGCUAUUUGGUGA	62
515	CACCAAAUAGCACCAUACG	63	CGUAUGGUGCUAUUUGGUG	64
516	ACCAAAUAGCACCAUACGA	65	UCGUAUGGUGCUAUUUGGU	66
517	CCAAAUAGCACCAUACGAA	67	UUCGUAUGGUGCUAUUUGG	68
518	CAAAUAGCACCAUACGAAA	69	UUUCGUAUGGUGCUAUUUG	70
519	AAUAGCACCAUACGAAAU	71	AUUUCGUAUGGUGCUAUUU	72
520	AAUAGCACCAUACGAAUA	73	UAUUUCGUAUGGUGCUAUU	74
521	AUAGCACCAUACGAAUAU	75	AUAUUUCGUAUGGUGCUAU	76
522	UAGCACCAUACGAAUAUU	77	AAUAUUUCGUAUGGUGCUA	78
523	AGCACCAUACGAAUAUUC	79	GAAUAUUUCGUAUGGUGCU	80

Tabla 3. ARNpi que se dirigen al mutante de G289C de IDH1 (equivalente a G523C de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAAUCGC	81	GCGAUUUGGUGAUUCCAC	82
508	UGGAAAUCACCAAAUCGCA	83	UGCGAUUUGGUGAUUCCA	84
509	GGAAAUCACCAAAUCGCAC	85	GUGCGAUUUGGUGAUUCC	86
510	GAAAUCACCAAAUCGCACC	87	GGUGCGAUUUGGUGAUUUC	88
511	AAAUCACCAAAUCGCACCA	89	UGGUGCGAUUUGGUGAUUU	90
512	AAUCACCAAAUCGCACCAU	91	AUGGUGCGAUUUGGUGAUU	92
513	AUCACCAAAUCGCACCAUA	93	UAUGGUGCGAUUUGGUGAU	94
514	UCACCAAAUCGCACCAUAC	95	GUAUGGUGCGAUUUGGUGA	96
515	CACCAAAUCGCACCAUACG	97	CGUAUGGUGCGAUUUGGUG	98
516	ACCAAAUCGCACCAUACGA	99	UCGUAUGGUGCGAUUUGGU	100
517	CCAAAUCGCACCAUACGAA	101	UUCGUAUGGUGCGAUUUGG	102
518	CAAAUCGCACCAUACGAAA	103	UUUCGUAUGGUGCGAUUUG	104
519	AAAUCGCACCAUACGAAAU	105	AUUUCGUAUGGUGCGAUUU	106
520	AAUCGCACCAUACGAAUA	107	UAUUUCGUAUGGUGCGAUU	108
521	AUCGCACCAUACGAAUAU	109	AUAUUUCGUAUGGUGCGAU	110
522	UCGCACCAUACGAAUAUU	111	AAUAUUUCGUAUGGUGCGA	112
523	CGCACCAUACGAAUAUUC	113	GAAUAUUUCGUAUGGUGCG	114

Tabla 4. ARNpi que se dirigen al mutante de G289U de IDH1 (equivalente a G523U de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUUGC	115	GCAAUUUGGUGAUUCCAC	116
508	UGGAAAUCACCAAUUGCA	117	UGCAAUUUGGUGAUUCCA	118
509	GGAAAUCACCAAUUGCAC	119	GUGCAAUUUGGUGAUUCC	120
510	GAAAUCACCAAUUGCACC	121	GGUGCAAUUUGGUGAUUUC	122
511	AAUUCACCAAUUGCACCA	123	UGGUGCAAUUUGGUGAUUU	124
512	AAUCACCAAUUGCACCAU	125	AUGGUGCAAUUUGGUGAUU	126
513	AUCACCAAUUGCACCAUA	127	UAUGGUGCAAUUUGGUGAU	128
514	UCACCAAUUGCACCAUAC	129	GUAUGGUGCAAUUUGGUGA	130
515	CACCAAUUGCACCAUACG	131	CGUAUGGUGCAAUUUGGUG	132
516	ACCAAUUGCACCAUACGA	133	UCGUAUGGUGCAAUUUGGU	134
517	CCAAUUGCACCAUACGAA	135	UUCGUAUGGUGCAAUUUGG	136
518	CAAUUGCACCAUACGAAA	137	UUUCGUAUGGUGCAAUUUG	138
519	AAUUGCACCAUACGAAAU	139	AUUUCGUAUGGUGCAAUUU	140
520	AAUUGCACCAUACGAAUA	141	UAUUUCGUAUGGUGCAAUU	142
521	AUUGCACCAUACGAAUAU	143	AUAUUUCGUAUGGUGCAAU	144
522	UUGCACCAUACGAAUAUU	145	AAUAUUUCGUAUGGUGCAA	146
523	UGCACCAUACGAAUAUUC	147	GAAUAUUUCGUAUGGUGCA	148

Tabla 5. ARNpi que se dirigen al mutante de G290A de IDH1 (equivalente a G524A de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUGAC	149	GUCAAUUUGGUGAUUCCAC	150
508	UGGAAAUCACCAAUGACA	151	UGUCAUUUGGUGAUUCCA	152
509	GGAAAUCACCAAUGACAC	153	GUGUCAUUUGGUGAUUCC	154
510	GAAAUCACCAAUGACACC	155	GGUGUCAUUUGGUGAUUUC	156
511	AAUUCACCAAUGACACCA	157	UGGUGUCAUUUGGUGAUUU	158
512	AAUCACCAAUGACACCAU	159	AUGGUGUCAUUUGGUGAUU	160
513	AUCACCAAUGACACCAUA	161	UAUGGUGUCAUUUGGUGAU	162
514	UCACCAAUGACACCAUAC	163	GUAUGGUGUCAUUUGGUGA	14
515	CACCAAUGACACCAUACG	165	CGUAUGGUGUCAUUUGGUG	166
516	ACCAAUGACACCAUACGA	167	UCGUAUGGUGUCAUUUGGU	168
517	CCAAUGACACCAUACGAA	169	UUCGUAUGGUGUCAUUUGG	170
518	CAAUGACACCAUACGAAA	171	UUUCGUAUGGUGUCAUUUG	172
519	AAUGACACCAUACGAAAU	173	AUUUCGUAUGGUGUCAUUU	174
520	AAUGACACCAUACGAAUA	175	UAUUUCGUAUGGUGUCAUU	176
521	AUGACACCAUACGAAUAU	177	AUAUUUCGUAUGGUGUCAU	178
522	UGACACCAUACGAAUAUU	179	AAUAUUUCGUAUGGUGUCA	180
523	GACACCAUACGAAUAUUC	181	GAAUAUUUCGUAUGGUGUC	182

Tabla 6. ARNpi que se dirigen al mutante de G290C de IDH1 (equivalente a G524C de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUGCC	183	GGCAUUUGGUGAUUCCAC	184
508	UGGAAAUCACCAAUGCCA	185	UGGCAUUUGGUGAUUCCA	186
509	GGAAAUCACCAAUGCCAC	187	GUGGCAUUUGGUGAUUCC	188
510	GAAAUCACCAAUGCCACC	189	GGUGGCAUUUGGUGAUUUC	190
511	AAAUCACCAAUGCCACCA	191	UGGUGGCAUUUGGUGAUUU	192
512	AAUCACCAAUGCCACCAU	193	AUGGUGGCAUUUGGUGAUU	194
513	AUCACCAAUGCCACCAUA	195	UAUGGUGGCAUUUGGUGAU	196
514	UCACCAAUGCCACCAUAC	197	GUAUGGUGGCAUUUGGUGA	198
515	CACCAAUGCCACCAUACG	199	CGUAUGGUGGCAUUUGGUG	200
516	ACCAAUGCCACCAUACGA	201	UCGUAUGGUGGCAUUUGGU	201
517	CCAAUGCCACCAUACGAA	203	UUCGUAUGGUGGCAUUUGG	202
518	CAAUGCCACCAUACGAAA	205	UUUCGUAUGGUGGCAUUUG	204
519	AAUGCCACCAUACGAAAU	207	AUUUCGUAUGGUGGCAUUU	206
520	AAUGCCACCAUACGAAUA	209	UAUUUCGUAUGGUGGCAUU	208
521	AUGCCACCAUACGAAUAU	211	AUAUUUCGUAUGGUGGCAU	210
522	UGCCACCAUACGAAUAUU	213	AAUAUUUCGUAUGGUGGCA	212
523	GCCACCAUACGAAUAUUC	215	GAAUAUUUCGUAUGGUGGC	214

Tabla 7. ARNpi que se dirigen al mutante de G290U de IDH1 (equivalente a G524U de la SEQ ID NO: 10, FIG. 2B)

Posición en el ARNm (FIG. 2B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
507	GUGGAAAUCACCAAUGUC	215	GACAUUUGGUGAUUCCAC	216
508	UGGAAAUCACCAAUGUCA	217	UGACAUUUGGUGAUUCCA	218
509	GGAAAUCACCAAUGUCAC	219	GUGACAUUUGGUGAUUCC	220
510	GAAAUCACCAAUGUCACC	221	GGUGACAUUUGGUGAUUUC	222
511	AAAUCACCAAUGUCACCA	223	UGGUGACAUUUGGUGAUUU	224
512	AAUCACCAAUGUCACCAU	225	AUGGUGACAUUUGGUGAUU	226
513	AUCACCAAUGUCACCAUA	227	UAUGGUGACAUUUGGUGAU	228
514	UCACCAAUGUCACCAUAC	229	GUAUGGUGACAUUUGGUGA	230
515	CACCAAUGUCACCAUACG	231	CGUAUGGUGACAUUUGGUG	232
516	ACCAAUGUCACCAUACGA	233	UCGUAUGGUGACAUUUGGU	234
517	CCAAUGUCACCAUACGAA	235	UUCGUAUGGUGACAUUUGG	236
518	CAAUGUCACCAUACGAAA	237	UUUCGUAUGGUGACAUUUG	238
519	AAUGUCACCAUACGAAAU	239	AUUUCGUAUGGUGACAUUU	240
520	AAUGUCACCAUACGAAUA	241	UAUUUCGUAUGGUGACAUU	242
521	AUGUCACCAUACGAAUAU	243	AUAUUUCGUAUGGUGACAU	244
522	UGUCACCAUACGAAUAUU	245	AAUAUUUCGUAUGGUGACA	246
523	GUCACCAUACGAAUAUUC	247	GAAUAUUUCGUAUGGUGAC	248

EJEMPLO 6: Materiales y métodos

Sumario

5 Se introdujo la mutación G97D en IDH1 humano mediante técnicas de biología molecular convencionales. Las células se cultivaron en DMEM, suero fetal bovino al 10 %. Las células se transfectaron y seleccionaron usando técnicas convencionales. Los niveles de expresión de proteína se determinaron mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpo para IDHc (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo para IDH1 (Proteintech), anticuerpo marcado con MYC (Cell Signaling Technology). Se extrajeron los metabolitos de células cultivadas y de muestras de tejido de acuerdo con variantes próximas de un método anteriormente mencionado (Lu, W., Kimball, E. y Rabinowitz, J. D. J Am Soc Mass Spectrom 17, 37-50 (2006)), usando metanol acuoso al 80 % (-80 °C) y o bien raspado de tejido u homogeneización para romper las células. La actividad enzimática en los lisados celulares se evaluó siguiendo un cambio en la fluorescencia de NADPH con el paso del tiempo en presencia de isocitrato y NADP o α KG y NADPH. Para los ensayos enzimáticos que usan enzima IDH1 recombinante, se produjeron proteínas en *E. coli* y se purificaron usando cromatografía de afinidad de Ni, seguida de cromatografía de exclusión por tamaños Sephacryl S-200. La actividad enzimática para la proteína IDH1 recombinante se evaluó siguiendo un cambio en la absorbancia UV de NADPH a 340 nm usando un espectrofotómetro con detención de flujo en presencia de isocitrato y NADP o α KG y los metabolitos de NADPH se extrajeron y analizaron mediante CL-EM/EM como se ha descrito anteriormente.

Métodos complementarios

25 Clonación, expresión y purificación de IDH1 ts y mutantes en *E. coli*. Se adquirió el clon del marco abierto de lectura (ORF) de isocitrato deshidrogenasa 1 humana (ADNc) (IDH1; ref. ID NM_005896) de Invitrogen en pENTR221 (Carlsbad, CA) y de Origene Inc. en pCMV6 (Rockville, MD). Para transfectar células con IDH1 de tipo silvestre o mutante, se utilizaron técnicas de biología molecular para mutagénesis convencionales para alterar el ADN del ORF en pCMV6 para introducir el cambio de par de base que dio como resultado un cambio en el aminoácido codificado en la posición 97 de G (ts) a D (mutante; o G97D) y se confirmó mediante métodos de secuenciación de ADN convencional. Para la expresión en *E. coli*, se amplificó la región codificante a partir de pENTR221 mediante la PCR usando cebadores diseñados para añadir los sitios de restricción NDEI y XHO1 en los extremos 5' y 3', respectivamente. Los fragmentos resultantes se clonaron en el vector pET41a (EMD Biosciences, Madison, WI) para posibilitar la expresión en *E. coli* de la proteína marcada con His8 C-terminal. La mutagénesis de sitio dirigido se llevó a cabo en el plásmido pET41a-ICH1D1 usando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA).

35 Las proteínas de tipo silvestre y mutantes se expresaron en y purificaron a partir de la cepa de *E. coli* Rosetta™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se indica a continuación. Las células se cultivaron en LB (20 μ g/ml de kanamicina) a 37 °C con agitación hasta que la DO600 alcanza 0,6. La temperatura se cambió a 18 °C y expresión se indujo la expresión de proteína añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 12-16 horas de la inducción con IPTG, las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1 %, NaCl 500 mM, PSMF 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10 %) y se rompieron mediante microfluidificación. El sobrenadante de 20.000 g se cargó en una resina de afinidad de quelato de metal (MCAC) equilibrada con tampón A para columna de níquel (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10 %) y se lavó con 20 volúmenes de columna. La elución de la columna se efectuó mediante un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de tampón B para columna de níquel del 10 % al 100 % (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, imidazol 500 mM, glicerol al 10 %) en tampón A de columna de níquel). Las fracciones que contenían la proteína de interés se identificaron mediante SDS-PAGE, se agruparon y se dializaron dos veces frente a un exceso de 200 volúmenes de tampón de filtración en gel (NaCl 200 mM, Tris 50 mM, 7,5, β -mercaptoetanol 5 mM, MnSO₄ 2 mM, glicerol al 10 %), después se concentraron hasta 10 ml usando concentradores de centrifugación Centricon (Millipore, Billerica, MA). La purificación de dímeros activos se logró aplicando el eluyente concentrado de la columna de MCAC a una columna Sephacryl S-200 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) equilibrada con tampón de filtración en gel y eluyendo la columna con 20 volúmenes de columna del mismo tampón. Las fracciones correspondientes al tiempo de retención de la proteína dimerica se identificaron mediante SDS-PAGE y se agruparon para su almacenamiento a -80 °C.

55 Detección de isocitrato, α KG y 2HG en reacciones enzimáticas purificadas mediante CL-EM/EM. Las reacciones enzimáticas llevadas a cabo como se describe en el texto se ejecutaron hasta su compleción, según se determinó midiendo el estado de oxidación de NADPH a 340 nm. Las reacciones se extrajeron con ocho volúmenes de metanol y se centrifugaron para retirar la proteína precipitada. Se secó el sobrenadante en una corriente de nitrógeno y se resuspendió en H₂O. El análisis se llevó a cabo en un dispositivo de CL-EM/EM API2000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La separación de la muestra y el análisis se llevó a cabo en una columna de 150 x 2 mm, 4 μ M Synergi Hydro-RP 80 A, usando un gradiente de tampón A (tributilamina 10 mM, ácido acético 15 mM, metanol al 3 % (v/v) en agua) y tampón B (metanol) usando transiciones de MRM.

65 Ensayos de enzima IDH1 recombinante. Todas las reacciones se llevaron a cabo en tampón de reacción enzimática convencional (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, MgCl₂ 5 mM y seroalbúmina bovina al 0,03 % (p/v)). Para la determinación de los parámetros cinéticos, se añadió suficiente enzima para proporcionar una reacción

lineal durante 1 a 5 segundos. El progreso de la reacción se monitorizó mediante la observación del estado de reducción del cofactor a 340 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido SFM-400 (BioLogic, Knoxville, TN). Las constantes enzimáticas se determinaron usando algoritmos de ajuste de curva para modelos cinéticos convencionales con el paquete informático Sigmaplot (Systat Software, San José, CA).

5

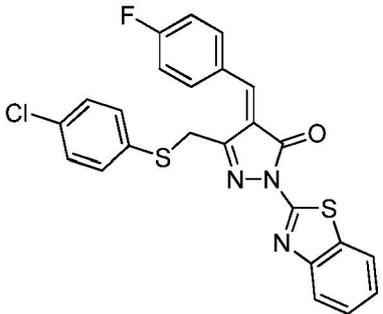
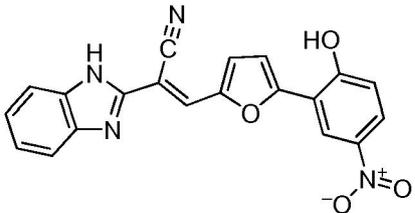
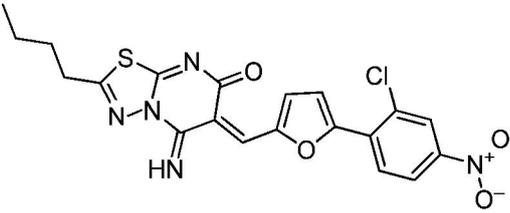
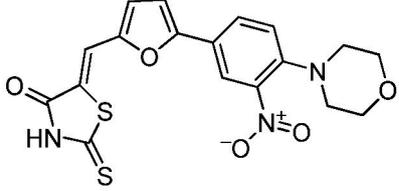
EJEMPLO 8: Identificación de compuestos con actividad inhibidora de IDH1 G97D

10

Se llevaron a cabo ensayos en una placa de 384 pocillos convencional en un volumen de reacción de 76 μ l de tampón de ensayo (NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, seroalbúmina bovina al 0,05 %, beta-mercaptoetanol 2 mM) como se indica a continuación: A 25 μ l de mezcla de sustrato (NADPH 4 μ M, aKG 1 mM), se le añadió 1 μ l de compuesto de ensayo en DMSO. La placa se centrifugó brevemente y después se añadieron 25 μ l de mezcla enzimática (0,1 μ g/ml de ICDH1 G97D) seguido de una breve centrifugación y agitación a 100 RPM. Se incubó la reacción durante 50 minutos a temperatura ambiente, después se añadieron 25 μ l de mezcla de detección (resazurina 30 μ M, 36 μ g/ml de diaforasa) y la mezcla se incubó adicionalmente durante 5 minutos a temperatura ambiente. La lectura de actividad como resultado de la conversión de resazurina a resorufina se detectó mediante espectroscopía de fluorescencia con excitación a 544 nm y emisión a 590 nm (c/o 590 nm).

15

Se identificaron cuatro compuestos, que inhibieron la actividad de IDH1 G97D y se proporcionan a continuación:

Compuesto	Actividad (CI ₅₀)
	A
	A
	A
	B
* Indica actividad. A indica un compuesto que tiene una actividad de 1 a 5 μ M. B indica un compuesto que tiene una actividad >5 a 10 μ M.	

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular o que se sospecha que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG) o para evaluar la susceptibilidad de un sujeto a un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG, caracterizado por:
- (a) la presencia de una enzima IDH1-G97D mutante que tiene neoactividad de 2HG o
 (b) niveles elevados de 2HG debido a la presencia de la enzima IDH1-G97D mutante que tiene neoactividad de 2HG,
- en donde dicho método comprende:
- analizar la presencia de 2HG en una muestra seleccionada entre un tejido, producto y fluido corporal de dicho sujeto mediante un método cromatográfico;
 analizar la presencia de una proteína IDH1-G97D mutante o de un ADN o ARN que codifica dicha proteína IDH1-G97D mutante en la muestra;
 en donde la presencia de 2HG es indicativa de que el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG.
2. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en donde dicho trastorno relacionado con la proliferación celular se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de colon y glioma.
3. El método *in vitro* de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho fluido corporal es sangre o plasma.
4. El método *in vitro* de la reivindicación 1 o 2, en donde el método cromatográfico es CL-EM.
5. El método *in vitro* de la reivindicación 1, en donde el sujeto no tiene o no se le diagnostica que tenga aciduria 2-hidroxiglutarica.
6. El método *in vitro* de la reivindicación 5, en donde dicho trastorno relacionado con la proliferación celular se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de colon, glioma, cáncer de próstata, leucemia linfoblástica aguda, mielodisplasia, síndrome mielodisplásico y leucemia mielógena aguda.
7. El método *in vitro* de la reivindicación 5 o 6, en donde el fluido corporal del sujeto es sangre o plasma.
8. El método *in vitro* de la reivindicación 5 o 6, en donde el método cromatográfico es CL-EM.
9. Un método para determinar si un cáncer en un sujeto es resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG), comprendiendo el método, analizar la presencia en dicho cáncer de una proteína IDH1-G97D mutante o de un ADN o ARN que codifica dicha proteína IDH1-G97D mutante en una muestra, comparar el nivel de 2HG en un tejido, producto o muestra de fluido corporal del sujeto con el nivel de 2HG en una referencia, en donde un nivel aumentado de 2HG en la muestra en relación con la referencia indica que el cáncer es resultante de una enzima IDH1-G97D mutante con neoactividad de 2HG asociada con el cáncer.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la referencia es una célula no enferma del mismo tipo.
11. El método de las reivindicaciones 9 o 10, en donde la muestra es una muestra de tumor, una muestra de células cancerosas o una muestra de células precancerosas.
12. Un método para determinar la neoactividad de 2-hidroxiglutarato (2HG) en un paciente analizando una muestra de dicho paciente, para determinar la presencia de un ARN o ADN que codifica una proteína IDH1 mutante con una mutación en el resto 97 de la SEQ ID NO: 8, en donde la IDH1 mutante es IDH1-G97D y en donde la presencia de dicho ARN o ADN que codifica dicha proteína IDH1 mutante indica neoactividad de 2HG en dicho paciente.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la neoactividad de 2HG en el paciente indica que el paciente tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la proliferación celular.
14. El método de la reivindicación 12, en donde el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer.

1 mskkisggsv vemqgdemtr iiwelikekl ifpyveldlh sydlgienrd atndqvtkda
61 aeaikkhnvg vkcatitpde krveefklkq mwkspngtir nilggtvfre aiickniprl
121 vsgwvkiiii grhaygdqyr atdfvvpqpg kveitytpsd gtqkvtylvh nfeegggvam
181 gmynqdkxie dfahssfama lskgwplyls tkntilkkyd grfkdifgei ydkqyksqfe
241 aqkiwyehrl iddmvaqamk seggfiwack nygdvqgds vaqgygslgm mtsvlvcpdg
301 ktveaaaahg tvtrhymyq kgqetstnpi asifawtrgi ahrakldnk elaffanale
361 evsietieag fmkdlaaci kglpvnqrsd ylnfefmdk lgenlkikla qakl

Fig. 2

```

1 atgtccaaaa aaatcagtgg cggttctgtg gtagagatgc aaggagatga aatgacacga
61 atcatttggg aattgattaa agagaaactc atttttccct acgtggaatt ggatctacat
121 agctatgatt taggcataga gaatcgtgat gccaccaacg accaagtcac caaggatget
181 gcagaagcta taaagaagca taatgttggc gtcaaatgtg ccactatcac tcctgatgag
241 aagaggggtg aggagttaa gttgaaacaa atgtggaaat caccaaattg caccatacga
301 aatattctgg gtggcacggt cttcagagaa gccattatct gcaaaaatat cccccggctt
361 gtgagtggat gggtaaaacc tatcatcata ggtcgtcatg cttatgggga tcaatacaga
421 gcaactgatt ttgttgttcc tgggcctgga aaagtagaga taacctacac accaagtgac
481 ggaacccaaa aggtgacata cctggtacat aactttgaag aagggtggtg tgttgccatg
541 gggatgtata atcaagataa gtcaattgaa gatthttgcac acagttcctt ccaaattgct
601 ctgtctaagg gttggccttt gtatctgagc accaaaaaca ctattctgaa gaaatatgat
661 gggcgthtta aagacatctt tcaggagata tatgacaagc agtacaagtc ccagthtgaa
721 gctcaaaaaga tctggtatga gcataggctc atcgacgaca tgggtggcca agctatgaaa
781 tcagagggag gcttcatctg ggctgtaaa aactatgatg gtgacgtgca gtcggactct
841 gtggcccaag ggtatggctc tctcggcatg atgaccagcg tgctggthtg tccagatggc
901 aagacagtag aagcagaggc tgcccacggg actgtaacco gtcactaccg catgtaccag
961 aaaggacagg agacgtccac caatcccatt gcttccattt ttgcttgga cagagggtha
1021 gccacagag caaagcttga taacaataaa gagcttgctt tctttgcaaa tgctthgaa
1081 gaagtctcta ttgagacaat tgaggctggc ttcatgacca aggactthgc tgctthcatt
1141 aaagthttac ccaatgtgca acgthctgac tactthgata cattthagth catggataaa
1201 cthggagaaa actthagat caaactagct caggccaaac ththaa

```

Fig. 2A

```

1 cctgtgggtcc cgggtttctg cagagttctac ttcagaagcg gaggcactgg gagtccqggt
61 tgggattgcc aggctgtggt tgtgagtctg agcttgtgag cggctgtggc gccccaactc
121 ttcgccagca tatcatcccg gcaggcgata aactacattc agttgagtct gcaagactgg
181 gaggaactgg ggtgataaga aatctattoa ctgtcaaggt ttattgaagt caaaatgtcc
241 aaaaaaatca gtggcgggtc tgtggtagag atgcaaggag atgaaatgac acgaatcatt
301 tgggaattga ttaaagagaa actcattttt cctacgtgg aattggatct acatagctat
361 gatttaggca tagagaatcg tgatgccacc aacgaccaag tcaccaagga tgctgcagaa
421 gctataaaga agcataatgt tggcgtcaaa tgtgccacta tcaactctga tgagaagagg
481 gttgaggagt tcaagttgaa acaaatgtgg aaatcaccaa atggcaccat acgaaatatt
541 ctgggtggca cggctctcag agaagccatt atctgcaaaa atatcccccg gcttgtgagt
601 ggatgggtaa aacctatcat cataggctgt catgcttatg gggatcaata cagagcaact
661 gattttgttg ttctgggccc tggaaaagta gagataacct acacaccaag tgacggaacc
721 caaaagggtga catacctggt acataacttt gaagaagggt gtggtgttgc catggggatg
781 tataatcaag ataagtoaat tgaagatttt gcacacagtt ccttccaaat ggctctgtct
841 aagggttggc ctttgtatct gagcaccaaa aacactatc tgaagaaata tgatgggctt
901 tttaaagaca tctttcagga gatatatgac aagcagtaca agtcccagtt tgaagctcaa
961 aagatctggt atgagcatag gctcatcgac gacatggtgg cccaagctat gaaatcagag
1021 ggaggettca tctgggcttg taaaaactat gatggtgacg tgcagtcgga ctctgtggcc
1081 caagggtatg gctctctcgg catgatgacc agcgtgctgg tttgtccaga tggcaagaca
1141 gtagaagcag aggetgcca cgggactgta aoccgtoact accgcatgta ccagaaagga
1201 caggagacgt ccaccaatcc cattgcttcc atttttgctt ggaccagagg gttagccacc
1261 agagcaaacg ttgataacaa taaagagctt gccttctttg caaatgcttt ggaagaagtc
1321 tctattgaga caattgaggo tggcttcatt accaaggact tggctgcttg cattaagggt
1381 ttacccaatg tgcaacgttc tgactacttg aatacatttg agttcatgga taaacttggg
1441 gaaaacttga agatcaact agctcaggcc aaactttaag ttcatacctg agctaagaag
1501 gataattgtc ttttggtaac taggtctaca ggtttacatt tttctgtgtt acactcaagg
1561 ataaaggcaa aatcaatttt gtaatttgtt tagaagccag agtttatctt ttctataagt
1621 ttacagcctt tttcttatat atacagttat tggcaccttt gtgaacatgg caagggactt
1681 ttttacaatt tttattttat tttctagtac cagcctagga attcggttag tactcatttg
1741 tattcaactg cactttttct catgttctaa ttataaatga ccaaaatcaa gattgctcaa
1801 aagggtaaat gatagccaca gtattgctcc ctaaaatag cataaagtag aaattcactg
1861 ccttccccctc ctgtccatga ccttgggcac aggggaagtc tgggtgcata gatatccgt
1921 tttgtgaggt agagctgtgc attaaaacttg cacatgactg gaacgaagta tgagtgaac
1981 tcaaatgtgt tgaagatact gcagtcattt ttgtaaagac ottgotgaat gtttccaata
2041 gactaaatac tgtttaggcc gcaggagagt ttggaatccg gaataaatac tacttgaggg
2101 tttgtcctct ccatttttct ctttctctctc ctggcctggc ctgaatatta tactactcta
2161 aatagcatat ttcatecaag tgcaataatg taagctgaat ctttttttgg cttctgctgg
2221 cctgtttttat ttcttttata taaatgtgat ttctcagaaa ttgatattaa acactatctt
2281 atcttctcct gaactggtga ttttaattaa aattaagtgc taattaccaa aaaaaaaaaa

```

Fig. 2B

IDH1-G97D oxidó a NADPH en presencia de aKG

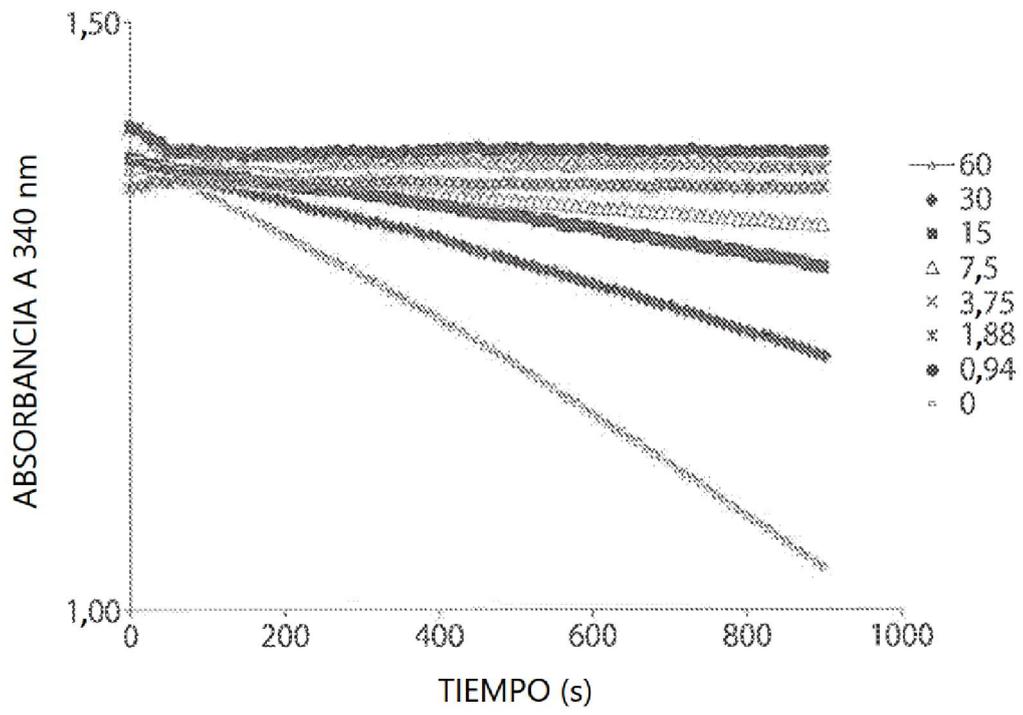


Fig. 3

Km de a-KG (pH 7,5) para IDH1G97D
en tampón Tris

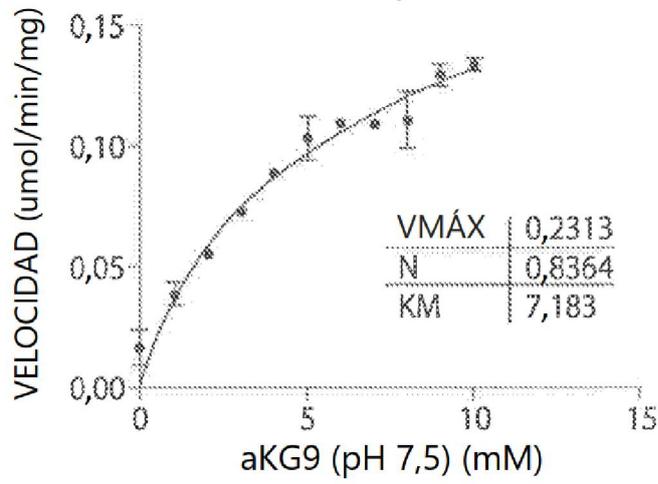


Fig. 4A

Km de NADPH para IDH1G97D en tampón Tris

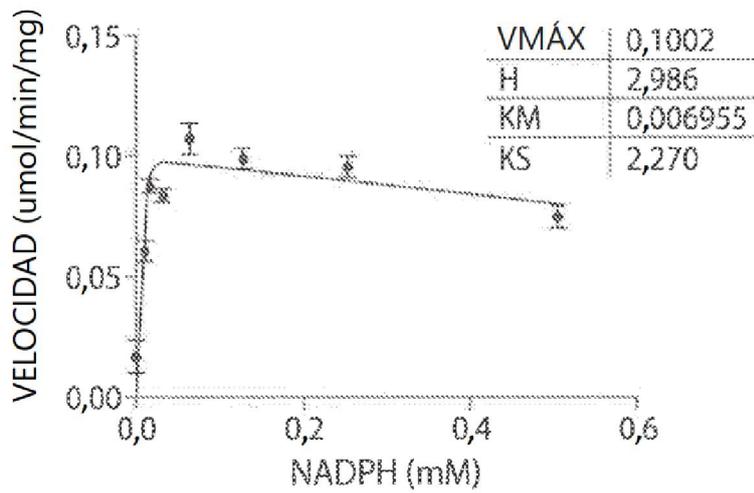


Fig. 4B

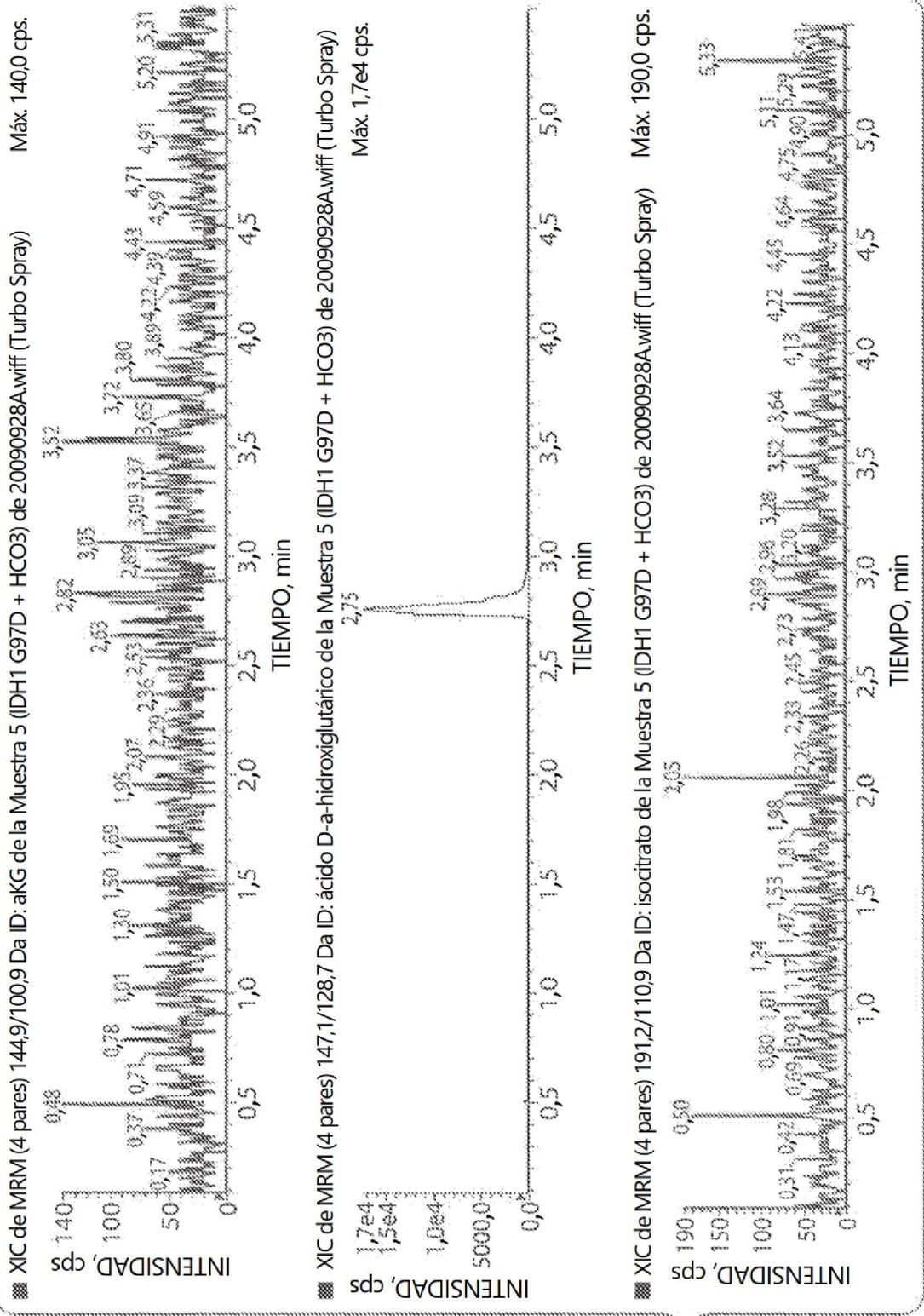


Fig. 5A

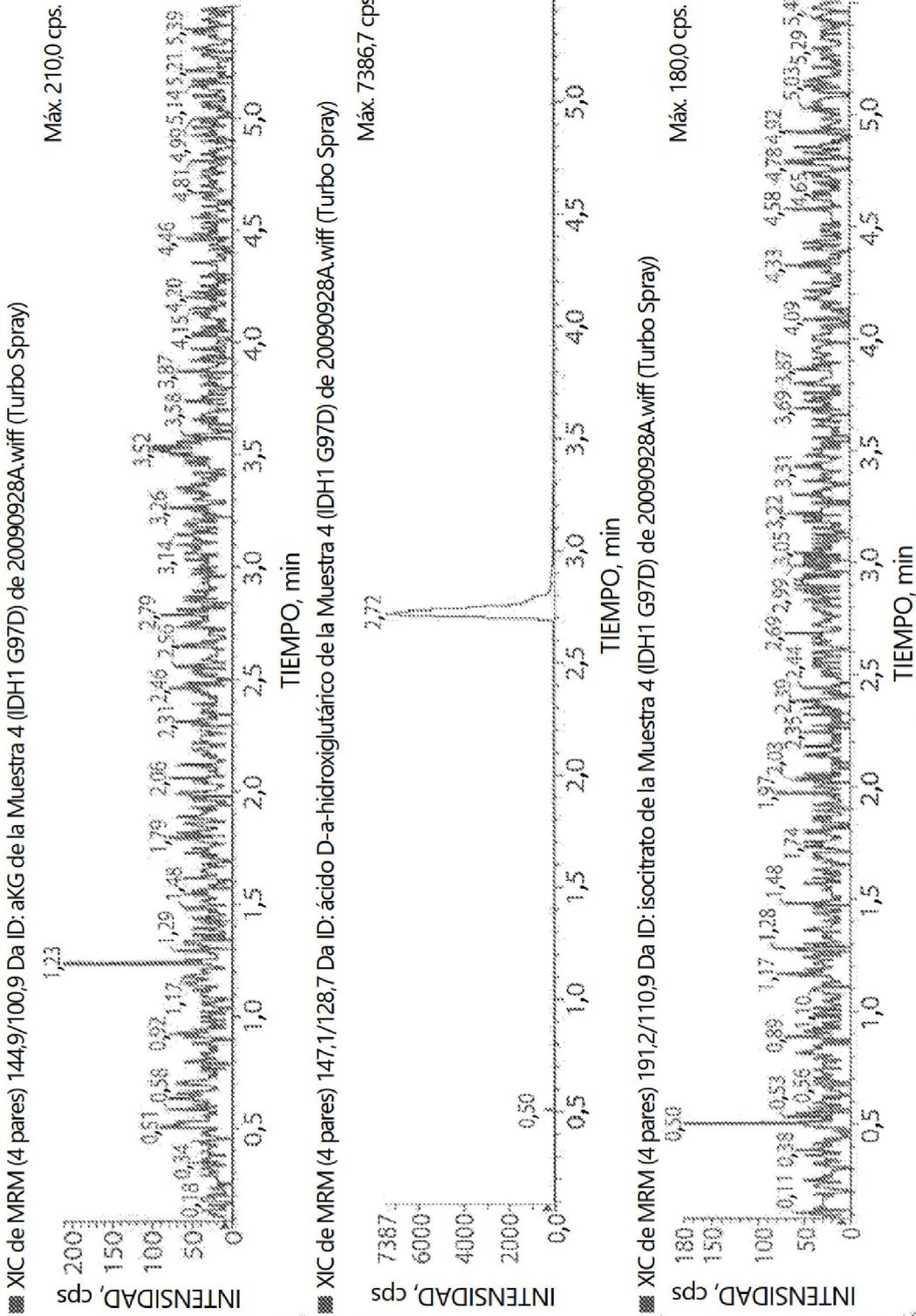


Fig. 5B

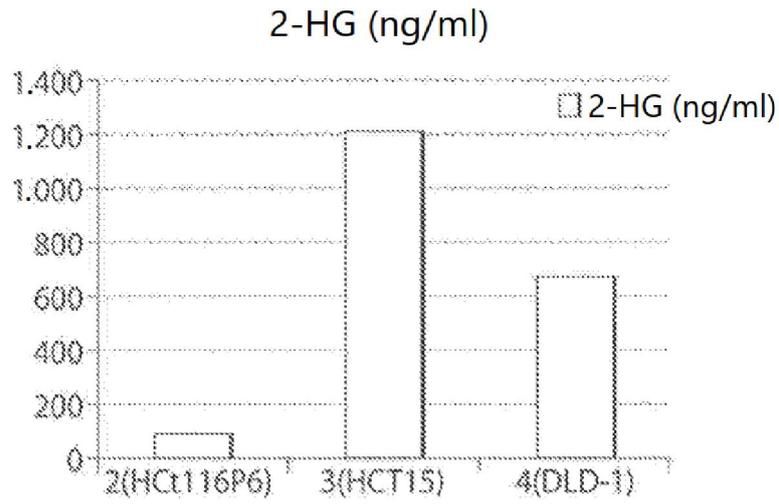


Fig. 6

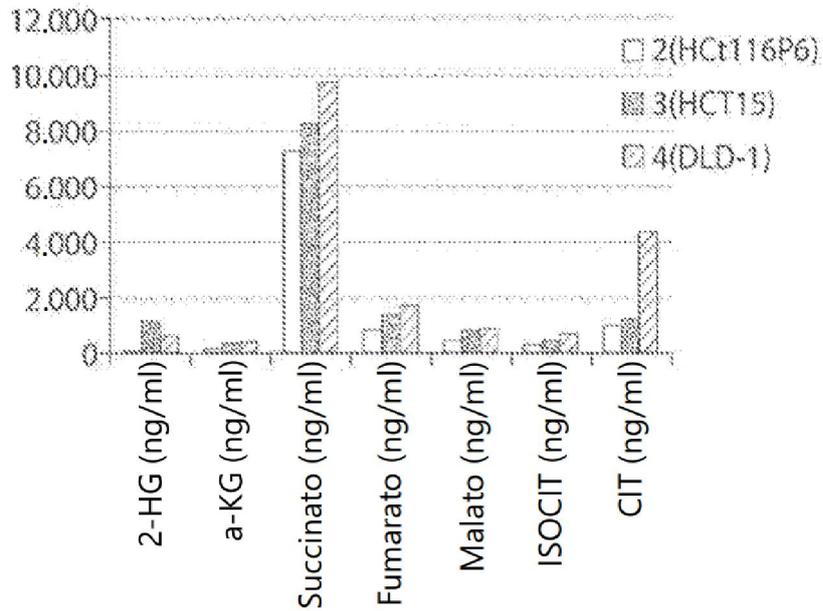


Fig. 7