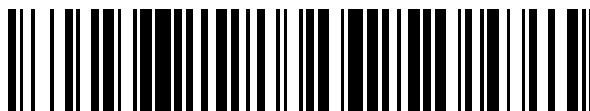


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 424**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2010 PCT/US2010/027253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.09.2010 WO10105243**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2010 E 10751525 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2406389**

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

30 Prioridad:

22.05.2009 US 180609 P 13.03.2009 US 160253 P
21.10.2009 US 253820 P 04.12.2009 US 266929 P
25.06.2009 US 220543 P 29.07.2009 US 229689 P
28.04.2009 US 173518 P 16.03.2009 US 160664 P
22.07.2009 US 227649 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
05.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DANG, LENNY;
FANTIN, VALERIA;
GROSS, STEFAN;
JANG, HYUN GYUNG;
JIN, SHENGFANG;
SALITURO, FRANCESCO G.;
SAUNDERS, JEFFREY O.;
SU, SHIN-SAN MICHAEL y
YEN, KATHARINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 740 424 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 y composiciones para evaluar y tratar trastornos relacionados con la proliferación celular, *por ejemplo*, trastornos proliferativos 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 CO₂ mientras convierte NAD⁺ en NADH. Es un proceso de dos etapas, que implica la oxidación de isocitrato (un alcohol secundario) a oxalosuccinato (una cetona), seguido por la descarboxilación del grupo carboxilo beta a la cetona, formando alfa-cetoglutarato. Otra isoforma de la enzima cataliza la misma reacción; sin embargo esta reacción no está relacionada con el ciclo del ácido cítrico, se lleva a cabo en el citosol así como en la mitocondria y el peroxisoma, y usa NADP⁺ como cofactor en lugar de NAD⁺.

20 Las mutaciones de IDH1 como sucesos tempranos en el desarrollo de astrocitomas y oligodendrogliomas se describen en Watanabe *et al.*, Am. J. of Pathol. 2009, 174(4), 1149-1153.

Las mutaciones de IDH1 e IDH2 en gliomas se describen en Yan *et al.*, New Eng. J. of Med. 2009, 360, 765-773.

25 Las mutaciones derivadas de glioma en IDH1 se describen en Zhao *et al.*, Science 2009, 324, 261-265.

Sumario de la invención

Los métodos y composiciones desvelados en el presente documento se relacionan con el papel desempeñado en enfermedad por productos neoactivos producidos por enzimas mutantes neoactivas, *por ejemplo*, enzimas de la ruta metabólica mutante. Los inventores han descubierto, entre otras cosas, una neoactividad asociada con mutantes IDH y que el producto de la neoactividad puede elevarse significativamente en células cancerosas. En el presente documento se describen métodos y composiciones para tratar, y métodos para evaluar, sujetos que tienen o están en riesgo de un trastorno, *por ejemplo*, un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una neoactividad en una enzima de la ruta metabólica, *por ejemplo*, neoactividad de IDH. Tales trastornos incluyen *por ejemplo*, trastornos proliferativos como cáncer. Los inventores han descubierto y descrito en el presente documento nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos, *por ejemplo*, cánceres, caracterizados por, *por ejemplo*, por una neoactividad, proteína neoactiva, ARNm neoactivo, o mutaciones neoactivas. En realizaciones un agente terapéutico reduce los niveles de neoactividad o producto neoactivo o mejora un efecto de un 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, sobre la base del genotipo o fenotipo de neoactividad. Esta evaluación puede permitir una correspondencia óptima del sujeto con el tratamiento, *por ejemplo*, donde la selección del sujeto, tratamiento, o ambos, se basa en un análisis del genotipo o fenotipo de neoactividad. 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 descrito en el presente documento, o un compuesto conocido, *por ejemplo*, un compuesto conocido no recomendado previamente para un trastorno seleccionado. En realizaciones el compuesto conocido reduce los niveles de neoactividad o producto neoactivo o mejora un efecto de un producto neoactivo. Los métodos descritos en el presente documento pueden guiar y proporcionar una base para la selección y administración de un compuesto nuevo o un compuesto conocido, o combinación de compuestos, no recomendados previamente para sujetos con un trastorno caracterizado por una mutación neoactiva somática en una enzima de la ruta metabólica. En realizaciones el genotipo o fenotipo neoactivo puede actuar como un biomarcador cuya presencia indica que un compuesto, ya sea nuevo, o previamente conocida, debería administrarse, para tratar un trastorno caracterizado por una mutación neoactiva somática en una enzima de la ruta metabólica. Mutantes neoactivos de IDH1 que tienen una neoactividad que resulta en la producción de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato y trastornos asociados se tratan en detalle en el presente documento. Son ejemplares, pero sin limitaciones, a ejemplos de realizaciones de la invención.

Sin desear estar limitado por la teoría se cree que el equilibrio entre la producción y la eliminación del producto neoactivo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, es importante en la enfermedad. Los mutantes neoactivos, en diversos grados para mutaciones variables, aumentan el nivel de producto neoactivo, mientras que otros procesos, *por ejemplo*, en el caso de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, degradación enzimática de 2HG, *por ejemplo*, por 2HG deshidrogenasa, reducen el nivel de producto neoactivo. Un equilibrio incorrecto se asocia con la enfermedad. En las realizaciones, el resultado neto de una mutación neoactiva en IDH1 o IDH2 da como resultado un aumento de los niveles, en células afectadas, de producto neoactivo, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, La presente invención se dirige a un método para evaluar a un sujeto por la presencia o la susceptibilidad a un cáncer, comprendiendo el método analizar dicho sujeto para niveles elevados de 2-hidroxiglutarato (2HG); en donde

los niveles elevados de 2HG en el sujeto indican que el sujeto tiene, o es susceptible de tener, un cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación de la proteína IDH-1 o IDH-2 que tiene neoactividad 2-HG, en donde dicha neoactividad 2HG es la capacidad de convertir alfa cetoglutarato en 2HG.

5 En consecuencia, se describe un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, cáncer, o un trastorno precanceroso. El trastorno relacionado con la proliferación celular se caracteriza por una mutación somática en una enzima de la ruta metabólica. La mutación está asociada con una neoactividad que resulta en la producción de un producto de neoactividad. El método comprende: administrar al sujeto una cantidad
10 terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un agente terapéutico que disminuye el nivel de producto de neoactividad codificado por un alelo somático seleccionado o mutante, *por ejemplo*, un inhibidor de una neoactividad de la enzima de la ruta metabólica (la enzima neoactiva), un agente terapéutico que mejora un efecto no deseado del producto de neoactividad, o un inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNd que se dirige al ARNm enzimático neoactivo, para así tratar al sujeto.

15 El sujeto puede ser un sujeto que no tiene, o no se diagnostica que tiene, aciduria 2-hidroxiglutarica.

En una realización el sujeto tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un cáncer, caracterizada por la neoactividad de la enzima de la ruta metabólica codificada por el alelo seleccionado o mutante.

20 En una realización el sujeto tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un cáncer, caracterizado por el producto formado por la neoactividad de la enzima de la ruta metabólica codificada por el alelo seleccionado o mutante.

25 La ruta metabólica se puede seleccionar entre una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, las rutas biosintéticas de nucleótidos, o la ruta biosintética de ácidos grasos.

El agente terapéutico puede ser un agente terapéutico descrito en el presente documento.

30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto basándose en tener un cáncer caracterizado por el alelo seleccionado o mutante, la neoactividad, o un nivel elevado de producto no reactivo.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto basándose en tener un cáncer caracterizado por el producto formado por la neoactividad de la proteína codificada por alelo seleccionado o mutante, *por ejemplo*, por análisis de imagen y/o espectroscópico, *por ejemplo*, análisis basado en resonancia magnética, *por ejemplo*, MRI (imágenes de resonancia magnética) y/o MRS (espectroscopía de resonancia magnética), para determinar la presencia, distribución o nivel del producto de la neoactividad, *por ejemplo*, en el caso de un alelo IDH1 descrito en el presente documento, 2-hidroxiglutarato (a veces denominado 2HG en el presente documento), *por ejemplo*, R-2-
40 hidroxiglutarato (a veces denominado R-2HG en el presente documento).

En una realización el método comprende confirmar o determinar, *por ejemplo*, por examen directo o evaluación del sujeto, o muestra *por ejemplo*, tejido, producto (*por ejemplo*, heces, sudor, semen, exhalación, cabello o uñas), o fluido corporal (*por ejemplo*, sangre (*por ejemplo*, plasma sanguíneo), orina, linfa, o líquido cefalorraquídeo u otra muestra obtenida como se describe en el presente documento) del mismo, (*por ejemplo*, por secuenciación de ADN, análisis inmunológico, o ensayo de actividad enzimática), o recibir dicha información sobre el sujeto, cáncer que se caracteriza por el alelo seleccionado o mutante.

En una realización el método comprende confirmar o determinar, *por ejemplo*, por examen directo o evaluación del sujeto, el nivel de neoactividad o el nivel del producto de la neoactividad, o recibir tal información sobre el sujeto. En una realización la presencia, distribución o nivel del producto de la neoactividad, *por ejemplo*, en el caso de un alelo IDH1 descrito en el presente documento, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, se determina de forma no invasiva, *por ejemplo*, por métodos de imagen, *por ejemplo*, por métodos basados en resonancia magnética.

55 El método puede comprender administrar un segundo agente o terapia contra el cáncer al sujeto, *por ejemplo*, extirpación quirúrgica o administración de un quimioterapéutico.

Además se describe un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno precanceroso, o cáncer.

60 El sujeto puede no tener, o no ha sido diagnosticado con, aciduria 2-hidroxiglutarica. El trastorno relacionado con la proliferación celular se caracteriza por un alelo somático, *por ejemplo*, un alelo preseleccionado, o alelo mutante, de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, que codifica una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, enzima que tiene una neoactividad.

65 En realizaciones la neoactividad es neoactividad alfa hidroxil. Como se usa en el presente documento, la

neoactividad alfa hidroxilo se refiere a la capacidad de convertir una alfa cetona en un alfa hidroxilo. En realizaciones la neoactividad alfa hidroxilo procede con un cofactor reductor, *por ejemplo*, NADPH o NADH. La neoactividad alfa hidroxilo es la neoactividad 2HG. La neoactividad 2HG, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de convertir alfa cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato (a veces denominado en el presente documento como 2HG), *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato (a veces denominado R-2HG en el presente documento). En realizaciones la neoactividad 2HG procede con un cofactor reductor, *por ejemplo*, NADPH o NADH. En una realización una enzima neoactiva, *por ejemplo*, un alfa hidroxilo, *por ejemplo*, un 2HG, enzima neoactiva, puede actuar sobre más de un sustrato, *por ejemplo*, más de un sustrato alfa hidroxilo.

- 10 El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico del tipo descrito en el presente documento para tratar así al sujeto.

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

- 15 En una realización el método comprende administrar un agente terapéutico que reduce la neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. En una realización el método comprende administrar un inhibidor de una proteína IDH mutante, *por ejemplo*, una proteína IDH1 mutante o IDH2 mutante, que tiene una neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

- 20 El agente terapéutico puede comprender un compuesto de la Tabla 24a o Tabla 24b o un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (X) o (Fórmula (XI) descrita en el presente documento).

- 25 En una realización el agente terapéutico comprende un agente terapéutico basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNs, *por ejemplo*, un ARNs descrito en el presente documento.

- 30 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 daltons), o aptómero, que se une a una subunidad de tipo silvestre o mutante IDH1 e inhibe la neoactividad, *por ejemplo*, al inhibir la formación de un dímero, *por ejemplo*, un homodímero de subunidades IDH1 mutantes o un heterodímero de un mutante y una subunidad de tipo silvestre. En una realización el inhibidor es un polipéptido. En una realización el polipéptido actúa como un negativo dominante con respecto a la neoactividad de la enzima mutante. El polipéptido puede corresponder a IDH1 de longitud completa o un fragmento del mismo. El polipéptido no necesita ser idéntico a los restos correspondientes de IDH1 de tipo silvestre, pero en realizaciones tiene al menos 60, 70, 80, 90 o 95 % de homología con IDH1 de tipo silvestre.

- 35 En una realización el agente terapéutico disminuye la afinidad de una IDH, *por ejemplo*, proteína mutante neoactiva de IDH1 o IDH2 para NADH, NADPH o un ion metálico divalente, *por ejemplo*, Mg^{2+} o Mn^{2+} , o disminuye los niveles o la disponibilidad de NADH, NADPH o ion metálico divalente, *por ejemplo*, Mg^{2+} o Mn^{2+} , *por ejemplo*, compitiendo por la unión a la enzima mutante. En una realización la enzima se inhibe reemplazando Mg^{2+} o Mn^{2+} con Ca^{2+} .

- 40 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel de neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

- 45 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante que tiene una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, mutante IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, reduce el nivel de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que:

- 50 inhibe, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

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

- 60 inhibe, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento *por ejemplo*, neoactividad 2HG; o inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una IDH1, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteínas o ARNm.

- 65 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une a, el IDH mutante, *por ejemplo*, ARNm de IDH1 o IDH2.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une a, el IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína.

- 5 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de actividad enzimática neoactiva, *por ejemplo*, interactuando con, *por ejemplo*, unión a, IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína. En una realización el inhibidor es distinto de un anticuerpo.

- 10 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que es una molécula pequeña e interactúa con, *por ejemplo*, se une, el ARN mutante, *por ejemplo*, ARNm de IDH1 o IDH2 mutante (*por ejemplo*, ARNm de IDH1 mutante).

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une, ya sea el IDH mutante, *por ejemplo*, proteína IDH1 o IDH2, o interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une, al ARNm de IDH mutante, *por ejemplo*, ARNm de IDH1 o IDH2.

- 15 En una realización el IDH es IDH1 y la neoactividad es neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. Las mutaciones en IDH1 asociadas con la neoactividad 2HG incluyen mutaciones en el resto 132, *por ejemplo*, R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, o R132V (*por ejemplo*, R132H o R132C).

- 20 En una realización la IDH es IDH2 y la neoactividad del mutante IDH2 es neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. Las mutaciones en IDH2 asociadas con la neoactividad 2HG incluyen mutaciones en el resto 172, *por ejemplo*, R172K, R172M, R172S, R172G, o R172W.

- 25 Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden comprender evaluar un genotipo o fenotipo neoactivo. Métodos de obtención y análisis de muestras, y análisis *in vivo* en sujetos, descritos en otra parte en el presente documento, *por ejemplo*, en la sección titulada, "Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos", se pueden combinar con este método.

- 30 Antes o después del tratamiento, el método puede incluir evaluar el crecimiento, tamaño, el peso, la invasividad, estadio u otro fenotipo del trastorno relacionado con la proliferación celular.

- En una realización, antes o después del tratamiento, el método incluye evaluar la IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, genotipo de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, genotipo, o fenotipo de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, fenotipo. Evaluando el alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, el genotipo puede comprender determinar si una mutación IDH1 o IDH2 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, está presente, *por ejemplo*, una mutación descrita en el presente documento que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. El fenotipo de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, fenotipo, como se usa en el presente documento, se refiere al nivel del producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, nivel de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, o nivel de enzima mutante que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG (o ARNm correspondiente). La evaluación puede ser por un método descrito en el presente documento.

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

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

- En una realización el método comprende evaluar, *por ejemplo*, por examen directo o evaluación del sujeto, o una muestra del sujeto, o recibiendo tal información sobre el sujeto, la IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, genotipo, o un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, fenotipo R-2HG de, el sujeto, *por ejemplo*, de una célula, *por ejemplo*, una célula cancerosa, caracterizado por el trastorno relacionado con la proliferación celular. (Como se describe con más detalle en otra parte del presente documento, la evaluación puede ser, *por ejemplo*, por secuenciación de ADN, análisis inmunológico, evaluación de la presencia, distribución o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, del análisis espectroscópico, *por ejemplo*, análisis basado en resonancia magnética, *por ejemplo*, medición MRI y/o MRS, análisis de muestras como suero o análisis del líquido de la médula espinal, o mediante análisis de material quirúrgico, *por ejemplo*, por espectroscopía de masas). En 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 alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En 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 IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene una mutación, *por ejemplo*, una His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu en el resto 132, más

específicamente, His o Cys, o un alelo IDH2 que tiene una mutación en el resto 172, *por ejemplo*, una K, M, S, G, o W.

5 En una realización, antes y/o después de comenzar el tratamiento, el sujeto se evalúa o monitoriza con un método descrito en el presente documento, *por ejemplo*, el análisis de la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar el sujeto, para seleccionar un inhibidor, o para evaluar la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad.

10 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, fibrosarcoma, paraganglioma, o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico (*por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, cáncer de próstata, o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico) y la evaluación es: evaluación de la presencia, distribución, o nivel de un producto alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG; o evaluación de la presencia, distribución, o nivel de una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, de una proteína mutante, IDH1 o IDH2.

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

25 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer, *por ejemplo*, un cáncer descrito en el presente documento, caracterizado por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el tumor se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.

30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por niveles no deseados (es decir, aumentados) de una neoactividad alfa hidroxilado, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

35 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, *por ejemplo*, un glioma, *por ejemplo*, en donde el tumor se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización el tumor se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene otro que no es una Arg en el resto 132. *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu), o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el resto 132. En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el resto 132.

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

50 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys.

55 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys.

60 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de neoactividad alfa hidroxilado, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

65 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un fibrosarcoma o paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un fibrosarcoma o paraganglioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

- 5 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un fibrosarcoma o paraganglioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de neoactividad alfa hidroxí, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 10 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es el cáncer de próstata localizado o metastásico, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, *por ejemplo*, en donde el cáncer se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.

- 15 *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene otro que no es una Arg en el resto 132. *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, 2009, Int. J. Cancer, 125: 353-355 en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132.

- 20 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición del nucleótido 394, o una A (o cualquier otro nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 395. En una realización el alelo es una mutación C394T o G395A de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

- 25 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

- 30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

- 35 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 40 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 un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.

- 45 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), *por ejemplo*, en donde la leucemia linfoblástica aguda (a veces denominada en el presente documento ALL) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. El 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 alfa hidroxí, *por ejemplo*, HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu. En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el resto 132.

- 55 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

- 60 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, caracterizado por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

- 65 En una realización el método comprende seleccionar un ALL objeto, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

5 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia mielógena aguda. (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), *por ejemplo*, en donde la leucemia mielógena aguda (a veces denominada en el presente documento AML) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por*
10 *ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el resto 132, más específicamente, Cys en el resto 132.

15 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

20 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) caracterizada por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His, o Gly en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID N°: 8, más específicamente, Cys en el resto 132.

25 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML) basándose en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His, o Gly en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente, Cys en el resto 132.

30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoblástica mielógena aguda (AML), basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

El método puede comprender además evaluar al sujeto por la presencia de una mutación en el gen NRAS o NPMc.

35 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 tener un mutante somático IDH1 con neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el trastorno se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no liberadas del mismo tipo. *Por*
40 *ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21), más específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu. En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el resto 132.

45 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

50 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His, o Gly en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID N°: 8, más específicamente, Cys en el resto 132.

55 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico basándose en que el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His, o Gly en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), más específicamente, Cys en el resto 132.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

60 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un glioma, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), más específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo
65 codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), más específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser; o Lys o Met.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), más específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser; o Lys o Met.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), más específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22). En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es la AML, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), más específicamente Lys, Gly, Met, o ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Gly en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), más específicamente Lys o Met.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), más específicamente Lys o Met.

- 5 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 10 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), más específicamente Lys, Gly, Met, Trp o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.
- 15 En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Gly en el resto 172.

- 20 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), en realizaciones específicas, Lys o Met.

- 25 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), en realizaciones específicas, Lys o Met.

- 30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 35 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.

- 40 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento pueden dar como resultado efectos secundarios reducidos en relación con otros métodos conocidos para tratar el cáncer.

- 45 Los agentes terapéuticos y los métodos de evaluación de sujetos descritos en el presente documento pueden combinarse con otras modalidades terapéuticas, *por ejemplo*, con tratamientos conocidos en la técnica.

- 50 El método puede comprender 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 el establecimiento de niveles terapéuticos) del segundo tratamiento puede: comenzar antes del inicio o tratamiento con (o antes del establecimiento de niveles terapéuticos de) el inhibidor; comenzar después del inicio o tratamiento con (o después del establecimiento de niveles terapéuticos de) el inhibidor, o puede administrarse simultáneamente con el inhibidor, *por ejemplo*, alcanzar 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 la tirosina quinasa HER1/EGFR, *por ejemplo*, erlotinib, *por ejemplo*, Tarceva®.

La segunda terapia, *por ejemplo*, en el caso de glioma, puede comprender la implantación de BCNU o carmustina en el cerebro, *por ejemplo*, implantación de una oblea de Gliadel®.

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

- 65 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es cáncer de próstata y la segunda terapia comprende uno o más de: ablación de andrógenos; administración de un estabilizador de microtúbulos, *por ejemplo*, docetaxol, *por ejemplo*, Taxotere®; o administración de un inhibidor de topoisomerasa II, *por ejemplo*, mitoxantrona.

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:

- 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 asparagina,

- por ejemplo*, asparaginasa; una antraciclina; o un antimetabolito, *por ejemplo*, metotrexato, *por ejemplo*, metotrexato intratecal, o 6-mercaptopurina;
- tratamiento de fase de consolidación que comprende la administración de uno o más de: un medicamento mencionado 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 anti-metabolito, *por ejemplo*, AraC o citarabina; o un inhibidor de la topoisomerasa I, *por ejemplo*, etopósido; o
- tratamiento en fase de mantenimiento que comprende la administración de uno o más de los medicamentos enumerados anteriormente para el tratamiento en fase de inducción o consolidación.
- 10 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es la AML y la segunda terapia comprende la administración de uno o más de: un inhibidor de la topoisomerasa II, *por ejemplo*, daunorrubicina, idarrubicina, topotecán o mitoxantrona; un inhibidor de la topoisomerasa I, *por ejemplo*, etopósido; o un anti-metabolito, *por ejemplo*, AraC o citarabina.
- 15 En otro aspecto, las características de la invención, un método de evaluación, *por ejemplo*, diagnosticando, un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto que no tiene, o no se diagnostica que tiene, aciduria 2-hidroxiglutarica. El método comprende analizar un parámetro relacionado con el genotipo o fenotipo neoactivo del sujeto, *por ejemplo*, analizando uno o más de:
- 20 a) la presencia, distribución, o nivel de un producto neoactivo, *por ejemplo*, el producto de una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, un mayor nivel de producto, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG (como se usa en el presente documento, un nivel aumentado de un producto de una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o término similar, *por ejemplo*, un mayor nivel de producto neoactivo o producto neoactivo, significa aumento en comparación con una referencia, *por ejemplo*, el nivel observado en una célula de otro modo similar que carece de la mutación IDH, *por ejemplo*, la mutación IDH1 o IDH2, o en un tejido o producto de un sujeto que tiene la mutación (los términos aumentado y elevado en relación con el nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxilo como se usa en el presente documento, se usan indistintamente);
- 25 b) la presencia, distribución, o nivel de una neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, de una IDH1 o IDH2, proteína mutante;
- 30 c) la presencia, distribución, o nivel de una proteína mutante neoactiva, *por ejemplo*, una IDH, *por ejemplo*, una IDH1 o IDH2, proteína mutante que tiene una neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, o un ARN correspondiente; o
- 35 d) la presencia de un alelo somático seleccionado o mutación que confiere neoactividad, *por ejemplo*, una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, que codifica una proteína con una neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un alelo descrito en el presente documento, en células caracterizadas por un trastorno relacionado con la proliferación celular del sujeto, evaluando de ese modo al sujeto.
- 40 En una realización el análisis comprende realizar un procedimiento, *por ejemplo*, un ensayo, para proporcionar datos o información en uno o más de a-d, *por ejemplo*, realizar un método que resulte en un cambio físico en una muestra, en el sujeto, o en un dispositivo o reactivo usado en el análisis, o que resulte en la formación de una imagen representativa de los datos. Métodos de obtención y análisis de muestras, y análisis *in vivo* en sujetos, descritos en otra parte en el presente documento, *por ejemplo*, en la sección titulada, "Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos", se pueden combinar con este método. En otra realización el análisis comprende recibir datos o información de dicha prueba de otra parte. En una realización el análisis comprende recibir datos o información de dicha prueba de otra parte y, el método comprende, sensible a esos datos o información, administrar un tratamiento al sujeto.
- 45 Como se describe en el presente documento, la evaluación se puede utilizar en una serie de aplicaciones, *por ejemplo*, para diagnóstico, el pronóstico, clasificación, determinación de la eficacia del tratamiento, selección de patentes, o selección de medicamentos.
- 50 Así, en una realización el método comprende además, *por ejemplo*, sensible al análisis de uno o más de a-d:
- 55 diagnosticar al sujeto, *por ejemplo*, diagnosticar al sujeto con un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, cáncer, o un trastorno precanceroso;
- 60 clasificar al sujeto, *por ejemplo*, determinar la etapa de un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, cáncer, o un trastorno precanceroso;
- proporcionar un pronóstico para el sujeto, *por ejemplo*, proporcionar un pronóstico para un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, cáncer, o un trastorno precanceroso;
- determinar la eficacia de un tratamiento, *por ejemplo*, la eficacia de un agente quimioterapéutico, irradiación o cirugía;
- 65 determinar la eficacia de un tratamiento con un agente terapéutico, *por ejemplo*, un inhibidor, descrito en el

presente documento;

seleccionar el sujeto para un tratamiento para un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno caracterizado por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, cáncer, o un trastorno precanceroso. La selección se puede basar en la necesidad de una reducción de la neoactividad o en la necesidad de mejorar una condición asociada con la neoactividad o como resultado de esta. Por ejemplo, si 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 aumentados de un producto alfa hidroxilo neoactivo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o por una IDH1 o IDH2 mutante, que tiene neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, 2HG, neoactividad, seleccionar el sujeto para el 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 ácido nucleico) de la neoactividad de ese mutante (*por ejemplo*, conversión de alfa-cetoglutarato a 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, distribución, o nivel de un producto de neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG;

proporcionar una recomendación para tratamiento del sujeto; o

memorizar un resultado de, o rendimiento de, el método, *por ejemplo*, una medición realizada en el curso de la ejecución del método, y opcionalmente transmitir la memorialización a una parte, *por ejemplo*, el sujeto, un proveedor de atención médica o una entidad que paga por el tratamiento del sujeto, *por ejemplo*, un gobierno, compañía de seguros u otro pagador externo.

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

Así, En una realización el resultado de la evaluación, *por ejemplo*, un aumento del nivel de un producto de neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, la presencia de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, neoactividad, *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, la presencia de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína mutante (o ARN correspondiente) que tiene neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, la presencia de un alelo mutante de IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, que tiene neoactividad hidroxilo alfa, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un alelo descrito en el presente documento, es indicativo de:

un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, cáncer, *por ejemplo*, es indicativo de una lesión primaria o metastásica;

la etapa de un trastorno relacionado con la proliferación celular;

un pronóstico o resultado para un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, es indicativo de una forma menos agresiva del trastorno, *por ejemplo*, cáncer. *Por ejemplo*, en el caso de glioma, presencia de un producto de neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, puede indicar una forma menos agresiva del cáncer;

la eficacia de un tratamiento, *por ejemplo*, la eficacia de un agente quimioterapéutico, irradiación o cirugía;

la necesidad de una terapia descrita en el presente documento, *por ejemplo*, inhibición de una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante neoactivo descrito en el presente documento. En una realización los niveles relativamente más altos (o la presencia del mutante) se correlacionan con la necesidad de inhibición de una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante descrito en el presente documento; o

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

Como se describe en el presente documento, la evaluación puede prever la selección de un tema.

Así, en una realización el método comprende, *por ejemplo*, sensible al análisis de uno o más de a-d, seleccionar un sujeto, *por ejemplo*, para un tratamiento. El sujeto se puede seleccionar sobre una base descrita en el presente documento, *por ejemplo*, basándose en que:

dicho sujeto está en riesgo o tiene, niveles más altos de lo normal de un producto de neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, 2-hydroxyglutarate (*por ejemplo*, R-2HG) en células que tienen un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, una leucemia como AML o ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, o una lesión tumoral, *por ejemplo*, un glioma o un tumor de próstata;

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

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

dicho sujeto tiene un trastorno relacionado con la proliferación;

dicho sujeto necesita o puede beneficiarse de, un agente terapéutico de un tipo descrito en el presente

documento;

dicho sujeto necesita o puede beneficiarse de, un compuesto que inhibe la neoactividad del hidroxilo alfa, *por ejemplo*, neoactividad 2HG;

dicho sujeto necesita o puede beneficiarse de, un compuesto que reduce el nivel de un producto de neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización la evaluación comprende seleccionar el sujeto, *por ejemplo*, para el tratamiento con un agente antineoplásico, en el establecimiento o determinación de que, el sujeto tiene aumento del producto neoactivo alfa hidroxilo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o neoactividad de hidroxilo alfa incrementada, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, o que el sujeto necesita inhibición de una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante descrito en el presente documento.

Como se describe en el presente documento, Las evaluaciones proporcionadas por los métodos descritos en el presente documento permiten la selección de regímenes de tratamiento óptimos.

Así, el método puede comprender, *por ejemplo*, sensible al análisis de uno o más de a-d, seleccionar un tratamiento para el sujeto, *por ejemplo*, seleccionar un tratamiento basándose en lo desvelado en el presente documento. El tratamiento puede ser la administración de un agente terapéutico desvelado en el presente documento. El tratamiento se puede seleccionar basándose en que:

es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizado por uno o más de neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, una IDH1 o IDH2, proteína mutante que tiene neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, neoactividad 2HG (o un ARN correspondiente); es útil en el tratamiento de un trastorno caracterizado por un alelo somático seleccionado o mutación de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, que codifica una proteína con neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un alelo descrito en el presente documento, en células caracterizadas por un trastorno relacionado con la proliferación celular del sujeto; reduce el nivel de un producto neoactivo hidroxilo alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG; reduce el nivel de neoactividad hidroxilo alfa, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

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

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

Los métodos también pueden incluir tratar un sujeto, *por ejemplo*, con un tratamiento seleccionado en respuesta a, o basándose en, una evaluación realizada en el método.

Así, el método puede comprender, *por ejemplo*, sensible 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.

El agente terapéutico puede comprender un compuesto de la Tabla 24a o la Tabla 24b o un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (X) o (XI) descrita a continuación.

El agente terapéutico puede comprender ácido nucleico, *por ejemplo*, ARNs, *por ejemplo*, un ARNs descrito en el presente documento.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor, *por ejemplo*, un polipéptido, péptido, o molécula pequeña (*por ejemplo*, un molécula de menos de 1.000 daltons), o aptómero, que se une a un mutante IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, un aptómero que se une a un mutante IDH1) o una subunidad de tipo silvestre e inhibe la neoactividad, *por ejemplo*, al inhibir la formación de un dímero, *por ejemplo*, un homodímero de subunidades IDH1 o IDH2 mutantes (*por ejemplo*, un homodímero de subunidades IDH1 mutantes) o un heterodímero de un mutante y una subunidad de tipo silvestre.

El inhibidor puede ser un polipéptido. El polipéptido puede actuar como un dominante negativo con respecto a la neoactividad de la enzima mutante. El polipéptido puede corresponder a la longitud completa IDH1 o IDH2 o un fragmento de la misma (*por ejemplo*, el polipéptido corresponde a IDH1 de longitud completa o un fragmento del mismo). El polipéptido no necesita ser idéntico con los restos correspondientes de tipo silvestre IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, tipo silvestre IDH1), pero puede tener al menos 60, 70, 80, 90 o 95 % homología con tipo silvestre IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, IDH1 tipo silvestre).

El agente terapéutico puede disminuir la afinidad de una IDH, *por ejemplo*, proteína mutante neoactiva de IDH1 o IDH2 para NADH, NADPH o un ion metálico divalente, *por ejemplo*, Mg^{2+} o Mn^{2+} , o disminuye los niveles o la disponibilidad de NADH, NADPH o ion metálico divalente, *por ejemplo*, Mg^{2+} o Mn^{2+} , *por ejemplo*, compitiendo por la unión a la enzima mutante. La enzima puede inhibirse reemplazando Mg^{2+} o Mn^{2+} con Ca^{2+} .

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel de neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce el nivel del producto de un mutante que tiene una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, mutante IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, reduce el nivel de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

5 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que:

inhibe, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG; o

10 inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

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

15 inhibe, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento *por ejemplo*, neoactividad 2HG; o

inhibe tanto la actividad de tipo silvestre como la neoactividad de una IDH1, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

20 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteínas o ARNm.

El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une a, el IDH mutante, *por ejemplo*, ARNm de IDH1 o IDH2.

25 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une a, el IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína.

30 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que reduce la cantidad de actividad enzimática neoactiva, *por ejemplo*, interactuando con, *por ejemplo*, unión a, IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína. 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, el ARN mutante, *por ejemplo*, ARNm de IDH1 mutante.

35 El agente terapéutico puede ser un inhibidor que interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une, ya sea el IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína o interactúa directamente con, *por ejemplo*, se une, el ARNm de IDH mutante. *por ejemplo*, ARNm de IDH1 o IDH2.

El agente terapéutico se puede administrar.

40 El tratamiento puede inhibir, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, una neoactividad de IDH1), *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento; o inhibir tanto el tipo silvestre como la actividad y una neoactividad de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, una neoactividad de IDH1), *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento. En una realización, el sujeto es evaluado o monitorizado

45 posteriormente con un método descrito en el presente documento, *por ejemplo*, el análisis de la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, para evaluar la respuesta al tratamiento o progresión de la enfermedad.

50 El tratamiento se puede elegir basándose en que: inhibe, *por ejemplo*, de manera específica, una neoactividad de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, una neoactividad de IDH1), *por ejemplo*, neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG; o inhibe el tipo silvestre como la actividad y una neoactividad de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, una neoactividad de IDH1), *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento.

55 En una realización, el método comprende determinar la posibilidad de una mutación distinta de una mutación en IDH1 o en IDH2. En realizaciones un nivel relativamente alto de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG es indicativo de otra mutación.

En una realización, cuya realización incluye seleccionar o administrar un tratamiento al sujeto, el sujeto:

60 aún no se ha tratado para el sujeto el trastorno relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado es el tratamiento inicial o de primera línea;

ya se ha tratado para el tratamiento relacionado con la proliferación celular y el tratamiento seleccionado o administrado da como resultado una alteración del tratamiento existente;

65 ya ha sido tratado por la proliferación celular relacionada, y el tratamiento seleccionado da como resultado la continuación del tratamiento existente; o

ya ha sido tratado por 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 alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

5 En una realización, cuya realización incluye seleccionar o administrar un tratamiento al sujeto, el tratamiento seleccionado o administrado puede comprender: un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico a dosificación diferente, *por ejemplo*, una dosificación 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 alfa hidroxil, *por ejemplo*,

10 2HG, *por ejemplo*, R-2HG);

un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico a una frecuencia diferente, *por ejemplo*, más o menos frecuentemente, o nada (*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 alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG); o un tratamiento que incluye la administración de un agente terapéutico en un entorno terapéutico diferente (*por ejemplo*, añadir o eliminar 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 alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG).

Los métodos para evaluar un sujeto descrito en el presente documento pueden comprender evaluar un genotipo o fenotipo de neoactividad. Métodos de obtención y análisis de muestras, y análisis *in vivo* en sujetos, descritos en otra parte en el presente documento, *por ejemplo*, en la sección titulada, "Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos", se pueden combinar con este método.

El método puede comprender:

someter al sujeto (*por ejemplo*, un sujeto que no tiene aciduria 2-hidroxiglutarica) para análisis de imágenes y/o espectroscópico, *por ejemplo*, análisis basado en resonancia magnética, *por ejemplo*, MRI y/o MRS *por ejemplo*, análisis de imágenes, para proporcionar una determinación de la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, como asociado con un tumor, *por ejemplo*, un glioma, en el sujeto;

opcionalmente almacenando un parámetro relacionado con la determinación, *por ejemplo*, la imagen o un valor relacionado con la imagen del análisis de imágenes, en un medio tangible; y

sensible a la determinación, realizando uno o más de: correlacionar la determinación con el resultado o con un pronóstico; proporcionar una indicación de resultado o pronóstico; proporcionar un valor para un análisis en el que se basa la evaluación, *por ejemplo*, la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG; proporcionar una recomendación para tratamiento del sujeto; seleccionar un curso de tratamiento para el sujeto, *por ejemplo*, un curso de tratamiento descrito en el presente documento, *por ejemplo*, seleccionar un curso de tratamiento que incluya la inhibición de una neoactividad de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento; administrar un curso de tratamiento al sujeto, *por ejemplo*, un curso de tratamiento descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un curso de tratamiento que incluye la inhibición de una neoactividad de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento; y memorizar un resultado del método o una medición realizada en el curso del método, *por ejemplo*, uno o más de los anteriores y/o transmisión de memorialización de uno o más de los anteriores a una parte, *por ejemplo*, el sujeto, un proveedor de atención médica o una entidad que paga por el tratamiento del sujeto, *por ejemplo*, un gobierno, compañía de seguros u otro pagador externo.

En una realización el método comprende confirmar o determinar, *por ejemplo*, por examen directo o evaluación del sujeto, o muestra *por ejemplo*, tejido o fluido corporal (*por ejemplo*, sangre (*por ejemplo*, plasma sanguíneo), orina, linfa, o líquido cefalorraquídeo) del mismo, (*por ejemplo*, por secuenciación de ADN o inmunoanálisis o evaluación de la presencia, distribución o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG), o recibir dicha información sobre el sujeto, que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), en realizaciones específicas, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu en el resto 132 o un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132; o un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

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

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, o mielodisplasia o síndrome mielodisplásico y la evaluación es a o b. En una realización el método comprende evaluar una muestra, *por ejemplo*, una muestra descrita en el presente documento, *por ejemplo*, un tisú, *por ejemplo*, una muestra de cáncer, o un

fluido corporal, *por ejemplo*, suero o sangre, para aumento de producto de neoactividad alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

5 En una realización, un sujeto se somete a MRS y la evaluación comprende evaluar la presencia o la cantidad elevada de un pico correlacionado o que corresponde a 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, según lo determinado por la resonancia magnética. Por ejemplo, un sujeto puede ser analizado para determinar la presencia y/o la potencia 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.

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

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

20 En una realización un valor para un parámetro correlacionado con la presencia, distribución, o nivel, *por ejemplo*, de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, se determina. Se puede comparar con un valor de referencia, *por ejemplo*, el valor para un sujeto de referencia que no tiene presencia anormal, nivel, o distribución, *por ejemplo*, una célula objeto de referencia que no tiene una mutación en IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, teniendo una neoactividad descrita en el presente documento.

25 En una realización el método comprende determinar si una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo mutante que está asociado con la neoactividad 2HG está presente. Por ejemplo, en el caso de IDH1, se puede determinar la presencia de una mutación en el resto 132 asociado con la neoactividad 2HG. En el caso de IDH2, se puede determinar la presencia de una mutación en el resto 172 asociado con la neoactividad 2HG. La determinación puede comprender la secuenciación de un ácido nucleico, *por ejemplo*, ADN genómico o ADNc, de una célula afectada, que codifica el (los) aminoácido(s) relevante(s). La mutación puede ser una delección, inserción, reordenación, o sustitución. La mutación puede implicar un solo nucleótido, *por ejemplo*, una sola sustitución, o más de un nucleótido, *por ejemplo*, una supresión de más de un nucleótido.

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

35 En una realización el método comprende determinar la secuencia de aminoácidos, *por ejemplo*, por secuenciación de ADN, en la posición 172 del gen IDH2 en una célula caracterizada por el trastorno relacionado con la proliferación celular.

40 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.

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

50 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer, *por ejemplo*, un cáncer descrito en el presente documento, caracterizado por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el tumor se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.

55 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de neoactividad alfa hidroxil, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

60 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un tumor del SNC, *por ejemplo*, un glioma, *por ejemplo*, en donde el tumor se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. Los gliomas incluyen tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, tumores oligoastrocíticos, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas. En una realización el tumor se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene otro que no es una Arg en el resto 132. Por ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21). En una realización el alelo codifica una

IDH1 que tiene His en el resto 132. En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el resto 132.

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

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu; o His o Cys).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de neoactividad alfa hidroxilado, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización, el trastorno de la proliferación celular es fibrosarcoma o paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización, el trastorno de la proliferación celular es fibrosarcoma o paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización, el trastorno de la proliferación celular es fibrosarcoma o paraganglioma en donde el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de neoactividad alfa hidroxilado, producto, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es el cáncer de próstata localizado o metastásico, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, *por ejemplo*, en donde el cáncer se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo.

Por ejemplo, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene otro que no es una Arg en el resto 132. *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, 2009, Int. J. Cancer, 125: 353-355 en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132.

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

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His o Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene cáncer de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

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 un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxilado, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. En una

realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para un producto de neoactividad alfa incrementada, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

5 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia linfoblástica aguda (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), *por ejemplo*, en donde la leucemia linfoblástica aguda (a veces denominada en el presente documento ALL) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. El 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 alfa hidroxil, *por ejemplo*, HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el resto 132.

15 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

20 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, caracterizado por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

25 En una realización el método comprende seleccionar un ALL objeto, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

30 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es leucemia mielógena aguda. (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), *por ejemplo*, en donde la leucemia mielógena aguda (a veces denominada en el presente documento AML) se caracteriza por un mutante somático IDH1 que tiene neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el cáncer se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no enfermas del mismo tipo. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21) (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val o Leu). En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el resto 132, de manera específica, Cys.

40 En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

45 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoplástica mielógena aguda (AML) caracterizada por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID N°: 8, de manera específica, Cys.

50 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoplástica mielógena aguda (AML) basándose en el cáncer que se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys, His o Gly en el resto 132 (SEQ ID NO: 8), específicamente, Cys.

55 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga leucemia linfoplástica mielógena aguda (AML), basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para aumentar el producto de neoactividad alfa, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

El método puede comprender la evaluación del sujeto por la presencia de una mutación en el gen NRAS o NPMc.

60 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 tener un mutante somático IDH1 con neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. En una realización el trastorno se caracteriza por niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en comparación con las células no liberadas del mismo tipo. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 es una IDH1 que tiene otro que no es Arg en el resto 132 (SEQ ID NO: 8). *Por ejemplo*, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Kang *et al.*, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21), específicamente, His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu. En

una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Cys en el resto 132.

En una realización el alelo IDH1 tiene una T (o cualquier otro nucleótido distinto de C) en la posición de nucleótido 394. En una realización el alelo es una mutación C394T de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5.

5 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico caracterizado por un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

10 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico basándose en que el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene Cys en el resto 132 (SEQ ID NO: 8).

15 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para un producto de neoactividad alfa incrementada, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

20 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un glioma, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica
25 una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser; o Lys o Met.

30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser; o Lys o Met.

35 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga un glioma, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

40 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2
45 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

50 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

55 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene un cáncer de próstata, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

60 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto
65 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- 5 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- 10 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para un producto de neoactividad alfa incrementada, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 15 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es la AML, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2 asociado con una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

- 25 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- 30 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tiene AML, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para un producto de neoactividad alfa incrementada, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 35 En una realización el trastorno relacionado con la proliferación celular es mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, caracterizado por una mutación, o alelo preseleccionado, de IDH2. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH2 codifica una IDH2 que tiene otro que no es un Arg en el resto 172. *Por ejemplo*, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172. En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

- 45 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, en donde el cáncer se caracteriza por tener un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene Lys o Met en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

- 50 En una realización el método comprende seleccionar un sujeto que tenga mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, basándose en que el cáncer se caracteriza por un aumento de los niveles de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el método comprende evaluar una muestra de suero o sangre para un producto de neoactividad alfa incrementada, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG.

- 55 Además se describe una composición farmacéutica de un inhibidor (*por ejemplo*, una pequeña molécula o un inhibidor a base de ácido nucleico) descrito en el presente documento.

- 60 Un reactivo específico de proteína mutante descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH1-R132H, se puede usar para detectar enzimas mutantes neoactivas véase, *por ejemplo*, lo descrito por Y.Kato *et al.*, "A monoclonal antibody IMAb-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation: (Kato, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009).

- 65 Además se describe un método para evaluar un compuesto candidato, *por ejemplo*, por la capacidad de inhibir una neoactividad de una enzima mutante, *por ejemplo*, para usar como agente antiproliferativo o contra el cáncer. La enzima mutante puede ser una IDH, *por ejemplo*, un mutante IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, un mutante descrito en el

presente documento.

La neoactividad puede ser neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. El método comprende:

- 5 suministrar opcionalmente el compuesto candidato;
poner en contacto el compuesto candidato con una enzima mutante que tiene una neoactividad, o con otra enzima, denominada en el presente documento enzima proxy, que tiene una actividad, denominada en el presente documento actividad proxy, que es la misma que la neoactividad (o con una célula o lisado celular que comprende el mismo); y
- 10 evaluar la capacidad del compuesto candidato para modular, *por ejemplo*, inhibir o promover, la neoactividad o la actividad proxy,

evaluando así el compuesto candidato.

- 15 La enzima mutante puede ser una IDH1 mutante, *por ejemplo*, una IDH1 mutante escrita en el presente documento, y la neoactividad es una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. Las mutaciones asociadas con la neoactividad 2HG en IDH1 incluyen mutaciones en el resto 132, *por ejemplo*, R132H, R132C, R132S, R132G, R132L, o R132V, más específicamente, R132H o R132C.
- 20 La enzima mutante puede ser una IDH2 mutante, *por ejemplo*, una IDH2 mutante descrita en el presente documento, y la neoactividad es una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. Las mutaciones asociadas con la neoactividad 2HG en IDH2 incluyen mutaciones en el resto 172, *por ejemplo*, R172K, R172M, R172S, R172G, o R172W.
- 25 El método puede incluir evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la actividad neoactiva o la actividad proxy.

- El método puede comprender además evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la reacción hacia adelante de actividad enzimática no mutante o de tipo silvestre, *por ejemplo*, en el caso de IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato (o un intermedio del mismo, incluyendo el intermedio hidroxilo reducido).
- 30

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

- La célula puede comprender una mutación, o alelo preseleccionado, de un gen IDH1 mutante. *Por ejemplo*, en una realización, el alelo IDH1 codifica una IDH1 que tiene otro que no es una Arg en el resto 132. Por ejemplo, el alelo puede codificar His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier otro resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21), específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu.
- 40

El alelo puede codificar una IDH1 que tiene His en el resto 132.

- 45 El alelo puede codificar una IDH 1 que tiene Ser en el resto 132.

El alelo puede ser una mutación Arg132His, o una mutación Arg132Ser, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véanse las FIGs. 2 y 21).

- 50 La célula puede comprender una mutación, o alelo preseleccionado, de un gen IDH2 mutante. Por ejemplo, el alelo IDH2 puede codificar una IDH2 que tiene otro que no sea Arg en el resto 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser.

- 55 El alelo puede codificar una IDH2 que tiene Lys en el resto 172.

El alelo puede codificar una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

- La célula puede incluir una copia heteróloga de un gen IDH mutante, *por ejemplo*, un gen mutante IDH1 o IDH2. (La copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación de ingeniería genética).
- 60

- La célula se puede transfectar (*por ejemplo*, transfectar de forma apropiada o estable) o transducir (*por ejemplo*, transducir transitorio o establemente) con una secuencia de ácido nucleico que codifica una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, descrita en el presente documento, *por ejemplo*, una IDH1 que no sea un Arg en el resto 132. La IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, puede estar etiquetada con epítopo, *por ejemplo*, etiquetada con myc.
- 65

La célula, *por ejemplo*, una célula cancerosa, puede ser no mutante o de tipo silvestre para el IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo. La célula puede incluir un mutante IDH 1 o IDH2 heterólogo.

5 La célula puede ser una célula cultivada, *por ejemplo*, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. La célula puede ser una célula cancerosa, *por ejemplo*, una célula de glioma (*por ejemplo*, un célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia (*por ejemplo*, un ALL, *por ejemplo*, B-ALL o TALL, célula o célula de AML) o una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico. La célula puede ser una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (*por ejemplo*, ATCC HTB-14 o CRL-2610).

10 La célula puede ser de un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto que tiene cáncer, *por ejemplo*, un cáncer caracterizado por una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8); específicamente His o Cys; o un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser.

15 La etapa de evaluación puede comprender evaluar la presencia y/o la cantidad de un producto alfa hidroxilo neoactivo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, *por ejemplo*, en el lisado celular o medio de cultivo, *por ejemplo*, mediante LC-MS.

20 La etapa de evaluación puede comprender evaluar la presencia y/o la cantidad de una neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, En el lisado celular o medio de cultivo.

El método puede comprender además evaluar la presencia/cantidad de uno o más metabolitos de TCA, *por ejemplo*, citrato, α -KG, succinato, fumarato y/o malato, *por ejemplo*, por LC-MS, *por ejemplo*, como control.

25 El método puede comprender además evaluar el estado de oxidación de NADPH, *por ejemplo*, la absorbancia a 340 nm, *por ejemplo*, por espectrofotómetro.

30 El método puede comprender además evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir una segunda actividad enzimática, *por ejemplo*, la reacción hacia adelante de la actividad enzimática de tipo no mutante o silvestre, *por ejemplo*, en el caso de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, IDH1), la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato (o un intermedio del mismo, incluido el intermedio hidroxilo reducido).

35 El compuesto candidato puede ser una molécula pequeña, un polipéptido, péptido, una molécula basada en carbohidratos, o un aptámero (*por ejemplo*, un aptámero de ácido nucleico, o un aptámero peptídico). El método se puede usar ampliamente y se puede usar, *por ejemplo*, como una o más de una identificación, para confirmar los candidatos producidos por este u otros métodos o identificaciones, o en general para guiar el descubrimiento de fármacos o la optimización del candidato a fármaco.

40 El método puede comprender evaluar, *por ejemplo*, confirmar, la capacidad de un compuesto candidato (*por ejemplo*, un compuesto candidato que cumple un nivel predeterminado de inhibición en la etapa de evaluación) para inhibir la neoactividad o actividad proxy en un segundo ensayo.

45 El segundo ensayo puede comprender repetir una o más de las etapas de contacto y/o evaluación del método básico.

50 El segundo ensayo puede ser diferente del primero. Por ejemplo, cuando el primer ensayo puede usar una célula o un lisado celular u otro modelo animal no completo, el segundo ensayo puede usar un modelo animal, *por ejemplo*, un modelo de trasplante de tumor, *por ejemplo*, un ratón que tiene una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, células mutantes o tumor trasplantados en ella. *Por ejemplo*, una célula U87, o glioma, *por ejemplo*, glioblastoma, célula, que alberga una IDH transfectada, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, El mutante neoactivo se puede implantar como un xenoinjerto y usar en un ensayo. El glioma humano primario o células tumorales de AML se pueden injertar en ratones para permitir la propagación del tumor y usarse en un ensayo. Un modelo de ratón diseñado genéticamente (GEMM) que alberga una mutación IDH1 o IDH2 y/u otra mutación, *por ejemplo*, una mutación nula p53, también se puede usar en un ensayo.

55 El método puede comprender:

60 suministrar opcionalmente el compuesto candidato;
poner en contacto el compuesto candidato con una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico, *por ejemplo*, una secuencia heteróloga, que codifica una IDH1 que tiene otra que no sea Arg en el resto 132 (*por ejemplo*, IDH1R132H) o una IDH2 que tiene otra que no sea Arg en el resto 172 (específicamente una IDH1 que tiene otra que no sea Arg en el resto 132); y
evaluar la presencia y/o cantidad de un producto de neoactividad alfa hidroxilo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en el lisado celular o medio de cultivo, por LC-MS, evaluando así el compuesto.

65 El resultado de la evaluación puede compararse con una referencia, *por ejemplo*, el nivel de producto, *por ejemplo*,

un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG. *por ejemplo*, R-2HG, en una célula de control, *por ejemplo*, una célula que haya insertado una copia de tipo silvestre o no mutante de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, IDH1).

Además se describe un método para evaluar un compuesto candidato, *por ejemplo*, por la capacidad de inhibir un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad, *por ejemplo*, para usar como agente antiproliferativo o contra el cáncer.

La enzima mutante puede ser una IDH, *por ejemplo*, un mutante IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. La neoactividad puede ser neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. El método comprende:

opcionalmente suministrando el compuesto candidato, *por ejemplo*, un inhibidor basado en ácido nucleico (*por ejemplo*, un ARNs (*por ejemplo*, ARNs_i o ARNs_h), un antisentido, o un microARN);

poner en contacto el compuesto candidato con un ARN, *por ejemplo*, un ARNm, que codifica IDH, *por ejemplo*, una IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad (o con una célula o lisado celular que comprende la misma); y evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir el ARN, evaluando así el compuesto candidato. Inhibir el ARN significa, *por ejemplo*, escindir o inactivar de otra manera el ARN.

El ARN puede codificar una fusión de todo o parte de la IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína de tipo silvestre o mutante a una segunda proteína, *por ejemplo*, una proteína indicadora, *por ejemplo*, una proteína fluorescente, *por ejemplo*, una proteína verde o roja fluorescente.

La enzima mutante puede ser una IDH1 mutante, *por ejemplo*, una IDH1 mutante escrita en el presente documento, y la neoactividad es una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

La enzima mutante puede ser una IDH2 mutante, *por ejemplo*, una IDH2 mutante descrita en el presente documento, y la neoactividad es una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

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

La célula puede comprender una mutación, o alelo preseleccionado, de un gen IDH1 mutante. Por ejemplo, el alelo IDH1 puede codificar una IDH1 que tiene otra que no sea Arg en el resto 132. Por ejemplo, el alelo puede codificar His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier otro resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21), específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu.

El alelo puede codificar una IDH1 que tiene His en el resto 132.

El alelo puede codificar una IDH1 que tiene Ser en el resto 132.

El alelo puede ser una mutación Arg132His, o una mutación Arg132Ser, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véanse las FIGs. 2 y 21).

La célula puede comprender una mutación, o alelo preseleccionado, de un gen IDH2 mutante. Por ejemplo, el alelo IDH2 puede codificar una IDH2 que tiene otro que no sea Arg en el resto 172. Por ejemplo, el alelo codifica Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase también la Fig. 22), específicamente Lys, Gly, Met, Trp o Ser.

El alelo puede codificar una IDH2 que tiene Lys en el resto 172.

El alelo puede codificar una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

La célula puede incluir una copia heteróloga de un gen IDH de tipo silvestre o mutante, *por ejemplo*, un gen de tipo silvestre o mutante IDH1 o IDH2. (La copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación de ingeniería genética).

El gen heterólogo puede comprender una fusión con una proteína indicadora, *por ejemplo*, una proteína fluorescente, *por ejemplo*, una proteína verde o roja fluorescente.

La célula se puede transfectar (*por ejemplo*, transfectar transitoria o establemente) o transducir (*por ejemplo*, transducir transitoria o establemente) con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, descrita en el presente documento, *por ejemplo*, una IDH 1 que tiene otra que no sea Arg en el resto 132 o una IDH2 que tiene otra que Arg en el resto 172 (*por ejemplo*, una IDH 1 que no sea una Arg en el resto 132). La IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, puede estar etiquetada con epítipo, *por ejemplo*, etiquetada con myc.

La célula, *por ejemplo*, una célula cancerosa, puede ser no mutante o de tipo silvestre para el IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo. La célula puede incluir un mutante IDH1 o IDH2 heterólogo.

La célula puede ser una célula cultivada, *por ejemplo*, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. La célula puede ser una célula cancerosa, *por ejemplo*, una célula de glioma (*por ejemplo*, un célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula leucémica (*por ejemplo*, un ALL, *por ejemplo*, célula B-ALL o TALL o células de AML) o una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico. La célula puede ser una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (*por ejemplo*, ATCC HTB-14 o CRL-2610).

La célula puede ser de un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto que tiene cáncer, *por ejemplo*, un cáncer caracterizado por una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8); específicamente His o Cys. El cáncer se puede caracterizar por un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10), específicamente Lys, Gly, Met, Trp, o Ser.

El método puede comprender un segundo ensayo y el segundo ensayo comprende repetir una o más de las etapas de contacto y/o evaluación del método básico.

El segundo ensayo puede ser diferente del primero. *Por ejemplo*, donde el primer ensayo puede usar una célula o un lisado celular u otro modelo animal no completo, el segundo ensayo puede usar un modelo animal

La eficacia del candidato puede evaluarse por su efecto sobre la actividad de la proteína informadora.

Además se describe un método para evaluar un compuesto candidato, *por ejemplo*, por la capacidad de inhibir la transcripción de un ARN que codifica una enzima mutante que tiene una neoactividad, *por ejemplo*, para usar como agente antiproliferativo o contra el cáncer.

La enzima mutante puede ser una IDH, *por ejemplo*, un mutante IDH1 o IDH2, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento. La neoactividad puede ser neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. El método comprende:

opcionalmente suministrando el compuesto candidato, *por ejemplo*, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptómero, una molécula basada en carbohidrato o una molécula basada en ácido nucleico; poner en contacto el compuesto candidato con un sistema que comprende una célula o lisado celular; y evaluar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la traducción de IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, ARN, *por ejemplo*,

evaluando así el compuesto candidato.

El sistema puede comprender una codificación de gen de fusión de todo o parte de la IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína de tipo silvestre o mutante a una segunda proteína, *por ejemplo*, una proteína indicadora, *por ejemplo*, una proteína fluorescente, *por ejemplo*, una proteína verde o roja fluorescente.

La enzima mutante puede ser una IDH1 mutante, *por ejemplo*, un mutante IDH1 descrito en el presente documento, y la neoactividad es neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

La enzima mutante puede ser una IDH2 mutante, *por ejemplo*, un mutante IDH2 descrito en el presente documento, y la neoactividad es neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El sistema puede incluir una copia heteróloga de un gen IDH de tipo silvestre o mutante, *por ejemplo*, un gen de tipo silvestre o mutante IDH1 o IDH2. (La copia heteróloga se refiere a una copia introducida o formada por una manipulación de ingeniería genética).

El gen heterólogo puede comprender una fusión con una proteína indicadora, *por ejemplo*, una proteína fluorescente, *por ejemplo*, una proteína verde o roja fluorescente.

La célula, *por ejemplo*, una célula cancerosa, puede ser no mutante o de tipo silvestre para el IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo. La célula puede incluir un mutante IDH1 o IDH2 heterólogo.

La célula puede ser una célula cultivada, *por ejemplo*, una célula primaria, una célula secundaria, o una línea celular. La célula puede ser una célula cancerosa, *por ejemplo*, una célula de glioma (*por ejemplo*, un célula de glioblastoma), una célula de cáncer de próstata, una célula de leucemia (*por ejemplo*, un ALL, *por ejemplo*, B-ALL o TALL, célula o célula de AML) o una célula caracterizada por mielodisplasia o síndrome mielodisplásico. La célula puede ser una célula 293T, una célula U87MG, o una célula LN-18 (*por ejemplo*, ATCC HTB-14 o CRL-2610).

La célula puede ser de un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto que tiene cáncer, *por ejemplo*, un cáncer caracterizado por

una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, alelo descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en el resto 132 (SEQ ID NO: 8); específicamente His, Ser, Cys, Gly, Val, o Leu. El cáncer puede caracterizarse como un alelo IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en el resto 172 (SEQ ID NO: 10).

5

El método puede comprender un segundo ensayo y el segundo ensayo comprende repetir el método.

El segundo ensayo puede ser diferente del primero. *Por ejemplo*, donde el primer ensayo puede usar una célula o un lisado celular u otro modelo animal no completo, el segundo ensayo puede usar un modelo animal.

10

La eficacia del candidato puede evaluarse por su efecto sobre la actividad de la proteína informadora.

Además se describe un método para evaluar un compuesto candidato, *por ejemplo*, un agente terapéutico, o inhibidor, descrito en el presente documento en un modelo animal. El compuesto candidato puede ser, *por ejemplo*, una molécula pequeña, polipéptido, péptido, aptómero, una molécula basada en carbohidrato o una molécula basada en ácido nucleico. El método comprende, contactar al candidato con el modelo animal y evaluar el modelo animal.

15

La evaluación puede comprender

20

determinar un efecto del compuesto sobre la salud general del animal;

determinar un efecto del compuesto sobre el peso del animal;

determinar un efecto del compuesto sobre la función hepática, *por ejemplo*, en una enzima hepática;

determinar un efecto del compuesto sobre el sistema cardiovascular del animal;

determinar un efecto del compuesto sobre la neurofunción, *por ejemplo*, en el control o respuesta neuromuscular;

25

determinar el efecto del compuesto en comida o 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 plasmática; o

determinar un efecto del compuesto sobre una célula seleccionada en el animal;

30

determinar un efecto del compuesto sobre el crecimiento, tamaño, el peso, invasividad u otro fenotipo de un tumor, *por ejemplo*, un tumor endógeno o un tumor derivado de la introducción de células de la misma especie o de una diferente.

El animal puede ser un primate no humano, *por ejemplo*, un mono cinomolgus o chimpancé.

35

El animal puede ser un roedor, *por ejemplo*, una rata o un ratón.

El animal puede ser un animal grande, *por ejemplo*, un perro o cerdo, que no sea un primate no humano.

40

La evaluación puede ser memorizada y opcionalmente transmitida a otra parte.

Además se describe un método para evaluar o procesar un agente terapéutico, *por ejemplo*, un agente terapéutico mencionado en el presente documento, *por ejemplo*, un agente terapéutico que da como resultado una disminución del nivel de un producto de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante que tiene una neoactividad. La neoactividad puede ser una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, y el nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, disminuye.

45

El método incluye:

50

proporcionar, *por ejemplo*, probando una muestra, un valor (*por ejemplo*, un valor de ensayo) para un parámetro relacionado con una propiedad del agente terapéutico, *por ejemplo*, la capacidad de inhibir la conversión de alfa cetoglutarato en 2 hidroxiglutarato (es decir, 2HG), *por ejemplo*, R-2 hidroxiglutarato (es decir, R-2HG), y,

opcionalmente, proporcionar una determinación de si el valor determinado para el parámetro cumple con un criterio preseleccionado, *por ejemplo*, está presente, o está presente dentro de un intervalo preseleccionado,

55

evaluando o procesando de ese modo el agente terapéutico.

El agente terapéutico puede ser aprobado para su uso en seres humanos por una agencia gubernamental, *por ejemplo*, la FDA.

60

El parámetro se puede correlacionar con la capacidad de inhibir la neoactividad 2HG, y, *por ejemplo*, el agente terapéutico es un inhibidor que se une a la proteína IDH1 o IDH2 y reduce la neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El parámetro puede estar correlacionado con el nivel de IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína, y, *por ejemplo*, el agente terapéutico es un inhibidor que reduce el nivel de proteína mutante IDH1 o IDH2.

65

El parámetro puede estar correlacionado con el nivel de un ARN que codifica una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína, y, *por ejemplo*, el agente terapéutico reduce el nivel de ARN, *por ejemplo*, ARNm, que codifica la proteína mutante IDH1 o IDH2.

- 5 El método puede incluir poner en contacto el agente terapéutico con una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína (o ARN correspondiente).

El método puede incluir proporcionar una comparación del valor determinado para un parámetro con un valor o valores de referencia, para evaluar así el agente terapéutico. La comparación puede incluir 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. El valor no tiene por qué ser un valor numérico pero, *por ejemplo*, puede ser simplemente una indicación de si una actividad está presente.

15 El método puede incluir 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 está dentro de un intervalo (ya sea inclusivo o exclusivo de uno o ambos puntos finales).

El valor de ensayo, o una indicación de si se cumple el criterio preseleccionado, se puede memorizar, *por ejemplo*, en un registro legible por ordenador.

20 Se puede tomar 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, transforma en un producto farmacológico, envía, traslada a una ubicación diferente, formula, etiqueta, empaqueta, se pone en contacto con, o se pone en, un recipiente, *por ejemplo*, un recipiente hermético a gas o líquido, se envía al comercio, o se vende u ofrece para venta, o se realiza un registro o se altera para reflejar la determinación, dependiendo de si se cumple el criterio preseleccionado. *Por ejemplo*, basándose en el resultado de la determinación o si una actividad está presente, o en comparación con un patrón de referencia, el lote del que se toma la muestra se puede procesar, *por ejemplo*, como se acaba de describir.

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

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden ser útiles desde el punto de vista del proceso, *por ejemplo*, para monitorizar o asegurar la consistencia o calidad de lote a lote, o para evaluar una muestra con respecto a una referencia, *por ejemplo*, un valor preseleccionado.

El método puede usarse para determinar si un lote de ensayo de un agente terapéutico puede tener una o más de las propiedades. Dichas propiedades pueden incluir una propiedad enumerada en el prospecto del producto de un agente terapéutico, una propiedad que aparece en un compendio, *por ejemplo*, la Farmacopea de Estados Unidos, o una propiedad requerida por una agencia reguladora, *por ejemplo*, la FDA, para uso comercial.

El método puede incluir probar el agente terapéutico por su efecto en la actividad de tipo silvestre de una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína, y proporcionar una determinación de si el valor determinado cumple con un criterio preseleccionado, *por ejemplo*, está presente, o está presente dentro de un intervalo preseleccionado.

45 El método puede incluir:

ponen en contacto un agente terapéutico que es un inhibidor de IDH1 y una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, con un mutante IDH1 que tiene una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, determinar un valor relacionado con la inhibición de una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, y comparar el valor determinado con un valor de referencia, *por ejemplo*, un intervalo de valores, para la inhibición de una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El valor de referencia puede ser un valor requerido por la FDA, *por ejemplo*, un criterio de liberación.

El método puede incluir:

60 puesta en contacto con un agente terapéutico que es un inhibidor del ARNm que codifica un mutante IDH1 que tiene una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, con un ARNm que codifica un mutante IDH1 que tiene una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, 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 inhibición del ARNm. El valor de referencia puede ser un valor requerido por la FDA, *por ejemplo*, un criterio de liberación.

Además se describe un método para evaluar una muestra de un agente terapéutico, *por ejemplo*, un agente terapéutico mencionado 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; presentar dicho registro a un responsable, *por ejemplo*, una agencia gubernamental, *por ejemplo*, la FDA; opcionalmente, recibir una comunicación de dicho responsable; opcionalmente, decidir si lanzar al mercado el lote de agente terapéutico basándose en la comunicación del responsable. El método puede incluir además la liberación, o el procesamiento de otra manera, *por ejemplo*, como se describe en el presente documento, la muestra.

Además se describe un método para seleccionar una clase de pago para tratamiento con un agente terapéutico descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un inhibidor de IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, neoactividad, 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 niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, una IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, (o un ARN correspondiente), o una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, gen somático, *por ejemplo*, un mutante descrito en el presente documento, y realizar al menos uno de (1) si el sujeto es positivo seleccionar una primera clase de pago, y (2) si el sujeto no es positivo seleccionar una segunda clase de pago.

La selección se puede memorizar, *por ejemplo*, en un sistema de registros médicos.

El método puede incluir la evaluación de si el sujeto es positivo para niveles aumentados de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, neoactividad 2HG.

El método puede incluir solicitar la evaluación.

La evaluación puede realizarse en el sujeto mediante un método descrito en el presente documento.

El método puede comprender comunicar la selección a otra parte, *por ejemplo*, mediante ordenador, disco compacto, teléfono, facsímil, correo electrónico, o carta.

El método puede comprender realizar o autorizar el pago de dicho tratamiento.

El pago puede ser realizado por una primera parte a una segunda parte.

La primera parte puede ser distinta al sujeto. La primera parte se puede seleccionar entre un tercer pagador, una compañía de seguros, empleador, plan de salud patrocinado por el empleador, HMO, o entidad gubernamental. La segunda parte se puede seleccionar entre el sujeto, un proveedor de atención médica, un médico tratante, un HMO, un hospital, una entidad gubernamental, o una entidad que vende o suministra el fármaco. La primera parte puede ser una compañía de seguros y la segunda parte se puede seleccionar entre el sujeto, un proveedor de atención médica, un médico tratante, un HMO, un hospital, una entidad gubernamental, o una entidad que vende o suministra el fármaco.

La primera parte puede ser una entidad gubernamental y la segunda parte se puede seleccionar entre el sujeto, un proveedor de atención médica, un médico tratante, un HMO, un hospital, una compañía de seguros, 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 una proliferación celular no deseada o por una predisposición a conducir a una proliferación celular no deseada (a veces denominado trastorno precanceroso). Los ejemplos de trastornos caracterizados por la 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 adulta o pediátrica) o ALL, *por ejemplo*, B-ALL o T-ALL (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), cáncer de próstata localizado o metastásico, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata, fibrosarcoma y paraganglioma; específicamente una leucemia, *por ejemplo*, AML (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica) o ALL, *por ejemplo*, BALL o T-ALL (*por ejemplo*, una forma adulta o pediátrica), cáncer de próstata localizado o metastásico, *por ejemplo*, adenocarcinoma de próstata. Los ejemplos de trastornos caracterizados por una predisposición a conducir a una proliferación celular no deseada incluyen mielodisplasia o síndrome mielodisplásico, que son una colección diversa de afecciones hematológicas marcadas por la producción ineficaz (o displasia) de células sanguíneas mieloides y el riesgo de transformación a AML.

Como se usa en el presente documento, inhibe específicamente una neoactividad (y un lenguaje similar), significa

que la neoactividad de la enzima mutante se inhibe en un grado significativamente mayor que la actividad de la enzima de tipo silvestre. A modo de ejemplo, "inhibe específicamente la neoactividad 2HG de IDH1 mutante (o IDH2)" significa que la neoactividad 2HG se inhibe en un grado significativamente mayor que la reacción directa (la conversión de isocitrato a alfa cetoglutarato) de la actividad IDH1 (o IDH2) de tipo silvestre. En realizaciones la reactividad se inhibe al menos 2, 5, 10 o 100 veces más que la actividad de tipo silvestre. En realizaciones, un inhibidor que es específico para la neoactividad 2HG de IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, también inhibirá otra deshidrogenasa, *por ejemplo*, malato deshidrogenasa. En otras realizaciones el inhibidor específico inhibe 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 esa mutación o alelo. En una realización al menos el 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 las células sanguíneas afectadas, llevan al menos una copia de la mutación o alelo. Un trastorno relacionado con la proliferación celular, caracterizado por una IDH mutante, *por ejemplo*, una IDH1 mutante o IDH2 mutante, que tiene neoactividad 2HG es ejemplar. En una realización la mutación o alelo está presente como un heterocigoto en las frecuencias indicadas.

Como se usa en el presente documento, una "SNP" es una variación de secuencia de ADN que ocurre 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 serán evidentes a partir de la descripción y las figuras, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1 representa la verificación de la secuencia de ADN de pET41a-IDH1 y alineación frente a CDS IDH1 publicados. 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.

FIG. 2 representa la verificación de la secuencia de ADN de R132S y R132H mutantes de acuerdo con la SEQ ID NO: 8. La secuencia de aminoácidos de IDH1 (SEQ ID NO: 8) se proporciona en la FIG. 21.

FIG. 3 muestra la separación de la proteína IDH1 de tipo silvestre en la columna de Ni-Sepharose.

FIG. 4 representa el análisis de proteínas de IDH1 de tipo silvestre en el gel de SDS antes y después del fraccionamiento en columna de Ni. T: proteína total; I: fracciones insolubles; S: fracción soluble; L: muestra para cargar en columna de Ni. Los números en la figura indican los números de fracciones. Las fracciones N.º 17 ~ N.º 27 se recogieron para una purificación adicional.

FIG. 5A representa la separación de la proteína IDH1 de tipo silvestre a través de la columna S-200 de SEC.

FIG. 5B representa el análisis de proteínas de IDH1 de tipo silvestre en el gel SDS antes y después del fraccionamiento en columna S-200. M: marcador de peso molecular; Ni: fracción de la columna de níquel antes de S-200; S200: fracción de la columna SEC.

FIG. 6 representa la separación de la proteína R132S mutante en la columna de Ni-Sepharose.

FIG. 7 representa el análisis de proteínas del mutante R132S en el gel SDS antes y después del fraccionamiento en columna de Ni. M: marcador proteico (KDa): 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 14,4; T: proteína celular total; Asi que: fracción soluble; En: fracción insoluble; Ft: flujo. N.º 3-N.º 7 indican los números de fracción eluida correspondientes.

FIG. 8A representa la separación de la proteína R132S mutante a través de la columna S-200 de SEC.

FIG. 8B representa el análisis de proteínas del mutante R132S en el gel SDS después del fraccionamiento de la columna S-200. M: marcador de peso molecular; R132S: fracción de la columna SEC.

FIG. 9 representa la separación de la proteína R132H mutante en la columna de Ni-Sepharose.

FIG. 10 representa el análisis de proteínas del mutante R132H en gel de SDS antes y después del fraccionamiento en columna de Ni. M: marcador proteico (KDa): 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4, 14,4; T: proteína celular total; Asi que: fracción soluble; En: fracción insoluble; Ft: flujo; N.º 5-N.º 10 indican los números de fracción eluidos correspondientes; Ni: muestra de la columna de Ni-Sepharose, grupo N.º 5-N.º 10 juntos.

FIG. 11A representa la separación de la proteína R132H mutante a través de la columna S-200 de SEC.

FIG. 11B representa el análisis de proteínas del mutante R132H en gel de SDS después del fraccionamiento de la columna S-200. M: marcador de peso molecular; R132H: fracción de la columna SEC.

FIG. 12A representa el gráfico de Michaelis-Menten de tipo silvestre IDH1 en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato.

FIG. 12B representa el gráfico de Michaelis-Menten de la enzima mutante R132H en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato.

FIG. 12C representa el gráfico de Michaelis-Menten de la enzima mutante R132S en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato.

FIG. 13A representa la inhibición de α -KG de IDH1 de tipo silvestre.

FIG. 13B representa la inhibición de α -KG de la enzima mutante R132H.

FIG. 13C representa la inhibición de α -KG de la enzima mutante R132S.

FIG. 14 representa el IDH1 wt, R132H, y R132S en la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato.

FIG. 15A representa la gráfica de la velocidad de concentración de sustrato para la enzima mutante R132H.

FIG. 15B representa la gráfica de velocidad de concentración de sustrato para la enzima mutante R132S.

FIG. 16 representa el IDH1 wt, R132H, y R132S en la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato con

NADH. FIG. 17A representa la inhibición de oxalomalato para IDH1 wt.

FIG. 17B representa la inhibición de oxalomalato para R132H.

FIG. 17C representa la inhibición de oxalomalato para R132S.

FIG. 18A representa el análisis de LC-MS/MS de la reacción de control.

FIG. 18B representa el análisis de LC-MS/MS de la reacción que contiene la enzima.

FIG. 18C muestra el análisis LC-MS/MS de la reacción de control enriquecida.

FIG. 19 representa el análisis de LC-MS/MS de alfa-hidroxiglutarato.

FIG. 20 muestra un análisis de LC-MS/MS que muestra que R132H consume α -KG para producir ácido 2-hidroxiglutarico.

FIG. 21 representa la secuencia de aminoácidos de IDH1 (SEQ ID NO: 13) como se describe en el N.º de Acceso de GenBank NP_005887.2 (GI N.º 28178825) (registro del 10 de mayo, 2009).

FIG. 21A es la secuencia de ADNc de IDH1 presentada en el N.º de Acceso de GenBank NM_005896.2 (Registro del 10 de mayo, 2009; GI No. 28178824) (SEQ ID NO: 8).

FIG. 21B representa la secuencia de ARNm de IDH1 como se describe en el N.º de Acceso de GenBank NM_005896.2 (Registro del 10 de mayo, 2009; GI N.º 28178824) (SEQ ID NO: 9).

FIG. 22 es la secuencia de aminoácidos de IDH2 tal como se presenta en el N.º de Acceso de GenBank NM_002168.2 (Registro del 16 de agosto, 2009; GI28178831) (SEQ ID NO: 10).

FIG. 22A es la secuencia de ADNc de IDH2 como se presenta en el N.º de Acceso de GenBank NM_002168 (Registro de fecha 16 de agosto, 2009; GI28178831) (SEQ ID NO: 11).

FIG. 22B es la secuencia de ARNm de IDH2 tal como se presentó en el N.º de Acceso de GenBank NM_002168.2 (Registro del 16 de agosto, 2009; GI28178831) (SEQ ID NO: 12).

FIG. 23 muestra el progreso de las reacciones hacia adelante (isocitrato a α -KG) para la enzima mutante R132H y R132S. FIG. 24A representa el análisis LC-MS/MS de la mezcla racémica 2-HG derivatizada.

FIG. 24B representa el análisis LC-MS/MS del patrón de R-2HG derivatizado.

FIG. 24C muestra el análisis LC-MS/MS de una inyección de un racemato de 2-HG derivatizado y patrón de R-2-HG.

FIG. 24D representa el análisis de LC-MS/MS del producto de reacción de neoactividad derivatizado.

FIG. 24E representa el análisis LC-MS/MS de una inyección conjunta del producto de reacción de neoactividad enzimática y el patrón de R-2-HG.

FIG. 24F representa el análisis de LC-MS/MS de una coinyección del producto de reacción de neoactividad enzimática y la mezcla racémica de 2-HG.

FIG. 25 representa el efecto inhibitorio de 2-HG derivado de la reducción de α -KG por ICDH1 R132H sobre la descarboxilación oxidativa catalítica de ICDH1 de tipo silvestre de isocitrato a α -KG.

FIG. 26A representa niveles de 2-HG en líneas celulares CRL-2610 que expresan proteína mutante R132H de tipo silvestre o IDH-1.

FIG. 26B representa los niveles de 2-HG en las líneas celulares HTB-14 que expresan la proteína mutante de tipo silvestre o IDH-1 R132H.

FIG. 27 representa el ADN genómico de IDH1 humano: intrón/2ª secuencia de exón.

FIG. 28 muestra concentraciones de 2HG en gliomas malignos humanos que contienen mutaciones R132 en IDH1. Las muestras de glioma humano obtenidas por resección quirúrgica se congelaron instantáneamente, se genotiparon para estratificar como de tipo silvestre (WT) (N = 10) o portando un alelo mutante R132 (Mutante) (n = 12) y metabolitos extraídos para el análisis LC-MS. Entre los 12 tumores mutantes, 10 llevaban una mutación R132H, una mutación R132S y una mutación R132G. Cada símbolo representa la cantidad del metabolito listado que se encuentra en cada muestra de tumor. Las líneas rojas indican las medias de la muestra del grupo. La diferencia en 2HG observada entre los mutantes IDH1 mutantes WT y R132 fue estadísticamente significativa mediante el ensayo t de Student ($p < 0,0001$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en α KG, malato, fumarato, succinato, o niveles de isocitrato entre los tumores IDH1 mutantes WT y R132.

FIG. 29A representa el análisis estructural de R132H mutante IDH1. A la izquierda se muestra una estructura de superposición de R132H mutante IDH1 y WT IDH1 en la conformación 'cerrada'. A la derecha se muestra una estructura de superposición de WT IDH1 en la conformación 'abierta' con el mutante IDH1 para comparación.

FIG. 29B representa la comparación estructural de primer plano del sitio activo IDH1 R132H (izquierda) y IDH1 (derecha) de tipo silvestre (derecha) que contiene tanto α KG como NADPH. Además de los cambios en el resto 132, la posición de los restos catalíticos Tyr 139 y Lys 212 son diferentes y α KG está orientada de manera diferente con respecto a NADPH para la transferencia de hidruro catalítico en las enzimas mutantes WT frente a R132H.

FIG. 30A representa las propiedades enzimáticas de los mutantes IDH1 R132H cuando las enzimas IDH1 ecombinantes de tipo silvestre (WT) y mutantes R132H (R132H) se evaluaron para determinar la

descarboxilación oxidativa de isocitrato a α KG con NADP⁺ como cofactor. Se usaron diferentes concentraciones de enzima para generar las curvas.

FIG. 30B representa las propiedades enzimáticas de los mutantes IDH R132 cuando las enzimas IDH1 mutantes WT y R132H se evaluaron para determinar la reducción de α KG con NADPH como cofactor. Se usaron diferentes concentraciones de enzima para generar las curvas.

FIG. 30C muestra los parámetros cinéticos de las reacciones oxidativas y reductoras según se miden para WT y se muestran las enzimas R132H IDH1. Los valores K_m y k_{cat} para la actividad reductora de la enzima WT no pudieron determinarse ya que no se detectó ninguna actividad enzimática medible en ninguna concentración de sustrato.

FIG. 31A representa el análisis de LC-MS/MS que identifica 2HG como el producto de reacción reductora del mutante R132H humano recombinante IDH1.

FIG. 31B representa la derivatización del anhídrido diacetil-L-tartárico y el análisis LC-MS/MS de la quiralidad de 2HG producida por el mutante R132H IDH1. Señal LC-MS/MS normalizada para el producto de reacción reductora (rxn) solo, se muestra un patrón de R(-)- 2HG solo, y los dos juntos (Rxn + R(-)-2HG) como la señal para una mezcla racémica de formas R(-) y S(+) (Racemato de 2HG) solo o con los productos de reacción (Rxn + Racemato).

FIG. 32A representa SDS-PAGE y análisis de transferencia de Western de la proteína IDH1 R132S etiquetada de purificación de afinidad C-terminal usada para cristalización.

FIG. 32B representa el cromatograma de análisis de FPLC de la muestra de proteína IDH1 R132S.

FIG. 33 representa cristales obtenidos de una solución de proteína que contiene NADP 5 mM, isocitrato 5 mM, Ca²⁺ 10 mM. La solución precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,0) y 20 % de PEG 6000 usando un método de cristalización de gotas colgantes.

FIG. 34 representa el cristal obtenido de una solución de proteína que contiene NADP 5 mM, α -cetoglutarato 5 mM, Ca²⁺ 10 mM. El precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,5) y 12 % de PEG 20000.

FIG. 35 es un gráfico de barras que representa la actividad de catálisis reductora de NADPH elevada en la enzima mutante IDH2-R172K en comparación con la IDH2 de tipo silvestre.

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

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

FIG. 38 representa representaciones gráficas de análisis LC-MS de reacciones *in vitro* que usan IDH1 R132C recombinante e IDH2 R172K que confirman que 2-HG y no isocitrato es el producto final de las reacciones enzimáticas mutantes.

FIGs. 39A y B representan (A) la catálisis de la enzima IDH1 de tipo silvestre de la descarboxilación oxidativa de isocitrato a alfa-cetoglutarato con la reducción simultánea de NADP a NADPH; y (B) la reducción mutante IDH1 R132C de alfa-cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato mientras se oxida NADPH a NADP. Estas se conocen como las reacciones "directa" e "inversa parcial", respectivamente.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que ciertas formas mutadas de una enzima (*por ejemplo*, IDH1 o IDH2) tienen una ganancia de función, denominada en el presente documento neoactividad, que puede ser dirigida en el tratamiento de un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un trastorno proliferativo como cáncer. Por ejemplo, en el caso de una enzima de la ruta metabólica, una ganancia de función o neoactividad puede servir como una diana para el tratamiento del 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 como cáncer. Los métodos incluyen, *por ejemplo*, un inhibidor de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, IDH1), *por ejemplo*, una molécula pequeña o ácido nucleico para usar en un método para tratar a un sujeto que tiene un glioma o tumor cerebral caracterizado por un alelo IDH1 preseleccionado, *por ejemplo*, un alelo que tiene A en la posición 394, como un C394A, un C394G, un C394T, un G395C, una mutación G395T o G395A, (*por ejemplo*, un C394A mutante) o una A en la posición 395 (*por ejemplo*, un G395A mutante) de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 5, que codifica una IDH1 que tiene His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu en la posición 132 (*por ejemplo*, His); o un alelo IDH2 preseleccionado que codifica una IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, o Ser en la posición 172 y que tiene una neoactividad desvelada en el presente documento, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de

un inhibidor de IDH1 o IDH2 (*por ejemplo*, IDH1), *por ejemplo*, una pequeña molécula o ácido nucleico. El inhibidor basado en ácido nucleico es, *por ejemplo*, un ARNds, *por ejemplo*, un ARNdc que comprende las secuencias primarias de la cadena con sentido y las cadenas antisentido de las Tablas 7-14. El ARNds está compuesto de dos cadenas separadas, o una sola cadena doblada para formar una estructura de horquilla (*por ejemplo*, un ARN horquillado corto (ARNsh)). En algunas realizaciones, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido, tal como un antisentido que tiene una secuencia que se superpone, o incluye, una secuencia antisentido proporcionada en las Tablas 7-14.

Neoactividad de una enzima

Neoactividad, como se usa en el presente documento, significa una actividad que surge como resultado de una mutación, *por ejemplo*, una mutación puntual, *por ejemplo*, una sustitución, *por ejemplo*, en el sitio activo de una enzima. En una realización la neoactividad está sustancialmente ausente de la enzima de tipo silvestre o no mutante. Esto se refiere a veces en el presente documento neoactividad de primer grado. Un ejemplo de neoactividad de primer grado es un "aumento de función" en donde la enzima mutante aumenta una nueva actividad catalítica. En una realización la neoactividad está presente en el tipo natural o en la enzima no mutante, pero a un nivel que es menor que 10, 5, 1, 0,1, 0,01 o 0,001 % de lo que se ve en la enzima mutante. Esto se refiere a veces en el presente documento como neoactividad de segundo grado. Un ejemplo de neoactividad de segundo grado es un "aumento de función" en donde la enzima mutante tiene un aumento, *por ejemplo*, un aumento de 5 veces en la velocidad de una actividad catalítica que posee 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) a la sustancia B (*por ejemplo*, α -cetoglutarato), y la neoactividad convierte la sustancia B (*por ejemplo*, α -cetoglutarato) a la sustancia C, a veces denominado producto neoactivo (*por ejemplo*, 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato). En algunas realizaciones, la enzima se encuentra en una ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2.

En algunas realizaciones, una forma no mutante de la enzima, *por ejemplo*, una forma de tipo silvestre, convierte la sustancia A en sustancia B, y la neoactividad convierte la sustancia B en sustancia A. En algunas realizaciones, la enzima se encuentra en una ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos.

Isocitrato Deshidrogenasas

Las isocitrato deshidrogenasas (IDH) catalizan la descarboxilación oxidativa de isocitrato a 2-oxoglutarato (es decir, α -cetoglutarato). Estas enzimas pertenecen a dos subclases distintas, una de las cuales utiliza NAD(+) como aceptador de electrones y la otra NADP(+). Se han notificado 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 ellas mitocondrial y la otra predominantemente citosólica. Cada isozima dependiente de NADP(+) es un homodímero.

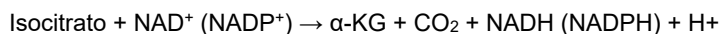
La IDH1 (isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), citosólica) también se conoce como IDH; IDP; IDCD; IDPC o PICD. La proteína codificada mediante este gen es la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP(+) que se encuentra en el citoplasma y los peroxisomas. Contiene la secuencia señal de direccionamiento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

El gen humano IDH1 codifica una proteína de 414 aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para IDH1 humano 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., entregado (DEC-2008) a UniProtKB; Kullmann et al., entregado (JUN-1996) a la base de datos EMBL/GenBank/DDBJ; y Sjoeblo et al., Science 314:268-274(2006).

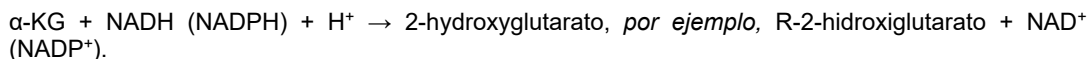
IDH2 (isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+), mitocondrial) también se conoce como IDH; IDP; IDHM; IDPM; ICD-M; o mNADP-IDH. La proteína codificada por este gen es la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP(+) que se encuentra en las mitocondrias. Desempeña un papel en el metabolismo intermediario y la producción de energía. Esta proteína puede asociarse estrechamente o interactuar con el complejo de piruvato deshidrogenasa. El gen humano IDH2 codifica una proteína de 452 aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para IDH2 se pueden encontrar como las entradas de GenBank NM_002168.2 y NP_002159.2, respectivamente. La secuencia de

nucleótidos y aminoácidos para el IDH2 humano también se describe en, *por ejemplo*, Huh *et al.*, Presentado (NOV-1992) a las bases de datos EMBL/GenBank/DBJ; y The MGC Project Team, *Genome Res.* 14:2121-2127(2004).

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



En algunas realizaciones, la neoactividad de un mutante IDH1 puede tener la capacidad de convertir α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato:



En algunas realizaciones, la neoactividad puede ser la reducción de piruvato o malato a los correspondientes compuestos α -hidroxilo.

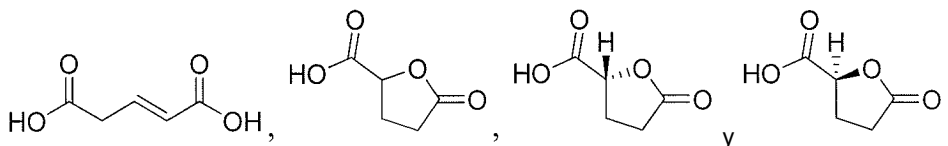
En algunas realizaciones, la neoactividad de una IDH1 mutante puede surgir de una IDH1 mutante que tiene una His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier otra mutación descrita en Yan *et al.*, en el resto 132 (*por ejemplo*, His, Ser, Cys, Gly, Val o Leu; o His, Ser, Cys o Lys). En algunas realizaciones, la neoactividad de una IDH2 mutante puede surgir de una IDH2 mutante que tiene una Lys, Gly, Met, Trp, Thr o Ser (*por ejemplo*, Lys, Gly, Met, Trp, o Ser; o Gly, Met o Lys), o cualquier otra mutación descrita en Yan H *et al.*, en el resto 172. Las mutaciones ejemplares incluyen las siguientes: R132H, R132C, R132S, R132G, R132L y R132V.

En algunas realizaciones, el mutante IDH1 y/o IDH2 (*por ejemplo*, un IDH1 y/o IDH2 mutantes que tienen una neoactividad descrita en el presente documento) podrían conducir a un aumento del nivel de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato en un sujeto. La acumulación de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato en un sujeto, *por ejemplo*, en el cerebro de un sujeto, puede ser dañino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, niveles elevados de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato puede provocar y/o predecir el cáncer en un sujeto como un cáncer del sistema nervioso central, *por ejemplo*, tumor cerebral, *por ejemplo*, glioma, *por ejemplo*, glioblastoma multiforme (GBM). En consecuencia, en algunas realizaciones, un método descrito en el presente documento incluye administrar a un sujeto un inhibidor de la neoactividad.

Detección de 2-hidroxiglutarato

2-hidroxiglutarato se puede detectar, *por ejemplo*, por LC/MS. Para detectar 2-hidroxiglutarato secretado en medios de cultivo, se pueden recoger alícuotas de 500 μ l de medios condicionados, mezcladas 80:20 con metanol y, centrifugando a 3.000 rpm durante 20 minutos a 4 grados Celsius. El sobrenadante resultante se puede recolectar y almacenar a -80 grados Celsius antes de LC-MS/MS para evaluar los niveles de 2-hidroxiglutarato. Para medir los metabolitos asociados a células completas, los medios se pueden aspirar y las células se pueden recoger, *por ejemplo*, a una densidad no confluyente. Se puede utilizar una variedad de diferentes métodos de separación por cromatografía líquida (LC, de sus siglas en inglés). Cada método se puede acoplar mediante ionización por electropulverización negativa (ESI, -3,0 kV) a espectrómetros de masas de triple cuadrupolo que funcionan en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), con parámetros MS optimizados en soluciones estándar de metabolitos infundidos. Los metabolitos se pueden separar por cromatografía de fase inversa usando tributilamina 10 mM como agente de emparejamiento iónico en la fase móvil acuosa, de acuerdo con una variante de un método descrito anteriormente (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, 95 % de B; 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-hidroxiglutarato, que ejecuta un gradiente lineal rápido de B al 50 % -95 % (tampones como se definió anteriormente) durante 5 minutos. Como columna se puede usar una Synergi Hydro-RP, 100 mm x 2 mm, tamaño de partícula de 2,1 μ m (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 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, se evalúa y el analito en donde se basa la determinación es 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. En una realización el analito en donde se basa la determinación es un derivado de 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, formado en el proceso de realizar el método analítico. A modo de ejemplo, tal derivado puede ser un derivado formado en el análisis de MS. 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*, como se formó en el análisis de MS. Los derivados de 2HG ejemplares incluyen derivados deshidratados tales como los compuestos proporcionados a continuación o un aducto de sal de los mismos:



Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos

- 5 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 IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG, *por ejemplo*, para evaluar el genotipo o fenotipo de neoactividad 2HG de IDH1 o IDH2. La evaluación se puede realizar, *por ejemplo*, para seleccionar, diagnosticar o pronosticar el sujeto, para seleccionar un agente terapéutico, *por ejemplo*, un inhibidor, o para evaluar la respuesta al tratamiento o progresión de la enfermedad. En una realización de la evaluación, que se puede realizar antes y/o después de comenzar el tratamiento, se basa, al menos en parte, en el análisis de una muestra de tumor, muestra de células cancerosas, o muestra de células precancerosas, del sujeto. *Por ejemplo*, una muestra del paciente puede analizarse para determinar la presencia o el nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, evaluando un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. Un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en la muestra se puede determinar por un método cromatográfico, *por ejemplo*, por análisis LC-MS. También se puede determinar por contacto con un agente de unión específico, *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une al producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, y permite su detección. En una realización la muestra se analiza para el nivel de neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. En una realización la muestra se analiza para detectar la presencia de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína que tiene una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG (o un ARN correspondiente). *Por ejemplo*, un reactivo específico de proteína mutante, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH1-R132H o una proteína mutante IDH2-R172 (*por ejemplo*, una proteína mutante IDH1-R132H), se puede usar para detectar enzimas mutantes neoactivas. En una realización se secuencia un ácido nucleico de la muestra para determinar si un alelo seleccionado o mutación de IDH1 o IDH2 desvelado en el presente documento está presente. En una realización el análisis es distinto de determinar directamente la presencia de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína (o ARN correspondiente) o secuenciación de una IDH, *por ejemplo*, gen IDH1 o IDH2. En una realización el análisis es distinto de determinar directamente, *por ejemplo*, es distinto de la secuenciación del ADN genómico o ADNc, la presencia de una mutación en el resto 132 de IDH1 y/o una mutación en el resto 172 de IDH2. *Por ejemplo*, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o la medida de la mutación es una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG. En una realización la muestra se extrae del paciente y se analiza. En una realización la evaluación puede incluir uno o más de los análisis de la muestra, solicitar el análisis de la muestra, solicitar resultados del análisis de la muestra, o recibir los resultados del análisis de la muestra. (En general en el presente documento, el análisis puede incluir uno o ambos de realizar el método subyacente o recibir datos de otra persona que haya realizado el método subyacente).

En una realización de la evaluación, que se puede realizar antes y/o después de comenzar el tratamiento, se basa, al menos en parte, en el análisis de un tejido (*por ejemplo*, un tejido distinto de una muestra de tumor), o fluido corporal, o producto corporal. Los tejidos ejemplares incluyen ganglios linfáticos, piel, folículos pilosos y uñas. Los fluidos corporales ejemplares incluyen sangre, plasma, orina, linfa, lágrimas, sudor, saliva, semen y líquido cefalorraquídeo. Los productos corporales ejemplares incluyen el aliento exhalado. *Por ejemplo*, el tejido, el fluido o producto puede analizarse para detectar la presencia o el nivel de un producto alfa hidroxí neoactivo, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, evaluando un parámetro correlacionado con la presencia o el nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG. Un producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en la muestra se puede determinar por un método cromatográfico, *por ejemplo*, por análisis LC-MS. También se puede determinar por contacto con un agente de unión específico, *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une al producto de neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, y permite su detección. En realizaciones donde hay niveles suficientes, el tejido, el fluido o producto puede ser analizado para el nivel de neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, la neoactividad 2HG. En una realización la muestra se analiza para detectar la presencia de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, proteína que tiene una neoactividad alfa hidroxí, *por ejemplo*, neoactividad 2HG (o un ARN correspondiente). *Por ejemplo*, un reactivo específico de proteína mutante, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une específicamente a una proteína mutante IDH1-R132H o una proteína mutante IDH2-R172 (*por ejemplo*, una proteína mutante IDH1-R132H), se puede usar para detectar enzimas mutantes neoactivas. En una realización se secuencia un ácido nucleico de la muestra para determinar si un alelo seleccionado o mutación de IDH1 o IDH2 desvelado en el presente documento está presente. En una realización el análisis es distinto de determinar directamente la presencia de una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o

IDH2, proteína (o ARN correspondiente) o secuenciación de una IDH, *por ejemplo*, gen IDH1 o IDH2. *Por ejemplo*, el análisis puede ser la detección de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o la medida de neoactividad 2HG. En una realización el tejido, el líquido o producto se extrae del paciente y se analiza. En una realización la evaluación puede incluir uno o más de los análisis del tejido, fluido o producto, solicitud de análisis del tejido, fluido o producto, solicitud de resultados del análisis del tejido, líquido o producto, o recibir los resultados del análisis del tejido, fluido o producto.

En una realización de la evaluación, que se puede realizar antes y/o después de comenzar el tratamiento, se basa, al menos en parte, en producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, imagen del sujeto. En realizaciones se usan métodos de resonancia magnética para evaluar la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, en el sujeto. En una realización el sujeto se somete a imágenes y/o análisis espectroscópico, *por ejemplo*, análisis basado en resonancia magnética, *por ejemplo*, MRI y/o MRS *por ejemplo*, análisis, y opcionalmente una imagen correspondiente a la presencia, distribución, o nivel de un producto de neoactividad alfa hidroxil, *por ejemplo*, 2HG, *por ejemplo*, R-2HG, o del tumor, se forma. Opcionalmente la imagen o un valor relacionado con la imagen se almacena en un medio tangible y/o se transmite a un segundo sitio. En una realización la evaluación puede incluir uno o más de los análisis de imágenes realizados, solicitud de análisis de imagen, solicitud de resultados de análisis de imágenes, o recepción de los resultados de análisis de imágenes.

Métodos de tratamiento de un trastorno proliferativo

En el presente documento se describen métodos para tratar un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, un cáncer, *por ejemplo*, un glioma, *por ejemplo*, al inhibir la neoactividad de una enzima mutante, *por ejemplo*, una enzima en una ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2. El cáncer puede caracterizarse por la presencia de una neoactividad, como un aumento de función en una o más enzimas mutantes (*por ejemplo*, una enzima en la ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, La ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos *por ejemplo*, IDH1 o IDH2). En algunas realizaciones, el aumento de función es la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxioglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxioglutarato.

Compuestos para el tratamiento del cáncer

Un compuesto candidato puede ser evaluado por modulación (*por ejemplo*, inhibición) de la neoactividad, *por ejemplo*, usando un ensayo descrito en el presente documento. Un compuesto candidato también puede ser evaluado para la modulación (*por ejemplo*, inhibición) de la actividad de tipo silvestre o no mutante. *Por ejemplo*, La formación de un producto o subproducto de cualquier actividad (*por ejemplo*, actividad enzimática) puede ser analizada, evaluando así 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*, el cambio en la naturaleza y/o la cantidad de sustrato y/o producto se puede medir, *por ejemplo*, usando métodos como los sustratos fluorescentes o radiomarcados. Los sustratos y/o productos ejemplares incluyen α -cetoglutarato, CO₂, NADP, NADPH, NAD, NADH, y 2-hidroxioglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxioglutarato. En algunas realizaciones, La velocidad de reacción de la enzima también puede evaluarse como la naturaleza y/o la cantidad de un producto de la reacción enzimática. Además de la medición de posibles actividades enzimáticas, la actividad (*por ejemplo*, tipo silvestre/no mutante o neoactividad) puede detectarse mediante la extinción de la fluorescencia de la proteína tras la unión de un potencial sustrato, cofactor o modulador de la actividad enzimática a la enzima.

En una realización, El progreso del ensayo puede controlarse mediante cambios en la DO340 o la fluorescencia del cofactor NAD o NADP. En otra realización, el progreso de la reacción se puede acoplar a un sistema de ensayo enzimático secundario en modo continuo o modo de punto final para aumentar el rango dinámico del ensayo. *Por ejemplo*, se puede realizar un ensayo de punto final agregando a la reacción un exceso de diaforasa y rezasarina. La diaforasa consume el NADPH o NADH restante mientras produce resorufina a partir de rezasarina. La resorufina es un producto altamente fluorescente que puede medirse por fluorescencia en 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.

Se puede implementar un ensayo continuo mediante el acoplamiento de un producto de la reacción primaria a una reacción enzimática secundaria que produce resultados detectables de mayor rango dinámico o modo de detección más conveniente. *Por ejemplo*, inclusión en la mezcla de reacción de aldehído deshidrogenasa (ALDH), que es una enzima dependiente de NADP⁺, y 6-metoxi-2-naftaldehído, un sustrato cromogénico para ALDH, dará como resultado la producción del producto fluorescente 6-metoxi-2-naftoato (Ex310 Em 360) a una tasa que depende de la producción de NADP⁺ por isocitrato deshidrogenasa. La inclusión de una enzima de acoplamiento como la aldehído deshidrogenasa tiene el beneficio adicional de permitir la detección de neoactividad independientemente de si se produce NADP⁺ o NAD⁺, ya que esta enzima es capaz de utilizar ambos. Además, ya que el cofactor NADPH o NADH requerido para el ensayo "inverso" se regenera, un sistema enzimático acoplado que devuelve el cofactor a la

enzima IDH tiene la ventaja adicional de permitir que se realicen ensayos continuos a concentraciones de cofactor muy por debajo de K_m con el fin de mejorar la detección de inhibidores competitivos de la unión del cofactor.

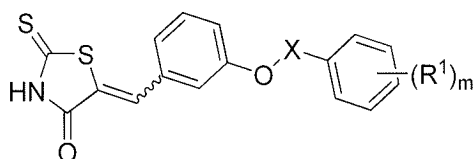
En una tercera realización de una actividad de identificación (*por ejemplo*, tipo silvestre/no mutante o neoactividad), uno o varios sustratos, cofactores o productos IDH pueden etiquetarse isotópicamente con elementos radiactivos o "pesados" en átomos definidos con el fin de seguir sustratos específicos o átomos de sustratos a través del químico reacción. Por ejemplo, el carbono alfa de α -KG, isocitrato o 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato puede ser ^{14}C o ^{13}C . La cantidad, tasa, identidad y estructura de los productos formados se pueden analizar por medios conocidos por los expertos en la materia, *por ejemplo*, espectroscopía de masas o HPLC radiométrica.

Los compuestos que inhiben una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, pueden incluir, *por ejemplo*, una molécula pequeña, ácido nucleico, proteínas y anticuerpos.

Las moléculas pequeñas ejemplares incluyen, *por ejemplo*, moléculas pequeñas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento. La unión de un inhibidor puede impedir que un sustrato entre al 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 generalmente reaccionan con la enzima y la modifican químicamente. Estos inhibidores pueden modificar los restos de aminoácidos clave necesarios para la actividad enzimática. Por el contrario, los inhibidores reversibles se unen de forma no covalente y se producen diferentes tipos de inhibición dependiendo de si estos inhibidores se unen a la enzima, El complejo enzima-sustrato, o ambos.

En algunas realizaciones, la molécula pequeña es oxalomalato, oxalofumarato u oxalosuccinato.

En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un compuesto de fórmula (X), o un compuesto como se indica en la Tabla 24a. El compuesto de fórmula (X) se proporciona a continuación:

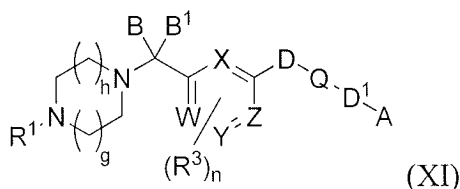


Fórmula (X)

en donde X es alquileo $\text{C}_1\text{-C}_6$ (*por ejemplo*, metileno), $\text{C}(\text{O})$, o $\text{C}(\text{O})$ alquileo $\text{C}_1\text{-C}_6$; en donde X está opcionalmente sustituido;

R^1 es halo (*por ejemplo*, flúor), alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, hidroxilo, alcoxi $\text{C}_1\text{-C}_6$, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, amido, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, o $\text{C}(\text{O})$ Oalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$; y m es 0, 1, 2 o 3.

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



(XI)

en donde:

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

B y B^1 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo o cuando se toman junto con el carbono al que están unidos forman un grupo carbonilo;

Q es $\text{C}=\text{O}$ o SO_2 ;

D y D^1 se seleccionan independientemente entre un enlace, oxígeno o NR^c ;

A es arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido;

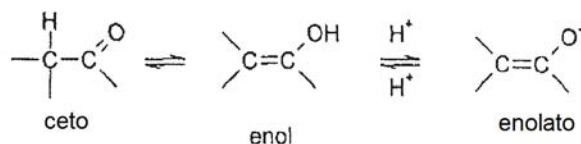
R^1 se selecciona independientemente entre alquilo, acilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, heterociclilalquilo, cicloalquilalquilo, aralquilo, y heteroaralquilo; cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con 0-3 apariciones de R^d ; cada R^3 se selecciona independientemente entre halo, haloalquilo, alquilo y $-\text{OR}^a$; cada R^a se selecciona independientemente entre alquilo y haloalquilo;

- cada R^b es independientemente alquilo;
 cada R^c se selecciona independientemente entrehidrógeno, alquilo y alquénilo;
 cada R^d se selecciona independientemente entre halo, haloalquilo, alquilo, nitro, ciano, y -OR^a,
 o dos R^d junto con los átomos de carbono a los que están unidos forman un heterociclilo opcionalmente
 5 sustituido;
 n es 0, 1 o 2;
 h es 0, 1, 2; y
 g es 0, 1 o 2.
- 10 En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un inhibidor selectivo de la neoactividad (*por ejemplo*, relativa a la actividad de tipo silvestre).
- Los ácidos nucleicos se pueden usar para inhibir una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, *por ejemplo*, disminuyendo la expresión de la enzima. Los ácidos nucleicos ejemplares
 15 incluyen, *por ejemplo*, ARNip, ARNhc, ARN antisentido, aptámero y ribozima. Para seleccionar moléculas inhibitorias se pueden usar métodos conocidos en la técnica, *por ejemplo*, moléculas de ARNsi, para una secuencia génica particular.
- Las proteínas también pueden usarse para inhibir una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, mediante la unión directa o indirecta a la enzima y/o al sustrato, o compitiendo con la unión a la enzima y/o al sustrato. Las proteínas ejemplares incluyen, *por ejemplo*, receptores solubles, péptidos y anticuerpos. Los anticuerpos ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, anticuerpo completo o un fragmento del mismo que conserva su capacidad de unirse a la enzima o al sustrato.
- 20 Las proteínas también pueden usarse para inhibir una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento, mediante la unión directa o indirecta a la enzima y/o al sustrato, o compitiendo con la unión a la enzima y/o al sustrato. Las proteínas ejemplares incluyen, *por ejemplo*, receptores solubles, péptidos y anticuerpos. Los anticuerpos ilustrativos incluyen, *por ejemplo*, anticuerpo completo o un fragmento del mismo que conserva su capacidad de unirse a la enzima o al sustrato.
- 25 Los compuestos candidatos ejemplares, que se pueden probar para inhibir una neoactividad descrita en el presente documento (*por ejemplo*, una neoactividad asociada con el mutante IDH1), se describe en las siguientes referencias, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia: 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; U.S. Pat. Appl. US 2004067234 A1; PCT
 30 Int. Appl. (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.
- 35 **Isómeros**
- Determinados compuestos pueden existir en una o más formas geométricas especiales, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atópicas, estereoisómero, tautoméricas, conformacionales o anoméricas, incluyendo, pero sin limitación, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, formas t, y r; formas endo y exo; formas R, S y meso;
 40 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 barco, silla, torsión, sobre, y media silla; y combinaciones de los mismos, colectivamente denominadas en lo sucesivo "isómeros" (o "formas isoméricas").
- En una realización, un compuesto descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un inhibidor de una neoactividad
 45 o 2-HG es un isómero enriquecido enantioméricamente de un estereoisómero descrito en el presente documento. Por ejemplo, el compuesto tiene un exceso enantiomérico de al menos aproximadamente el 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.
- 50 En una realización, una preparación de un compuesto desvelado en el presente documento se enriquece para 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. 2HG se puede adquirir en fuentes comerciales o se puede preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Org. Syn. Coll vol., 7, P-99, 1990. Por ejemplo, el compuesto tiene una pureza correspondiente a un compuesto que tiene una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado de al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %.
- 60 En una realización, una composición descrita en el presente documento incluye una preparación de un compuesto descrito en el presente documento que está enriquecido para 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 a modo de ejemplo pueden ser las proporcionadas en un ejemplo descrito en el presente documento.
- 65 Una "preparación enriquecida", como se usa en el presente documento, se enriquece por una estereoconfiguración seleccionada entre uno, dos, tres o más estereocentros seleccionados dentro del compuesto objeto. Los

estereocentros seleccionados a modo de ejemplo y las estereoconfiguraciones a modo de ejemplo de los mismos pueden seleccionarse entre los proporcionados en el presente documento, *por ejemplo*, en un ejemplo descrito en el presente documento. Por enriquecido se entiende al menos 60 %, *por ejemplo*, las moléculas de compuesto en la preparación tienen una estereoquímica seleccionada de un estereocentro seleccionado. En una realización es al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. Enriquecido se refiere al nivel de una(s) molécula(s) del sujeto y no implica una limitación del proceso a menos que se especifique.

Cabe destacar que, excepto como se analiza a continuación para formas tautómeras, excluidas específicamente del término "isómeros", como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que difieren en las conexiones entre los átomos en lugar de meramente 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 orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir formas estructuralmente isoméricas que entran dentro de esa 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 para-metoxifenilo).

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



Cabe destacar que en el término "isómero" están incluidos de forma específica los compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 1H, 2H (D), y 3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 12C, 13C, y 14C; O puede estar en cualquier forma isotópica, incluyendo 16O y 18O; y similares. A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular incluye todas las formas isoméricas, incluyendo (total o parcialmente) mezclas racémicas y otras mezclas de las mismas. Métodos para la preparación (*por ejemplo*, síntesis asimétrica) y separación (*por ejemplo*, medios de cristalización fraccionada y cromatográficos) de tales formas isómeras 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 tratan ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts." J. Pharm. Sci. Vol. 66, pp. 1-19.

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (*por ejemplo*, -COOH puede ser -COO⁻), luego se puede formar una sal con un catión adecuado. Los ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, iones de metales alcalinos, como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes como Al³⁺. Los ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, entre otros, iones de amonio (es decir, NH₄⁺) e iones de amonio sustituidos (*por ejemplo*, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Los ejemplos de algunos iones de amonio sustituidos adecuados son los derivados de: etilamina, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como aminoácidos, como lisina y arginina. Un ejemplo de un ion de amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

Si el compuesto es catiónico o tiene un grupo funcional que puede ser catiónico (*por ejemplo*, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), luego se puede formar una sal con un anión adecuado. Los ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfúrico, nítrico, nitroso, fosfórico y fósforo.

Los ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los ácidos orgánicos siguientes: 2-acetioxi benzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, alcanfor sulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, 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. Los ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos a partir de los ácidos poliméricos siguientes: ácido tánico,

carboximetilcelulosa.

A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye formas salinas del mismo.

5

Formas Químicamente Protegidas

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular el compuesto activo en una forma protegida químicamente. El término "forma químicamente protegida" se usa en el presente documento en el sentido químico convencional y se refiere a un compuesto en donde uno o más grupos funcionales reactivos están protegidos de reacciones químicas indeseables en condiciones específicas (*por ejemplo*, pH, temperatura, radiación, solvente, y similares). En la práctica, se emplean métodos químicos bien conocidos para hacer reversiblemente un grupo funcional no reactivo, que de otro modo sería reactivo, en condiciones especificadas. En una forma químicamente protegida, uno o más grupos funcionales reactivos están en forma de un grupo protegido o protector (también conocido como un 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 ser eliminado, usualmente en una etapa posterior, sin afectar sustancialmente al resto de la molécula. Véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis (T. Green and P. Wuts; 3ª Edición; John Wiley and Sons, 1999). A menos que se especifique lo contrario, una referencia a un compuesto particular también incluye formas químicamente protegidas del mismo.

Una amplia variedad de tales métodos de "protección", "bloqueo", o "enmascaramiento" se usan ampliamente y se conocen bien en síntesis orgánica. Por ejemplo, un compuesto que tiene dos grupos funcionales reactivos no equivalentes, ambos de los cuales serían reactivos bajo condiciones específicas, se puede derivar para hacer que uno de los grupos funcionales esté "protegido" y por lo tanto no reactivo, en las condiciones especificadas; protegido así, el compuesto se puede usar como un reactivo que tiene efectivamente solo un grupo funcional reactivo. Después de que se completa la reacción deseada (que involucra al otro grupo funcional), el grupo protegido puede estar "desprotegido" para devolverlo 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-butilico; un bencilo, benzhidrido (difenilmetilo), o tritilo (trifenilmetilo) éter; un trimetilsililo o t-butildimetilsilil éter; o un éster acetílico (-OC(=O)CH₃, -OAc).

Por ejemplo, un grupo aldehído o cetona puede estar protegido como un acetal (R-CH(OR)₂) o cetal (R₂C(OR)₂), respectivamente, en donde el grupo carbonilo (>C=O) se convierte en un diéter (>C(OR)₂), por 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, un grupo amina puede estar protegido, por ejemplo, como una amida (-NRCO-R) o un uretano (-NRCO-OR), por ejemplo, como: una amida de metilo (-NHCO-CH₃); una benciloxi amida (-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz); como una t-butoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc); una 2-difenil-2-propoxi amida (-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), como 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), como una aliloxi amida (-NH-Alloc), como 2-(fenilsulfonil) etiloxi amida (-NH-Psec); o, en casos adecuados (*por ejemplo*, aminas cíclicas), como un radical nitróxido (>NO•).

Por ejemplo, un grupo ácido carboxílico puede estar protegido como un éster por ejemplo, como: un éster de alquilo Cⁿ (*por ejemplo*, un éster de metilo; un éster t-butilico); un éster C₁₇haloalquílico (*por ejemplo*, un éster de trihaloalquilo C₁₋₇); un éster de trihaloalquilo C₁₋₇silil-alquilo C₁₋₇; o un éster de aril C₅₋₂₀-alquilo C₁₋₇ (*por ejemplo*, un éster bencilico; un éster nitrobencilico); o como una amida, por ejemplo, como una amida de metilo.

Por ejemplo, un grupo tiol puede estar protegido como un tioéter (-SR), por ejemplo, como: un tioéter de bencilo; un acetamidometil éter (-S-CH₂NHC(=O)CH₃).

55 Inhibidores basados en ácido nucleico

Los inhibidores basados en ácido nucleico para inhibición de IDH, por ejemplo, IDH1, pueden ser, *por ejemplo*, ARN bicatenario (ARNds) que funciona, *por ejemplo*, por un ARN de interferencia (mecanismo de ARNi), un ARN antisentido, o un microARN (miARN). En una realización el inhibidor basado en ácido nucleico se une al ARNm diana e inhibe la producción de proteína del mismo, por ejemplo, por escisión del ARNm diana.

ARN bicatenario (ARNds)

Un inhibidor basado en ácido nucleico útil para disminuir la función mutante de IDH1 o IDH2 es, *por ejemplo*, un ARNds, como un ARNds que actúa por un mecanismo de ARNi. ARNi se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediados por ARN de interferencia cortos (ARNip). Se

entiende que los ARNbc como se usan en el presente documento incluyen ARNsi. Típicamente, la inhibición de IDH, *por ejemplo*, IDH1, por ARNds, no desencadena la respuesta de interferón que resulta de la activación mediada por ARNds de la proteína quinasa PKR y 2',5'-oligoadenilato sintetasa que da como resultado una escisión no específica de ARNm por ribonucleasa L.

5 Los ARNds dirigidos a una IDH, *por ejemplo*, IDH1, enzima, *por ejemplo*, una IDH1 de tipo silvestre o mutante, pueden estar sin modificar o modificados químicamente. El ARNds se puede sintetizar químicamente, expresar a partir de un vector o sintetizado enzimáticamente. La invención también presenta varias moléculas de ARNds sintéticas modificadas químicamente capaces de modular la expresión o actividad del gen IDH1 en células por ARN de interferencia (ARNi). El uso de ARNds modificado químicamente mejora varias propiedades de las moléculas ARNds nativas, tal como a través de una mayor resistencia a la degradación de las nucleasas *in vivo* y/o a través de una mejor captación celular.

10 Los ARNds que se dirigen al ácido nucleico pueden estar compuestos de dos ARN separados, o de una hebra ARN, que se pliega para formar una estructura horquillada. Los ARNds horquillados se denominan típicamente ARNsh.

15 Un ARNsh que se dirige a IDH, *por ejemplo*, un gen IDH1 mutante o de tipo silvestre se puede expresar a partir de un vector, *por ejemplo*, vector viral, tal como un vector lentiviral o adenoviral. En ciertas realizaciones, se identificará un ARNds adecuado para inhibir la expresión de un gen IDH1 mediante la identificación de una biblioteca de ARNsi, como una biblioteca de ARNsi adenoviral o lentiviral.

20 En una realización, un ARNds que se dirige a IDH, *por ejemplo*, IDH1, tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 pares de bases (*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 ARNds incluye extremos sobresalientes de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 (*por ejemplo*, aproximadamente 1, 2 o 3) nucleótidos. Por "saliente" se entiende que el extremo 3' de una cadena del ARNds se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa. El ARNds puede tener un saliente en uno o ambos extremos de la molécula de ARNds. En algunas realizaciones, el saliente de una sola hebra está ubicado en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido, o, como alternativa, en el extremo 3' terminal de la cadena sentido. En algunas realizaciones, el saliente es un saliente dinucleotídico TT o UU, *por ejemplo*, un dinucleótido TT o UU que sobresale. Por ejemplo, en una realización, el ARNds incluye una cadena antisentido de 21 nucleótidos, una región dúplex de 19 pares de bases y un dinucleótido 3'-terminal. En otra realización más, un ARNds incluye un ácido nucleico dúplex donde ambos extremos son romos, o alternativamente, donde uno de los extremos es romo.

35 En una realización, el ARNds incluye una primera y una segunda hebra, cada hebra tiene una longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 28 nucleótidos, *por ejemplo*, aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, la primera hebra del ARNds incluye una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente complementariedad con la IDH, *por ejemplo*, IDH1, ARN para el ARNds para dirigir la escisión de la IDH, *por ejemplo*, IDH1, ARNm a través de ARN de interferencia, y la segunda hebra del ARNds incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la primera hebra.

40 En una realización, un ARNds dirigido a una IDH, *por ejemplo*, IDH1, gen puede dirigirse a formas silvestres y mutantes del gen, o puede dirigirse a diferentes isoformas alélicas del mismo gen. Por ejemplo, El ARNds se dirigirá a una secuencia que es idéntica en dos o más de las diferentes isoformas. En una realización, el ARNds se dirige a una IDH1 que tiene G en la posición 395 o C en la posición 394 (*por ejemplo*, un ARN de IDH1 de tipo silvestre) y una IDH1 que tiene A en la posición 395 o A en la posición 394, como C394A, C394G, C394T, G395C, G395T o una mutación G395A, (*por ejemplo*, un ARN de IDH1 que lleva una mutación G395A y/o C394A (FIG. 2).

45 En una realización, un ARNds se dirigirá preferente o específicamente a un ARN de IDH mutante, o un polimorfismo de IDH particular. En algunas realizaciones, la IDH tiene una mutación en la posición 394 o 395 como un C394A, un C394G, un C394T, un G395C, una mutación G395T o G395A. Por ejemplo, en una realización, el ARNds se dirige a un ARN de IDH1 que lleva una A en la posición 395, *por ejemplo*, G395A, y en otra realización, el ARNds se dirige a un ARN de IDH1 que lleva una A en la posición 394, *por ejemplo*, mutación C394A.

50 En una realización, un ARNds dirigido a un ARN de IDH incluye una o más modificaciones químicas. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones químicas incluyen sin limitación enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-desoxirribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-flúor ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "ácidos", 5-C-metil nucleótidos, e incorporación de resto de glicerilo terminal y/o desoxi abásico invertido. Se ha demostrado que tales modificaciones químicas conservan la actividad de ARNi en células aunque al mismo tiempo, aumentando dramáticamente la estabilidad sérica de estos compuestos. Además, una o más sustituciones de fosforotioato se toleran bien y se ha demostrado que confieren aumentos sustanciales de la estabilidad del suero para construtos de ARNds modificados.

55 En una realización, un ARNds dirigido a una IDH, *por ejemplo*, IDH1, ARN incluye nucleótidos modificados mientras mantiene la capacidad de mediar ARNi. Los nucleótidos modificados se pueden usar para mejorar las características *in vitro* o *in vivo* como estabilidad, actividad, y/o biodisponibilidad. Por ejemplo, El ARNds puede incluir nucleótidos

modificados como un porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula. Como tal, el ARNds generalmente puede incluir de 5 % a 100 % de nucleótidos modificados (*por ejemplo*, aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de nucleótidos modificados).

5 En algunas realizaciones, el ARNds dirigido a IDH, *por ejemplo*, IDH1, tiene aproximadamente de 21 nucleótidos de longitud. En otra realización, el ARNds no contiene ningún ribonucleótido, y en otra realización, el ARNds incluye uno o más ribonucleótidos. En una realización, cada hebra de la molécula de ARNds incluye independientemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 (*por ejemplo*, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 10 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 ARNds incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos o una porción del mismo del gen IDH1 o IDH2, y la segunda cadena del ARNds incluye una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a la 15 secuencia de nucleótidos del gen IDH1 o IDH2 o una porción del mismo.

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

25 Como se usa en el presente documento, el término "ARNds" pretende incluir moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar ARNi específicos de secuencia, tal como ARN de interferencia corto (ARNsi), ARN horquillado corto (ARNsh), oligonucleótido interferente corto, ácido nucleico interferente corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNsi modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNptgs), y 30 otros. Además, como se usa en el presente documento, el término "ARNi" pretende incluir ARN de interferencia específico de secuencia, tal como silenciamiento génico postranscripcional, inhibición traduccional, o epigenética.

Inhibidores de IDH basados en ácido nucleico

35 En una realización el inhibidor es un inhibidor basado en ácido nucleico, como un ARN bicatenario (ARNds) o ARN antisentido que se dirige a una IDH mutante, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2 mutante.

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, una molécula de ARNds o antisentido, disminuye o inhibe la expresión de una IDH1 que no sea una Arg, *por ejemplo*, teniendo una His, Ser, Cys, Gly, Val, 40 Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, N. Eng. J. Med. 360:765-73, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la FIG. 21). En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una enzima IDH1 que tiene His en el resto 132

En una realización el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNds que se dirige a un ARNm que codifica un alelo IDH1 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH1 que tiene otro que el Arg en el resto 132. Por 45 ejemplo, el alelo codifica His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro o Leu, o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 132, de acuerdo con la secuencia de SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig. 21).

En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene His en el resto 132.

50 En una realización el alelo codifica una IDH1 que tiene Ser en el resto 132.

En una realización, el inhibidor a base de ácido nucleico es un ARNds que se dirige a IDH1, por ejemplo, una IDH1 que tiene una A o una T (o un nucleótido distinto de C) en la posición del nucleótido 394 o una A (o un nucleótido 55 diferente de G) en la posición del nucleótido 395, *por ejemplo*, un alelo mutante que lleva una mutación C394T o una mutación G395A de acuerdo con la secuencia IDH1 de la SEQ ID NO: 8 (véase también la Fig 21A).

En una realización, el ARNds se dirige a una IDH1 que tiene otro distinto a C, por ejemplo, una T o una A, en la posición de nucleótido 394 o y que no sea G, *por ejemplo*, una A, en 395 (*por ejemplo*, un mutante) y una IDH1 que 60 tiene una C en la posición del nucleótido 394 o una G en la posición del nucleótido 395 (*por ejemplo*, un tipo silvestre), *por ejemplo*, dirigiéndose a una región del ARNm de IDH1 que es idéntica entre las transcripciones mutantes y de tipo silvestre. En otra realización más, el ARNds se dirige a un mutante o polimorfismo particular (como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), pero no es un alelo de tipo silvestre. En este caso, el inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNds, se dirige a la región del IDH1 que contiene la mutación.

65 En algunas realizaciones, el inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNds inhibe preferente o

específicamente el producto de una IDH1 mutante en comparación con el producto de un tipo silvestre IDH1. En algunas realizaciones, la IDH tiene una mutación en la posición 394 o 395 como un C394A, un C394G, un C394T, un G395C, una mutación G395T o G395A. Por ejemplo, en una realización, un ARNd se dirige a una región de un ARNm de IDH1 que lleva la mutación (*por ejemplo*, un C394A de C394T o una mutación G395A de acuerdo con la SEQ ID NO: 5).

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que incluye una cadena sentido y una cadena antisentido que tiene una secuencia primaria presentada en las Tablas 7-14. En otra realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido que incluye todo o parte de una secuencia primaria antisentido presentada en las Tablas 7-14 o que se dirige a la misma región o sustancialmente a la misma región que un dsRNA de las Tablas 7-14.

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una IDH2 que tiene Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10 (véase también la FIG. 22). En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico disminuye o inhibe la expresión de una enzima IDH2 que tiene Lys en el resto 172.

En una realización el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que se dirige a un ARNm que codifica un alelo IDH2 descrito en el presente documento, *por ejemplo*, un alelo IDH2 que tiene otro distinto a Arg en el resto 172. Por ejemplo, el alelo puede tener Lys, Gly, Met, Trp, Thr, Ser, o cualquier resto descrito en Yan *et al.*, en el resto 172, de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 (véase también la FIG. 22).

En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Lys en el resto 172.

En una realización el alelo codifica una IDH2 que tiene Met en el resto 172.

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que se dirige a IDH2, *por ejemplo*, una IDH2 que tiene una G o una T (o un nucleótido distinto de A o C) en la posición del nucleótido 514 o una A o T o C (o un nucleótido diferente de G) en la posición del nucleótido 515, *por ejemplo*, un alelo mutante que porta una mutación A514G o una mutación G515T o G515A de acuerdo con la secuencia IDH2 de la SEQ ID NO: 10 (Fig. 22A). En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que se dirige a IDH2, *por ejemplo*, una IDH2 que tiene una C o una T (o un nucleótido distinto de G o A) en la posición de nucleótido 516 de acuerdo con la secuencia IDH2 de la SEQ ID NO: 10.

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que se dirige a IDH2, *por ejemplo*, una IDH2 que tiene una G en la posición de nucleótido 514 o una T en la posición de nucleótido 515 o una A en la posición 515, de acuerdo con la secuencia IDH2 de SEQ ID NO: 10.

En una realización, el ARNd se dirige a una IDH2 que tiene otro distinto de A, *por ejemplo*, una G o una T, en la posición de nucleótido 514, o distinta de G, *por ejemplo*, una A o C o T en la posición 515 (*por ejemplo*, un mutante), o distinto de G, *por ejemplo*, C o T, y una IDH2 que tiene una A en la posición de nucleótido 514 o una G en la posición de nucleótido 515 o una G en la posición 516 (*por ejemplo*, un tipo silvestre), *por ejemplo*, dirigiéndose a una región del ARNm de IDH2 que es idéntica entre las transcripciones mutantes y de tipo silvestre. En otra realización más, el ARNd se dirige a un mutante o polimorfismo particular (como un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)), pero no es un alelo de tipo silvestre. En este caso, el inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNd, se dirige a la región del IDH2 que contiene la mutación.

En algunas realizaciones, el inhibidor basado en ácido nucleico, *por ejemplo*, un ARNd, preferentemente o específicamente inhibe el producto de un mutante IDH2 en comparación con el producto de un tipo silvestre IDH2. Por ejemplo, en una realización, un ARNd se dirige a una región de un ARNm de IDH2 que lleva la mutación (*por ejemplo*, una mutación A514G o G515T o G515U de acuerdo con la SEQ ID N°: 10).

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un ARNd que incluye una cadena sentido y una cadena antisentido que tiene una secuencia primaria presentada en las Tablas 15-23. En otra realización, el inhibidor basado en ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido que incluye todo o parte de una secuencia primaria antisentido presentada en las Tablas 15-23 o que se dirige a la misma o sustancialmente la misma región que un ARNd de las Tablas 15-23.

En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico se administra al cerebro, *por ejemplo*, directamente al cerebro, *por ejemplo*, por administración intratecal o intraventricular. El inhibidor basado en ácido nucleico también puede administrarse desde un dispositivo no implantable. En una realización, el inhibidor basado en ácido nucleico se administra por infusión usando, *por ejemplo*, un catéter, y opcionalmente, una bomba.

Antisentido

Los inhibidores adecuados basados en ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos antisentido. Aunque sin limitarse

a la teoría se cree que la inhibición antisentido se basa típicamente en la hibridación basada en enlaces de hidrógeno de cadenas o segmentos de oligonucleótidos de manera que al menos una cadena o segmento se escinde, degrada, o de lo contrario se vuelve inoperable.

Un agente antisentido se puede unir al ADN de IDH1 o IDH2. En realizaciones inhibe replicación y transcripción. aunque sin limitarse a la teoría se cree que un agente antisentido también puede funcionar para inhibir la translocación del ARN diana, *por ejemplo*, a un sitio de traducción de proteínas, traducción de la proteína del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARN, y la actividad catalítica o la formación de complejos que involucran al ARN.

Un agente antisentido puede tener una modificación química descrita anteriormente como adecuada para ARNs.

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) (oligozimas), y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se 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 de ácidos nucleicos diana para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido se puede hibridar específicamente cuando la unión del oligonucleótido al objetivo interfiere con la función normal de la molécula objetivo para causar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no objetivo bajo condiciones en donde 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 las condiciones en que se realicen los ensayos.

La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm (*por ejemplo*, un ARNm que codifica IDH1 o IDH2) puede interferir con una o más de las funciones normales de ARNm. aunque sin limitarse a la teoría se cree que algunas de las funciones del ARNm que se deben interferir incluyen todas las funciones clave como, *por ejemplo*, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas del ARN, empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede ser involucrada por el ARN. La unión de proteínas específicas al ARN también puede interferirse mediante la hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARN.

Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que se hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, *por ejemplo*, El ARNm codifica IDH1 o IDH2. La región complementaria se puede extender 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-(C₁-C₁₂) alquilaminocitosina y N⁴N⁴-(C₁-C₁₂) dialquilaminocitosina. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 7-aza-5-desazapurinas-7-sustituidas y 7-desazapurinas-7-sustituidas tales como, *por ejemplo*, 7-yodo-7-desazapurinas, 7-ciano-7-desazapurinas, 7-aminocarbonil-7-desazapurinas. 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, N⁶-(C₁-C₁₂) alquilaminopurinas y N⁶,N⁶-(C₁-C₁₂) dialquilaminopurinas, incluyendo N⁶-metilaminoadenina y N⁶,N⁶-dimetilaminoadenina, también son adecuadas las nucleobases modificadas. De forma similar, otras purinas 6-sustituidas que incluyen, *por ejemplo*, 6-tioguanina puede constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina, y 2-fluoroguanina. Los derivados de cualquiera de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente también son apropiados. Los sustituyentes de cualquiera de los compuestos anteriores pueden incluir alquilo C₁-C₃₀, alquenilo C₂-C₃₀, alquililo C₂-C₃₀, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcocarbonilo, y similares.

MicroARN

En algunas realizaciones, el inhibidor basado en ácido nucleico adecuado para dirigirse a IDH, *por ejemplo*, IDH1, es un microARN (ARNmi). Un miARN es un ARN de una sola hebra que regula la expresión de los ARNm diana ya sea por escisión del ARNm, represión/inhibición de la traducción o silenciamiento heterocromático. El ARNmi tiene de 18 a 25 nucleótidos, típicamente de 21 a 23 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el ARNmi incluye modificaciones químicas, tal como una o más modificaciones descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, un inhibidor basado en ácido nucleico que se dirige a IDH tiene una complementariedad parcial (es decir, complementariedad de menos del 100 %) con la IDH diana, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, ARNm. Por ejemplo, La complementariedad parcial puede incluir varios desemparejamientos o nucleótidos sin bases emparejadas (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 o más desemparejamientos o bases emparejadas, tal como protuberancias de nucleótidos), lo que puede dar como resultado protuberancias, bucles, o salientes que resultan

entre la cadena antisentido o la región antisentido del inhibidor basado en ácido nucleico y la molécula de ácido nucleico diana correspondiente.

Los inhibidores basados en ácido nucleico descritos en el presente documento, *por ejemplo*, ácido nucleico antisentido descrito en el presente documento, se pueden incorporar a un constructo genético para su uso como parte de un protocolo de terapia génica para administrar ácidos nucleicos que pueden usarse para expresar y producir agentes dentro de las células. Los constructos de expresión de tales componentes se pueden administrar en cualquier vehículo biológicamente eficaz, *por ejemplo*, cualquier formulación o composición capaz de entregar eficazmente el gen componente a las células *in vivo*. Los enfoques incluyen la inserción del gen del sujeto en vectores virales incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus y virus del herpes simple-1, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores virales transfectan células directamente; el ADN plasmídico se puede administrar con la ayuda de, *por ejemplo*, liposomas catiónicos (lipofectina) o conjugados de polilisina (*por ejemplo*, conjugado de anticuerpos) derivatizados, gramicidina S, envolturas virales artificiales u otros productos intracelulares, así como inyección directa de la construcción génica o la precipitación de CaPO₄ realizada *in vivo*.

En una realización, la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula incluye el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, *por ejemplo*, un ADNc. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células seleccionadas pueden recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, *por ejemplo*, por un ADNc contenido en el vector viral, se expresan de manera eficaz en células que han absorbido el ácido nucleico del vector viral.

Los vectores retrovirales y los vectores de virus adenoasociados se pueden usar como un sistema de administración de genes recombinantes para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes en células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de manera 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. Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE, y pEM que son conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de líneas de virus de empaquetamiento adecuadas para preparar sistemas retrovirales tanto ecotrópicos como anfotrópicos incluyen Crip, Cre, 2, y Am. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, *por ejemplo*, Eglitis *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; Pat. Estados Unidos N.ºs 4.868.116 y 4.980.286; PCT Pub. Nos. WO 89/07136, WO 89/02468, WO 89/05345, y WO 92/07573).

Otro sistema de administración de genes virales 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. Vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 d1324 u otras cepas de adenovirus (*por ejemplo*, Ad2, Ad3, Ad7 etc.) son conocidos por los expertos en la materia.

Otro sistema de vector viral útil para la administración del gen objeto es el virus adeno-asociado (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 presentadas en el presente documento incluyen los compuestos presentados 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.

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

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, adyuvantes y vehículos que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) como succinato de d- α -tocopherol polietilenglicol 1000, tensioactivos usados en formas de dosificación farmacéutica como Tweens u otras matrices de administración poliméricas similares, proteínas séricas, como albúmina de suero humano, sustancias tampón como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos

vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. Ciclodextrinas tales como α -, β -, y γ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente 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 IDH, *por ejemplo*, IDH1, se pueden administrar directamente al sistema nervioso central, como en el líquido cefalorraquídeo o en el cerebro. La administración puede ser, *por ejemplo*, en un bolo o mediante infusión continua con bomba. En ciertas realizaciones, la administración es por vía intratecal o por inyección intraventricular directamente en el cerebro. Un catéter y, opcionalmente, una bomba se puede usar para la administración. Los inhibidores se pueden suministrar y liberar desde un dispositivo implantable, *por ejemplo*, un dispositivo que se implanta en asociación con extirpación quirúrgica del tejido tumoral. *Por ejemplo*, para administración al cerebro, la administración puede ser análoga a la de Gliadel, una oblea de biopolímero diseñada para administrar carmustina directamente en la cavidad quirúrgica creada cuando se reseca un tumor cerebral. La oblea de Gliadel se disuelve lentamente y libera carmustina.

La terapéutica desvelada en el presente documento, *por ejemplo*, inhibidores basados en ácidos nucleicos, *por ejemplo*, los ARNsi se pueden administrar directamente al SNC, *por ejemplo*, el cerebro, *por ejemplo*, usando una bomba y/o sistema de catéter. En una realización, la bomba se implanta debajo de la piel. En una realización y un catéter unido a una bomba se inserta en el SNC, *por ejemplo*, en el cerebro o columna vertebral. En una realización, la bomba (como la bomba IsoMed Drug de Medtronic) administra la dosificación, *por ejemplo*, dosificación constante, de un inhibidor basado en ácido nucleico. En una realización, la bomba es programable para administrar dosis variables o constantes en intervalos de tiempo predeterminados. *Por ejemplo*, la bomba IsoMed Drug de Medtronic (o un dispositivo similar) se puede usar para administrar un suministro constante del inhibidor, o la bomba SynchroMedII Drug (o un dispositivo similar) se puede usar para administrar un régimen de dosificación variable.

Los métodos y dispositivos descritos en las patentes de Estados Unidos 7.044.932, 6.620.151, 6.283.949 y 6.685.452 se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteralmente, por inhalación, tópicamente, rectalmente, nasalmente, bucalmente, por vía vaginal o a través de un depósito implantado, preferentemente por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener cualquier excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico convencional. En algunos casos, el pH de la formulación se puede ajustar con ácidos farmacéuticamente aceptables, bases o tampones para mejorar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de suministro. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

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 pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, los aceites fijos, estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como aceite de oliva o 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 usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, como emulsiones y/o suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente Tweenes o Spans y/u otros agentes emulsionantes o potenciadores de biodisponibilidad similares que se usan comúnmente en la fabricación de sólidos farmacéuticamente aceptables, también se pueden usar líquidos u otras formas de dosificación para los fines de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral que incluye, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Agentes lubricantes, como estearato de magnesio, también se suelen añadir. Para administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones y/o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el principio activo que se puede suspender o disolver en una fase oleosa se combina con agentes emulsionantes y/o de suspensión. Si se

desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes 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 sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirán en el recto para liberar los componentes activos. Tales materiales incluyen, pero sin limitación, manteca de cacao, cera de abejas 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 aplicación tópica sobre la piel, la composición farmacéutica se debe formular con una pomada adecuada que contenga los componentes 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 blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, la composición farmacéutica se puede formular con una loción o crema adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en un vehículo con agentes emulsionantes adecuados. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecano, alcohol bencílico y agua. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden aplicar tópicamente al tracto intestinal inferior mediante una formulación de supositorio rectal o en una formulación de enema adecuada. En el presente documento también se describen parches tópicos transdérmicos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarburos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica.

Cuando las composiciones descritas en el presente documento 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 deben estar presentes en niveles de dosificación entre aproximadamente 1 y 100 %, y más preferentemente entre aproximadamente 5 y 95 % de la dosis normalmente administrada en un régimen de monoterapia. Los agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, a partir de los compuestos descritos en el presente documento. Como alternativa, esos agentes pueden ser parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos descritos en el presente documento en una sola composición.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden, por ejemplo, administrarse por inyección, por vía intravenosa, intraarterialmente, subdérmicamente, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular o subcutánea; u oralmente, bucalmente, nasalmente, transmucosalmente, tópicamente, en una preparación oftálmica, o por inhalación, con una dosificación que oscila entre aproximadamente 0,02 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, alternativamente dosis entre 1 mg y 1000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requisitos del medicamento 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 establecido. Típicamente, Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces por día o alternativamente, como infusión continua. Dicha administración se puede usar como terapia crónica o aguda. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo particular de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 95 % de compuesto activo (p/p). Como alternativa, tales preparaciones contienen de aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 % de compuesto activo.

Pueden requerirse dosis más bajas o más altas que las mencionadas anteriormente. La dosis específica y los regímenes de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, condición o síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, condición o síntomas, y el criterio del médico tratante.

Al mejorar la condición de un paciente, una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación descrita en el presente documento se puede administrar, si fuera necesario. Posteriormente, la dosificación o frecuencia de administración, o ambas, se puede reducir, en función de los síntomas, a un nivel en donde la condición mejorada se retiene cuando los síntomas se han aliviado al nivel deseado. Los pacientes pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Kits

Un compuesto descrito en el presente documento se puede proporcionar en un kit.

El kit puede incluir (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, marketing u otro material que se relaciona 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.

El kit puede proporcionar materiales para evaluar un sujeto. La evaluación puede ser, *por ejemplo*, para: identificar un sujeto que tiene niveles no deseados (*por ejemplo*, más altos que los presentes en células normales o de tipo silvestre) de cualquiera de 2HG, neoactividad 2HG o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad 2HG (o ARN correspondiente), o que tiene una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por neoactividad 2HG; diagnóstico, pronóstico, o estadificación, un sujeto, *por ejemplo*, basándose en tener niveles aumentados de 2HG, neoactividad 2HG, o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene neoactividad 2HG (o ARN correspondiente), o una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por neoactividad 2HG; seleccionando un tratamiento, o evaluando la eficacia de, un tratamiento, *por ejemplo*, basándose en que el sujeto tiene niveles aumentados de 2HG, neoactividad 2HG, o proteína IDH1 o IDH2 mutante que tiene una neoactividad 2HG (o ARN correspondiente), o una mutación somática en IDH1 o IDH2 caracterizada por neoactividad 2HG. El kit puede incluir uno o más reactivos útiles en la evaluación, *por ejemplo*, reactivos mencionados en el presente documento. Un reactivo de detección, *por ejemplo*, un anticuerpo u otro reactivo de unión específico se puede incluir. Patrones o muestras de referencia, *por ejemplo*, un patrón de control positivo o negativo se pueden incluir. Por ejemplo, si la evaluación se basa en la presencia de 2HG el kit puede incluir un reactivo, por ejemplo, un patrón de control positivo o negativo para un ensayo, *por ejemplo*, un ensayo de LC-MS.

Si la evaluación se basa en la presencia de neoactividad 2HG, el kit puede incluir un reactivo, *por ejemplo*, uno o más de los mencionados en el presente documento, para ensayar la neoactividad 2HG. Si la evaluación se basa en la secuenciación, el kit puede incluir cebadores u otros materiales útiles para secuenciar los ácidos nucleicos relevantes para identificar una IHD, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante neoactiva. Por ejemplo, el kit puede contener un reactivo que proporcione interrogación de la identidad, es decir, secuenciación de, el resto 132 de IDH1 para determinar si un mutante neoactivo está presente. El kit puede incluir ácidos nucleicos, *por ejemplo*, un oligómero, *por ejemplo*, cebadores, que permitan la secuenciación de los nucleótidos que codifican el resto 132 de IDH1. El kit puede incluir un ácido nucleico cuya hibridación o capacidad de amplificación, depende de la identidad del resto 132 de IDH1. El kit puede incluir un reactivo, *por ejemplo*, un anticuerpo u otra molécula de unión específica que puede identificar la presencia de un mutante neoactivo, *por ejemplo*, una proteína codificada por un mutante neoactivo en 132 de IDH1. Como se describe después, un kit también puede incluir tampones, disolventes, e información relacionada con la evaluación.

El material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, información del sitio de producción o lote, etc. El material informativo se puede relacionar con los métodos para administrar el compuesto.

El material informativo puede incluir instrucciones para administrar un compuesto descrito en el presente documento de una manera adecuada para realizar los métodos descritos en el presente documento, *por ejemplo*, en una dosis adecuada, forma de dosificación o modo de administración (*por ejemplo*, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descrito en el presente documento).

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*, un ser humano que tiene o está en riesgo de padecer un trastorno descrito en el presente documento.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, *por ejemplo*, instrucciones, se proporciona en material impreso, *por ejemplo*, un texto impreso, dibujo, y/o fotografía, *por ejemplo*, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, material legible por ordenador, grabación de video, o grabación de audio.

El material informativo del kit puede ser información de contacto, *por ejemplo*, una dirección física, dirección de correo electrónico, sitio web, o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información importante sobre un compuesto descrito en el presente documento y/o su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además de un compuesto descrito en el presente documento, La composición del kit puede incluir otros ingredientes, como un disolvente o tampón, un estabilizante, un conservante, un agente aromatizante (*por ejemplo*, un antagonista 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. Alternativamente, los otros ingredientes pueden

incluirse en el kit, pero en composiciones o recipientes diferentes a los compuestos descritos en el presente documento. 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.

- 5 Un compuesto descrito en el presente documento se puede proporcionar en cualquier forma, *por ejemplo*, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que un compuesto descrito en el presente documento sea sustancialmente puro y/o estéril. Cuando un compuesto descrito en el presente documento se proporciona en una solución líquida, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Cuando un compuesto descrito en el presente documento se proporciona como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, *por ejemplo*, agua estéril o tampón, opcionalmente se puede proporcionar en el kit.

- 15 El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene un compuesto descrito en el presente documento. El kit puede contener 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 de plástico o paquete.

- 20 Los elementos separados del kit pueden estar contenidos dentro de un recipiente indiviso, único. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que haya adherido al material informativo en forma de etiqueta.

- 25 El kit puede incluir una pluralidad (*por ejemplo*, un paquete) de recipientes individuales, cada uno conteniendo una o más formas de dosificación unitaria (*por ejemplo*, una forma de dosificación 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 papel de aluminio o paquetes de blíster, cada uno de los cuales contiene una dosis unitaria de un compuesto descrito en el presente documento. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos, impermeables (*por ejemplo*, impermeables a los cambios en la humedad o evaporación), y/o herméticos a la luz.

- 30 El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, *por ejemplo*, una jeringa, inhalador, pipeta, fórceps, cuchara medida, cuentagotas (*por ejemplo*, cuentagotas ocular), hisopo (*por ejemplo*, un hisopo de algodón o un hisopo de madera), o cualquier otro dispositivo de administración.

El dispositivo puede ser un dispositivo de implante médico, *por ejemplo*, empaquetado para inserción quirúrgica.

35 Terapias combinadas

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

Quimioterapia

- 45 Un compuesto o composición descrita en el presente documento, se puede administrar con quimioterapia. La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con fármacos que pueden destruir las células cancerosas. "Quimioterapia" generalmente se refiere a los fármacos citotóxicos que afectan a las células en rápida división en general, en contraste con la terapia dirigida. Los fármacos de quimioterapia interfieren con la división celular de varias maneras posibles, *por ejemplo*, con la duplicación de ADN o la separación de cromosomas recién formados. La mayoría de las formas de quimioterapia se dirigen a todas las células que se dividen rápidamente y no son específicas para las células cancerosas, aunque un cierto grado de especificidad puede provenir de la incapacidad de muchas células cancerosas para reparar el daño del ADN, aunque las células normales generalmente pueden.

- 50 Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos usados en terapia para cáncer incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (*por ejemplo*, ácido fólico, purina, y derivados de pirimidina) y agentes alquilantes (*por ejemplo*, mostazas de nitrógeno, nitrosoureas, platino, alquil sulfonatos, hidrazinas, triazenos, aziridinas, veneno del huso, agentes citotóxicos, inhibidores de la topoisomerasa y otros). Los agentes ejemplares incluyen aclarrubicina, Actinomicina, Alitretinon, Altretamina, Aminopterina, Ácido aminolevulínico, Amrubicina, Amsacrina, Anagrelida, Trióxido de arsénico, Asparaginasa, Atrasentan, Belotecan, Bexaroteno, endamustina, Bleomicina, Bortezomib, Busulfan, Camptotecina, Capecitabina, Carboplatino, Carboquona, Carmofur, Carmustina, Celecoxib, Clorambucilo, Clometina, Cisplatino, Cladribina, Clofarabina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Decitabina, Demecolcina, Docetaxel, Doxorubicina, Efaproxiral, Elesclomol, Elsamitrucina, Enocitabina, Epirubicina, Estramustina, Etopósido, Floxuridina, Fludarabina, Fluorouracilo (5FU), Fotemustina, Gemcitabina, Implantes de Gliadel, Hidroxicarbamida, Hidroxiurea, Idarubicina, Ifosfamida, Irinotecan, Irofulven, Ixabepilona, Larotaxel, Leucovorina, Doxorubicina liposomal, Daunorrubicina liposomal, Lonidamina, Lomustina, Lucantona, Manosulfán, Masoprocól, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Aminolevulinato de metilo, Mitobronitol, Mitoguazona, Mitotano, Mitomicina, Mitoxantrona, Nedaplatino,

Nimustina, Oblimerseno, Omacetaxina, Ortataxel, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pegaspargasa, Pemetrexed, Pentostatina, Pirarubicina, Pixantrona, Plicamicina, Porfímero sódico, Prednimustina, Procarbazina, Raltitrexed, Ranimustina, Rubitecán, Sapacitabina, Semustina, Sitimagen ceradenovec, Estrataplato, Estreptozocina, Talaporfina, Tegafur-uracilo, Temoporina, Temozolomida, Tenipósido, Tesetaxel, Testolactona, Tetranitrato, Tiotepa, Tiazofurina, Tioguanina, Tipifarnib, Topotecán, Trabectedina, Triaziquona, Trietilenmelamina, Triplatino, 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, dos o más fármacos a menudo se administran al mismo tiempo. A menudo, dos o más agentes de quimioterapia se usan como quimioterapia de combinación. Los agentes quimioterapéuticos (incluyendo quimioterapia de combinación) se pueden usar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento, *por ejemplo*, fenformina.

Terapia dirigida

Un compuesto o composición descrita en el presente documento, se puede administrar con una terapia dirigida. La terapia dirigida constituye el uso de agentes específicos para las proteínas desreguladas de las células cancerosas. Los fármacos de terapia dirigida de moléculas pequeñas son generalmente inhibidores de los dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas, o de otro modo críticas dentro de la célula cancerosa. Ejemplos destacados son los inhibidores de la tirosina quinasa como axitinib, Bosutinib, Cediranib, dasatinib, erlotinib, imatinib, gefitinib, lapatinib, Lestaurtinib, Nilotinib, Semaxanib, Sorafenib, Sunitinib, y Vandetanib, y también inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina, como Alvocidib y Seliciclib. La terapia con anticuerpos monoclonales es otra estrategia en donde 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 típicamente en el cáncer de mama, y el anticuerpo anti-CD20 rituximab y Tositumomab se usan típicamente 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. La terapia dirigida se puede usar en combinación con un compuesto descrito en el presente documento, *por ejemplo*, una biguanida como metformina o fenformina, preferentemente fenformina.

La terapia dirigida también puede involucrar pequeños péptidos como "dispositivos de orientación" que pueden unirse a los receptores de la superficie celular o a la matriz extracelular afectada que rodea el tumor. Los radionúclidos que están unidos a estos péptidos (*por ejemplo*, RGD) eventualmente matan a la célula cancerosa si el núclido se descompone en la proximidad de la célula. Un ejemplo de dicha terapia incluye BEXXAR®.

Inmunoterapia

Un compuesto o composición descrita en el presente documento, se puede administrar con una inmunoterapia. La inmunoterapia del cáncer se refiere a un conjunto diverso de estrategias terapéuticas diseñadas para inducir al propio sistema inmunitario del paciente a combatir el tumor. Los métodos contemporáneos para generar una respuesta inmunitaria contra los tumores incluyen inmunoterapia intravesicular con BCG para cáncer de vejiga superficial y el uso de interferones y otras citoquinas para inducir una respuesta inmunitaria en pacientes con carcinoma de células renales y melanoma.

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas se puede considerar una forma de inmunoterapia, ya que las células inmunitarias del donante a menudo atacarán el tumor en un efecto de injerto contra tumor. Los agentes de inmunoterapia se pueden usar en combinación con un compuesto o composición descrita en el presente documento.

Terapia hormonal

Un compuesto o composición descrita en el presente documento, se puede administrar 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 ciertos tipos de cáncer de mama y próstata. Eliminar o bloquear el estrógeno o la testosterona a menudo es un tratamiento adicional importante. En ciertos cánceres, la administración de agonistas hormonales, tales como progestágenos puede ser terapéuticamente beneficioso. Los agentes de terapia hormonal se pueden usar en combinación con un compuesto o una composición descrita en el presente documento.

Un compuesto o composición descrita en el presente documento, se puede administrar junto con un tratamiento adicional para el cáncer (*por ejemplo*, extirpación quirúrgica), en el tratamiento del cáncer en el sistema nervioso, *por ejemplo*, cáncer del sistema nervioso central, *por ejemplo*, tumor cerebral, *por ejemplo*, glioma, *por ejemplo*, glioblastoma multiforme (GBM).

Varios estudios han sugerido que más del 25 % de los pacientes con glioblastoma obtienen un beneficio significativo

de supervivencia con la quimioterapia adyuvante. Los meta-análisis han sugerido que la quimioterapia adyuvante da como resultado un aumento del 6-10 % en la tasa de supervivencia a 1 año.

La temozolomida es un agente alquilante activo por vía oral que se usa para personas con diagnóstico reciente de glioblastoma multiforme. Fue aprobado por la United States Food and Drug Administration (FDA) en marzo de 2005. Los estudios han demostrado que el fármaco fue bien tolerado y proporcionó un beneficio de supervivencia. La temozolomida adyuvante y simultánea con radiación se asoció con mejoras significativas en la supervivencia media libre de progresión con respecto a la radiación sola (6,9 frente a 5 meses), la supervivencia general (14,6 frente a 12,1 meses) y la probabilidad de estar vivo en 2 años (26 % frente a 10 %).

Nitrosoureas: En 2002 la FDA aprobó las obleas de polímero BCNU (carmustina) (Gliadel). Aunque las obleas de Gliadel se usan para tratamiento inicial, han mostrado solo un aumento moderado en la supervivencia media con respecto al placebo (13,8 frente a 11,6 meses) en el ensayo más grande de este tipo de fase III, y se asocian con mayores tasas de fuga de CSF y mayor presión intracraneal secundaria a edema y efecto de masa.

MGMT es una enzima reparadora del ADN que contribuye a la resistencia a la temozolomida. La metilación del promotor MGMT, encontrado en aproximadamente el 45 % de glioblastoma multiformes, resulta en un silenciamiento epigenético del gen, disminuyendo la capacidad de las células tumorales para la reparación del ADN y aumentando la susceptibilidad a la temozolomida.

Cuando los pacientes con y sin metilación de promotor MGMT se trataron con temozolomida, los grupos tuvieron un promedio de supervivencia de 21,7 frente a 12,7 meses, y tasas de supervivencia de 2 años de 46 % frente a 13,8 %, respectivamente.

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

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

Carmustina (BCNU) y cis -platino (cisplatino) han sido los principales agentes quimioterapéuticos usados contra los gliomas malignos. Todos los agentes en uso no tienen una tasa de respuesta superior al 30-40 %, y la mayoría cae en el intervalo de 10-20 %.

Los datos de la Universidad de California en San Francisco indican que, para el tratamiento de glioblastomas, la cirugía seguida de radioterapia conduce 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 con regímenes basados en nitrosourea dio como resultado tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años del 46 %, 18 %, y 18 %, respectivamente.

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

La infusión a presión de agentes quimioterapéuticos a través de un catéter intracraneal, también conocida como administración mejorada por convección (CED), tiene la ventaja de administrar fármacos junto con un gradiente de presión en lugar de por difusión simple. CED ha mostrado resultados prometedores en modelos animales con agentes que incluyen BCNU y topotecán.

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

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

El genotipado de tumores cerebrales puede tener aplicaciones en la estratificación de pacientes para ensayos clínicos de varias terapias novedosas.

El agente antiangiogénico bevacizumab, cuando se usó con irinotecán mejoró la supervivencia a los 6 meses en pacientes con glioma recurrente a 46 % en comparación con el 21 % en pacientes tratados con temozolomida. Se ha demostrado que esta combinación de bevacizumab e irinotecán para el glioblastoma multiforme recurrente mejora la

supervivencia con respecto al bevacizumab solo. Los agentes antiangiogénicos también disminuyen el edema peritumoral, reduciendo potencialmente la dosis necesaria de corticosteroides.

Algunos glioblastomas responden a gefitinib o erlotinib (inhibidores de la tirosina quinasa). La presencia simultánea de células de glioblastoma de EGFR mutante (EGFRviii) y PTEN se asoció con la capacidad de respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa, mientras que el aumento de p-akt predice un efecto disminuido. Otras dianas incluyen PDGFR, VEGFR, mTOR, farnesiltransferasa, y PI3K.

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

Selección/seguimiento de pacientes

En el presente documento se describen métodos para tratar un trastorno relacionado con la proliferación celular, *por ejemplo*, cáncer, en un sujeto y métodos de identificación de un sujeto para un tratamiento descrito en el presente documento. En el presente documento también se describen métodos para predecir un sujeto que está en riesgo de desarrollar cáncer (*por ejemplo*, un cáncer asociado con una mutación en una enzima (*por ejemplo*, una enzima en la ruta metabólica como IDH1 y/o IDH2)). El cáncer se caracteriza generalmente por la presencia de una neoactividad, como una ganancia de función en una o más enzimas mutantes (*por ejemplo*, una enzima en la ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2). El sujeto puede seleccionarse basándose en el sujeto que tiene un gen mutante que tiene una neoactividad, *por ejemplo*, una neoactividad descrita en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "seleccionar" significa seleccionar todo o parte sobre dicha base.

Un sujeto puede seleccionarse para el tratamiento con un compuesto descrito en el presente documento basándose en una determinación de que el sujeto tiene una enzima mutante descrita en el presente documento (*por ejemplo*, una enzima en la ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2). La enzima mutante puede tener una neoactividad y el paciente se selecciona sobre esa base. La neoactividad de la enzima se puede identificar, *por ejemplo*, evaluando el sujeto o muestra (*por ejemplo*, tejido o fluido corporal) del mismo, por 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 se puede utilizar para identificar (*por ejemplo*, evaluar) la neoactividad de la enzima incluye el líquido amniótico que rodea al feto, humor acuoso, sangre (*por ejemplo*, plasma sanguíneo), fluido cerebroespinal, cerumen, quimo, fluido de Cowper, eyaculado femenino, líquido intersticial, linfa, leche de mama, moco (*por ejemplo*, drenaje nasal o flema), líquido pleural, pus, saliva, sebo, semen, suero, sudor, lágrimas, orina, secreción vaginal o vómito.

Un sujeto se puede evaluar para la neoactividad de una enzima usando resonancia magnética. *Por ejemplo*, cuando la enzima mutante es IDH1 o IDH2 y la neoactividad es la conversión de α -cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, el sujeto se puede evaluar por la presencia de y/o una cantidad elevada de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato en relación con la cantidad de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato presente en un sujeto que no tiene una mutación en IDH1 o IDH2 que tiene la actividad anterior. En algunas realizaciones, la neoactividad de IDH1 o IDH2 se puede determinar por la presencia o la cantidad elevada de un pico correspondiente a 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato según lo determinado por resonancia magnética. *Por ejemplo*, un sujeto se puede evaluar por la presencia y/o potencia de una señal a aproximadamente 2,5 ppm para determinar la presencia y/o cantidad de 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato en el sujeto. Esto se puede correlacionar y/o predecir una neoactividad descrita en el presente documento para la enzima mutante IDH. De forma similar, la presencia, la fuerza y/o la ausencia de una señal a aproximadamente 2,5 ppm podrían predecir una respuesta al tratamiento y, por lo tanto, usarse como un biomarcador no invasivo para la respuesta clínica.

La neoactividad de una enzima mutante como IDH también se puede evaluar usando otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. *Por ejemplo*, la presencia o cantidad de un sustrato marcado, cofactor, y/o el producto de reacción se puede medir como un sustrato etiquetado con ^{13}C o ^{14}C , cofactor, y/o producto de reacción. La neoactividad se puede evaluar evaluando la reacción directa de la enzima de tipo silvestre/no mutante (como la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato en una enzima IDH1 o IDH2 mutante, específicamente una enzima IDH1 mutante) y/o la reacción correspondiente a la neoactividad (*por ejemplo*, la conversión de α -cetoglutarato a 2-hidroxiglutarato, *por ejemplo*, R-2-hidroxiglutarato en una enzima IDH1 o IDH2 mutante, específicamente una enzima IDH1 mutante).

Trastornos

Los métodos relacionados con IDH desvelados en el presente documento, *por ejemplo*, métodos de evaluación o tratamiento de sujetos, se dirigen a sujetos que tienen un trastorno relacionado con la proliferación celular caracterizado por una IDH mutante, *por ejemplo*, una IDH1 o IDH2, mutante que tiene neoactividad, *por ejemplo*,

neoadtividad 2HG. Se ha demostrado que los ejemplos de algunos de los trastornos a continuación se caracterizan por una mutación IDH1 o IDH2. Otros se pueden analizar, *por ejemplo*, mediante secuenciación de muestras de células para determinar la presencia de una mutación somática en el aminoácido 132 de IDH1 o en el aminoácido 172 de IDH2. Sin queda limitado a la teoría se espera que una porción de los tumores de un tipo de cáncer dado

5 tenga una IDH, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2, mutante que tenga neoadtividad 2HG.

Los métodos desvelados son útiles para evaluar o tratar trastornos proliferativos, por ejemplo evaluar o tratar tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y metástasis de los mismos en donde el tumor sólido, un tumor de

10 tejido blando o metástasis del mismo es un cáncer descrito en el presente documento. Los tumores sólidos ejemplares incluyen tumores malignos (*por ejemplo*, sarcomas, adenocarcinomas, y carcinomas) de los diversos sistemas orgánicos, como los del cerebro, pulmón, pecho, linfode, gastrointestinal (*por ejemplo*, colon), y tractos genitourinarios (*por ejemplo*, tumores renal, urotelial o testicular), faringe, próstata, y ovario. Los adenocarcinomas ejemplares incluyen cánceres colorrectales, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma no microcítico del pulmón y cáncer del intestino delgado. Los métodos desvelados también son útiles para evaluar o

15 tratar cánceres no sólidos.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar con cualquier cáncer, por ejemplo llos descritos por el National Cancer Institute. Se puede evaluar un cáncer para determinar si está usando un método descrito en el presente documento. Los cánceres ejemplares descritos por el National Cancer Institute incluyen: Leucemia linfoblástica aguda, Adulto; Leucemia linfoblástica aguda, Infancia; Leucemia mieloide aguda, Adulto; Carcinoma adrenocortical; Carcinoma adrenocortical, Infancia; Linfoma relacionado con el SIDA; Neoplasias relacionadas con el SIDA; Cáncer anal; Astrocitoma, Cerebeloso Infantil; Astrocitoma, Cerebral Infantil; Cáncer de conductos biliares, Extrahepático; Cáncer de vejiga; Cáncer de vejiga, Infancia; Cáncer de hueso, Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno; Glioma del tronco encefálico, Infancia; Tumor cerebral, Adulto; Tumor cerebral, Glioma del tronco encefálico, Infancia; Tumor cerebral, Astrocitoma cerebeloso, Infancia; Tumor cerebral, Astrocitoma cerebral/glioma maligno, Infancia; Tumor cerebral, Ependimoma, Infancia; Tumor cerebral, Meduloblastoma, Infancia; Tumor cerebral, Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Infancia; Tumor cerebral, Glioma de la ruta visual e hipotalámico, Infancia; Tumor cerebral, Infancia (Otros); Cáncer de mama; Cáncer de mama y embarazo; Cáncer de mama, Infancia; Cáncer de mama, Masculino; Adenomas/carcinoides bronquiales, Infancia; Tumor carcinoide, Infancia; Tumor carcinoide, Gastrointestinal; Carcinoma, Adrenocortical; Carcinoma, Célula de los islotes; Carcinoma primario desconocido; Linfoma del sistema nervioso central, Primario; Astrocitoma cerebeloso, Infancia; Astrocitoma cerebral/glioma maligno, Infancia; Cáncer de cuello uterino; Cánceres infantiles; Leucemia linfocítica crónica; Leucemia mielógena crónica; Trastornos mieloproliferativos crónicos; Sarcoma de células claras de vainas tendinosas; Cáncer de colon; Cáncer colorrectal, Infancia; Linfoma cutáneo de linfocitos T; Cáncer endometrial; Ependimoma, Infancia; Cáncer epitelial, Ovario; Cáncer de esófago; Cáncer de esófago, Infancia; Familia de tumores de Ewing; Tumor extracraneal de células germinales, Infancia; Tumor de células germinales extragonadales; Cáncer de conducto biliar extrahepático; Cáncer ocular, Melanoma intraocular; Cáncer ocular, Retinoblastoma; Cáncer de vesícula biliar; Cáncer gástrico (estómago); Cáncer gástrico (estómago), Infancia; Tumor carcinoide gastrointestinal; Tumor de células germinales, Extracraneal, Infancia; Tumor de células germinales, Extragonadal; Tumor de células germinales, Ovario; Tumor trofoblástico gestacional; Glioma, Tallo cerebral infantil; Glioma, Vía visual e hipotálamo infantil; Leucemia de células pilosas; Cáncer de cabeza y cuello; Cáncer hepatocelular (hígado), Adulto (Primario); Cáncer hepatocelular (hígado), Infancia (Primario); Linfoma de Hodgkin, Adulto; Linfoma de Hodgkin, Infancia; Linfoma de Hodgkin durante el embarazo; Cáncer hipofaríngeo; Glioma hipotalámico y de la vía visual, Infancia; Melanoma intraocular; Carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino); Sarcoma de Kaposi; Cáncer de riñón; Cáncer de laringe; Cáncer de laringe, Infancia; Leucemia, Linfoblástica aguda, Adulto; Leucemia, Linfoblástica aguda, Infancia; Leucemia, Mieloide aguda, Adulto; Leucemia, Mieloide aguda, Infancia; Leucemia, Linfocítico crónico; Leucemia, Mielógena crónica; Leucemia, Célula pilosa; Cáncer de labios y cavidad oral; Cáncer de hígado, Adulto (Primario); Cáncer de hígado, Infancia (Primario); Cáncer de pulmón, Célula microcítica; Cáncer de pulmón, Célula pequeña; Leucemia linfoblástica, Adulto agudo; Leucemia linfoblástica, Aguda infantil; Leucemia linfocítica, Crónico; Linfoma, Relacionado con el SIDA; Linfoma, Sistema Nervioso Central (Primario); Linfoma, Cutáneo de linfocitos T; Linfoma, Hodgkin, Adulto; Linfoma, Hodgkin, Infancia; Linfoma, Hodgkin durante el embarazo; Linfoma, No Hodgkin, Adulto; Linfoma, No Hodgkin, Infancia; Linfoma, No Hodgkin durante el embarazo; Linfoma, Sistema nervioso central primario; Macroglobulinemia, Waldenstrom; Cáncer de mama masculino; Mesotelioma maligno, Adulto; Mesotelioma maligno, Infancia; Timoma maligno; Meduloblastoma, Infancia; Melanoma; Melanoma, Intraocular; Carcinoma de células de Merkel; Mesotelioma, Maligno; Cáncer escamoso metastásico del cuello con primario oculto; Síndrome de neoplasia endocrina múltiple, Infancia; Mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas; Micosis fungoides; Síndromes mielodisplásicos; Leucemia mielógena, Crónico; Leucemia mieloide, Aguda infantil; Mieloma, Múltiple; Trastornos mieloproliferativos, Crónico; Cáncer de cavidad nasal y seno paranasal; Cáncer nasofaríngeo; Cáncer nasofaríngeo, Infancia; Neuroblastoma; Linfoma no Hodgkin, Adulto; Linfoma no Hodgkin, Infancia; Linfoma no Hodgkin durante el embarazo; Cáncer de pulmón no microcítico; Cáncer oral, Infancia; Cáncer de cavidad oral y labio; Cáncer orofaríngeo; Osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno del hueso; Cáncer de ovarios, Infancia; Cáncer epitelial de ovario; Tumor de células germinales de ovario; Tumor de potencial maligno bajo ovárico; Cáncer de páncreas; Cáncer de páncreas, Infancia; Cáncer de páncreas, Célula de los islotes; Cáncer de seno paranasal y cavidad nasal; Cáncer de paratiroides; Cáncer de pene; Feocromocitoma; Tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales, Infancia; Tumor pituitario; Neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple; Blastoma

pleuropulmonar; Embarazo y Cáncer de mama; Embarazo y linfoma de Hodgkin; Embarazo y linfoma no Hodgkin; Linfoma primario del sistema nervioso central; Cáncer primario de hígado, Adulto; Cáncer primario de hígado, Infancia; Cáncer de próstata; Cáncer rectal; Cáncer de células renales (riñón); Cáncer de células renales, Infancia; Pelvis renal y uréter, Cáncer de células transicionales; Retinoblastoma; Rhabdomyosarcoma, Infancia; Cáncer de glándula salival; Cáncer de glándula salival, Infancia; Sarcoma, Familia de tumores de Ewing; Sarcoma, Kaposi; Sarcoma (osteosarcoma)/histiocitoma fibroso maligno del hueso; Sarcoma, Rhabdomyosarcoma, Infancia; Sarcoma, Tejido blando, Adulto; Sarcoma, Tejido blando, Infancia; Síndrome de Sezary; Cáncer de piel; Cáncer de piel, Infancia; Cáncer de piel (melanoma); Carcinoma de piel, Células de Merkel; Cáncer de pulmón microcítico; Cáncer de intestino delgado; Sarcoma de tejido blando, Adulto; Sarcoma de tejido blando, Infancia; Cáncer de cuello escamoso con primario oculto, Metastático; Cáncer de estómago (gástrico); Cáncer de estómago (gástrico), Infancia; Tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, Infancia; Linfoma de linfocitos T, Cutáneo; Cáncer testicular; Timoma, Infancia; Timoma, Maligno; Cáncer de tiroides; Cáncer de tiroides, Infancia; Cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter; Tumor trofoblástico, Gestacional; Sitio primario desconocido, Cáncer de, Infancia; Cánceres inusuales de la infancia; Uréter y pelvis renal, Cáncer de células transicionales; Cáncer de uretra; Sarcoma uterino; Cáncer de vagina; Glioma de la ruta visual e hipotalámico, Infancia; Cáncer vulvar; Macroglobulinemia de Waldenstrom; y tumor de Wilms. Las metástasis de los cánceres mencionados anteriormente también se pueden tratar o prevenir de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles en el tratamiento del cáncer en el sistema nervioso, *por ejemplo*, tumor cerebral, *por ejemplo*, glioma, *por ejemplo*, glioblastoma multiforme (GBM), *por ejemplo*, al inhibir la neoactividad de una enzima mutante, *por ejemplo*, una enzima en una ruta metabólica, *por ejemplo*, una ruta metabólica que conduce a la biosíntesis de ácidos grasos, la glucólisis, glutaminólisis, derivación de la pentosa fosfato, la ruta biosintética del nucleótido, o la ruta biosintética de los ácidos grasos, *por ejemplo*, IDH1 o IDH2.

Los gliomas, un tipo de tumores cerebrales, se pueden clasificar como 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 grado superior. 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, xantastrocitoma pleomórfico, astrocitoma anaplásico, astrocitoma, glioblastoma de células gigantes, glioblastoma, glioblastoma secundario, glioblastoma primario en adultos, y glioblastoma pediátrico primario); tumor oligodendroglioma (*por ejemplo*, oligodendroglioma, y oligodendroglioma anaplásico); tumor oligastrocítico (*por ejemplo*, oligastrocitoma, y oligastrocitoma anaplásico); ependimoma (*por ejemplo*, ependimoma mixopapilar, y ependimoma anaplásico); meduloblastoma; tumor neuroectodérmico primitivo, schwannoma, meningioma, meningioma meatípico, meningioma anaplásico; y adenoma hipofisario. Los cánceres ejemplares se describen en Acta Neuropathol (2008) 116:597-602 y N Engl J Med. 19 de febrero de 2009; 360(8):765-73.

En realizaciones el trastorno es glioblastoma.

En una realización el trastorno es cáncer de próstata, *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 mayor 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 como se describen en el presente documento se pueden combinar con un tratamiento conocido en la técnica. El tratamiento conocido para el cáncer de próstata puede incluir, *por ejemplo*, vigilancia activa, cirugía (*por ejemplo*, prostatectomía radical, resección transuretral de la próstata, orquiectomía, y criocirugía), radioterapia incluyendo braquiterapia (braquiterapia de próstata) y radioterapia de haz externo, ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal (*por ejemplo*, antiandrógenos (*por ejemplo*, laflutamida, bicalutamida, nilutamida y acetato de ciproterona, ketoconazol, aminoglutetimida), antagonistas de GnRH (*por ejemplo*, Abarelix)), o una combinación de los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1 clonación, mutagénesis expresión y purificación de IDH1

1. IDH1 de tipo silvestre se clonó en pET41a, creando la etiqueta His8 en el extremo C-terminal.

La región codificante del gen IDH1 (ADNc) se adquirió en Invitrogen en el vector pENTR221 (www.invitrogen.com, Cat N.º B-068487_Ultimate_ORF). Los oligonucleótidos se diseñaron para realizar la PCR de 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: TAATCTCGAGTGAAAGTTTGGCCTGAGCTAGTT (SEQ ID NO: 2)). El producto de PCR se clona en el vector pET41a escindiendo NdeI/XhoI. La escisión NdeI/XhoI del vector pET41a libera la parte GST del plásmido, y crea una etiqueta His8 C-terminal (SEQ ID NO: 3) sin la fusión GST N-terminal. El codón de parada original de IDH1

es cambio a serina, por lo que la secuencia de unión en la proteína IDH1 final es: Ser-Leu-Glu-His-His-His-His-His-His-His-Stop (SEQ ID NO: 4).

Se eligió la estrategia de etiqueta His C-terminal en lugar de la estrategia de etiqueta His N-terminal, porque la etiqueta C-terminal podría no afectar negativamente a la actividad o al plegamiento 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 por secuenciación de ADN. FIG. 1 muestra la verificación detallada de la secuencia de pET41a-IDH1 y la alineamiento con CDS IDH1 publicado a continuación.

2. Mutagénesis Dirigida al sitio IDH1 para crear los mutantes IDHr132s e IDHr132h.

Se realizó mutagénesis dirigida al sitio para convertir R132 a S o H, La secuenciación de ADN confirmó que G395 está mutado a A (creando mutación Arg→His en la proteína IDH1), y C394 está mutado a A (creando Arg→Ser en la proteína IDH1). El método detallado para la mutagénesis dirigida al sitio se describe en el manual del usuario del kit de mutagénesis de dirección múltiple QuikChange® (Stratagene, cat. N.º 200531). FIG. 2 muestra la verificación de la secuencia de ADN de tales mutaciones. Los nucleótidos resaltados se cambiaron con éxito en la mutagénesis: mutación G395→A permite el aminoácido Arg132→His; mutación C394→A permite el aminoácido Arg132→Ser.

3. Expresión y purificación de proteína IDH1.

Las proteínas IDHwt, IDHR132S e IDHR132H se expresaron en la cepa Rosetta de *E. coli* y se purificaron de acuerdo con el procedimiento detallado a continuación. Las proteínas IDH1 activas están en forma dimérica, y la fracción/pico de la columna SEC que corresponde a la forma dimérica se recogió para análisis enzimológico 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 DO600 alcanza 0,6. La temperatura se cambió a 18 °C y se indujo la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Las células se recogieron 12-16 horas después de la inducción de IPTG.

B. Sistema tampón:

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

Tampón A en 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,

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

C. Procedimiento de purificación de proteína

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 al pasar la célula a través de Microfluidizer con una presión de 15.000 psi 3 veces.

3. La proteína soluble se recogió del sobrenadante después de la centrifugación a 20.000 g (Beckman Avanti J-26XP) durante 30 minutos a 4 °C.

4. 5-10 ml de la columna de Ni se equilibraron con el tampón A hasta que el valor de A280 alcanzó el nivel inicial. El sobrenadante se cargó en una columna de 5 ml de Ni-Sepharose (2 ml/min). La columna se lavó con 10-20 CV de tampón de lavado (90 % de tampón A + 10 % de tampón B) hasta que A280 alcanzó la línea de base (2 ml/min).

5. La proteína se eluyó mediante un gradiente de revestimiento del 10-100 % de tampón B (20 CV) con un caudal de 2 ml/min y las fracciones de la muestra se recogieron como 2 ml/tubo.

6. Las muestras se analizaron en gel SDS-PAGE.

7. Las muestras se recogieron y se dializaron contra 200x de tampón de filtración en gel 2 veces (1 hora y > 4 horas).

8. Las muestras se concentraron a 10 ml.

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

10. La columna se lavó con 10 CV de tampón C, recogiendo las fracciones como 2-4 ml/tubo.

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

D. Resultados de la purificación de proteína

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

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

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

5 Ejemplo 2 análisis enzimológico de IDH1 tipo silvestre y mutantes

1. *Análisis de IDH1 de tipo silvestre y R132H y R132S mutantes en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -Cetoglutarato (α -KG).*

10 A. Métodos

Para determinar la eficacia catalítica de las enzimas en la descarboxilación oxidativa del isocitrato en la dirección de α -Cetoglutarato (α -KG), se realizaron reacciones para determinar $V_{\max}$ y K_m para isocitrato. En estas reacciones, el sustrato se varió aunque el cofactor se mantuvo constante a 500 μ M. Todas las reacciones se realizaron en NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, glicerol al 10 % y BSA al 0,03 % (p/v). El progreso de la reacción fue seguido por espectroscopía a 340 nM que controlaba el cambio en el estado de oxidación del cofactor. Se añadió suficiente enzima para dar un cambio lineal en la absorbancia durante 10 minutos.

B. ICDH1 R132H e ICDH1 R132S están deterioradas para la conversión de isocitrato a α -KG.

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

25

Tabla 1

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

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

35

C. Los mutantes ICDH1 R132H y R132S muestran una inhibición reducida del producto en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -Cetoglutarato (α -KG).

Un mecanismo regulador bien conocido para el control de las enzimas metabólicas es la inhibición por retroalimentación, en donde el producto de la reacción actúa como un regulador negativo para la enzima generadora. Para examinar si los mutantes R132S o R132H mantienen este mecanismo regulador, se determinó la K_i para α -KG en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -cetoglutarato. Los datos se presentan en las FIGs. 13A-13C y se resumen en la Tabla 2. En todos los casos, α -KG actúa como un inhibidor competitivo del sustrato de isocitrato. Sin embargo, R132H y R132S muestran un aumento de 20 veces y 13 veces en la sensibilidad a la inhibición por retroalimentación en comparación con la enzima de tipo silvestre.

45

Tabla 2

Enzima	K_i (μ M)
Peso	612,2
R132H	28,6
R132S	45,3

D. El efecto de $MnCl_2$ en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -Cetoglutarato α -KG.

50

$MnCl_2$ se puede sustituir con $MgCl_2$ para examinar si hay alguna diferencia en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -Cetoglutarato (α -KG).

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

La finalidad de este ejemplo es examinar la susceptibilidad de IDH1R132S e IDH1R132H en la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -Cetoglutarato (α -KG) al conocido inhibidor de IDH1 oxalomalato. Se realizaron experimentos para examinar si las mutaciones R132 evitan la inhibición por oxalomalato.

Concentraciones finales: Tris 7,5 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl₂ 2 mM, Glicerol al 10 %, BSA 0,03 %, NADP 0,5 mM, IDH1 peso 1,5 ug/ml, IDH1R132S 30 ug/ml, IDH1R132H 60 ug/ml, DL-isocitrato (5 - 650 uM). Los resultados se resumen en la FIG. 17 y Tabla 3. La mutación R132S muestra aproximadamente un aumento de dos veces en la susceptibilidad a la inhibición por el oxalomalato, mientras que la mutación R132H no se ve afectada esencialmente. En los tres casos, se observó el mismo modo de inhibición totalmente competitivo con respecto al isocitrato.

Tabla 3

Enzima	Oxalomalato Ki (uM)
peso	955,4
R132S	510
R132H	950,8

F. Las reacciones directas (isocitrato a α -KG) de la enzima mutante no se completan.

Las reacciones directas que contenían ICDH1 R132S o ICDH1 R132H se ensamblaron y el progreso de la reacción se controló mediante un aumento en la DO340 del cofactor NADPH reducido. Se observó (FIG. 23), que estas reacciones avanzan en la dirección directa durante un periodo de tiempo y luego invierten la dirección y oxidan el cofactor reducido en las primeras etapas de la reacción, básicamente a la concentración inicial presente en el inicio del experimento. La adición de más isocitrato reinició la reacción directa durante un periodo de tiempo, pero de nuevo no indujo que la reacción procediera a completarse. Más bien, el sistema volvió a las concentraciones iniciales de NADPH. Este experimento sugirió que las enzimas mutantes estaban realizando una reacción inversa diferente a la conversión de α -KG en isocitrato.

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

A. Métodos

Para determinar la eficacia catalítica de las enzimas en la reducción de α -Cetoglutarato (α -KG), se realizaron reacciones para determinar V_{máx} y K_m para α -KG. En estas reacciones, el sustrato se varió mientras el cofactor se mantuvo constante a 500 uM. Todas las reacciones se realizaron en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,5, glicerol al 10 %, BSA al 0,03 % (p/v), MgCl₂ 5 mM e hidrocarbonato sódico 40 mM. El progreso de la reacción fue seguido por espectroscopía a 340 nM que controlaba el cambio en el estado de oxidación del cofactor. Se añadió suficiente enzima para dar un cambio lineal en la absorbancia durante 10 minutos.

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

Para probar la capacidad de las enzimas mutantes y de tipo silvestre para realizar la reducción de α -KG, se incubaron 40 ug/ml de enzima en las condiciones para la reducción de α -Cetoglutarato (α -KG) como se describe anteriormente. Los resultados se presentan en la FIG. 14. La enzima de tipo silvestre no pudo consumir NADPH, mientras que R132S y R132H redujeron α -KG y consumieron NADPH.

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

Para determinar los parámetros cinéticos de la reducción de α -KG realizada por las enzimas mutantes, se realizó un experimento de titulación de sustratos, como se presenta en las FIGs. 15A-15B. R132H mantuvo la interacción del sustrato de tipo Hill como se ve en la descarboxilación oxidativa del isocitrato, pero mostró una unión cooperativa positiva al sustrato. R132S mostró una conversión a cinética de Michaelis-Menten con la adición de inhibición de sustrato no competitiva, en comparación con la enzima de tipo silvestre en la descarboxilación oxidativa del isocitrato. Los parámetros enzimáticos de la enzima mutante se presentan en la Tabla 4. Dado que la enzima de tipo silvestre no consumió NADPH mensurable en el experimento descrito anteriormente, no se realizó un estudio cinético completo.

Tabla 4

Enzima	V _{máx} (umol/min/mg)	K _m (mM)	Constante de Hill	K _i (mM)	V _{máx} /K _m
R132H	1,3	0,965	1,8		1,35
R132S	2,7	0,181	0,479	24,6	14,92

La eficacia catalítica relativa de la reducción de α -KG es aproximadamente diez veces mayor en el mutante R132S que en el mutante R132H. La consecuencia biológica es que la tasa de flujo metabólico debe ser mayor en las células que expresan R132S en comparación con R132H.

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

Con el fin de evaluar la capacidad de las enzimas mutantes para utilizar NADH en la reducción de alfa-cetoglutarato, se realizó el siguiente experimento. Concentraciones finales: NaHCO₃ 40 mM, MgCl₂ 5 mM, Glicerol al 10 %, K₂HPO₄ 50 mM, BSA 0,03 %, NADH 0,5 mM, IDH1wt 5 ug/ml, R132S 30 ug/ml, R132H 60 ug/ml, alfa-Cetoglutarato 5 mM.

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

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

	R132S		Media	DT
Tasa ($\Delta A/s$)	0,001117	0,001088	0,001103	2.05E-05
Umol/min/mg	0,718328	0,699678	0,709003	0,013187

Resumen

Para entender cómo las mutaciones R132 alteran las propiedades enzimáticas de IDH1, se produjeron proteínas IDH1 mutantes R132H de tipo silvestre y se purificaron a partir de *E. coli*. Cuando se midió la descarboxilación oxidativa dependiente de NADP⁺ del isocitrato usando proteína IDH1 mutante R132H de tipo silvestre o purificada, se confirmó que la mutación R132H altera la capacidad de IDH1 para catalizar esta reacción (Yan, H. *et al.* N Engl J Med 360, 765-73 (2009); Zhao, S. *et al.* Science 324, 261-5 (2009)), como es evidente por la pérdida en la afinidad de unión tanto para isocitrato como para MgCl₂ junto con una disminución de 1000 veces en la rotación catalítica (FIGs. 30A y 30C). Por el contrario, cuando la reducción de α KG dependiente de NADPH se evaluó usando la proteína IDH1 mutante R132H de tipo silvestre o, solo el mutante R132H pudo catalizar esta reacción a una velocidad mensurable (FIGs. 30 y 30C). Parte de esta tasa aumentada de reducción de α KG resulta de un aumento de la afinidad de unión tanto para el cofactor NADPH como para el sustrato α KG en el mutante R132H IDH1 (FIG. 30C). Tomados en conjunto, estos datos demuestran que mientras que la mutación R132H conduce a una pérdida de la función enzimática para la descarboxilación oxidativa del isocitrato, esta mutación también da como resultado una ganancia de la función de la enzima para la reducción de α KG dependiente de NADPH.

2: Análisis de IDH1 mutante

El mutante R132H no da como resultado la conversión de α -KG en isocitrato.

Usando métodos experimentales convencionales, se configuró un espectrómetro de masas API2000 para la detección óptima de α -KG e isocitrato (Tabla 6). Las transiciones de MRM se seleccionaron y ajustaron de manera que cada analito se monitorizara mediante una transición única. Después, una reacción enzimática que contiene α -KG 1 mM, NADPH 1 mM, e IDH1 R132H se montaron y se ejecutaron hasta su finalización según se juzgó por la disminución a la línea de base de la absorbancia óptica a 340 nM. Se realizó una reacción de control en paralelo a partir de la cual se omitió la enzima. Las reacciones se interrumpieron a 1:1 con metanol, se extrajeron, y se sometieron a análisis por LC-MS/MS.

FIG. 18A presenta la reacción de control que indica que no se consumió α KG en ausencia de enzima, y que no estaba presente isocitrato detectable. FIG. 18B presenta la reacción que contiene la enzima R132H, en donde se ha consumido el α -KG, pero no se detectó isocitrato. FIG. 18C presenta un segundo análisis de la reacción que contiene la enzima en donde el isocitrato se ha añadido a una concentración final de 1 mM, demostrando que α -KG se ha convertido en isocitrato en cualquier concentración apreciable mayor que 0,01 %, el sistema analítico configurado habría sido capaz de detectar su presencia en la reacción que contiene la enzima. La conclusión de este experimento es que mientras que el R132H consumía α -KG, no se producía isocitrato. Este experimento indica que

una neoactividad del mutante R132H es la reducción de α -KG a un compuesto distinto del isocitrato.

Tabla 6. Ajustes del instrumento para la detección MRM de compuestos								
Compuesto	Q1	Q3	DP	FP	EP	CEP	CE	CXP
α -KG	144,975	100,6	-6	-220	-10	-16	-10	-22
isocitrato	191,235	110,9	-11	-230	-4,5	-14	-16	-24
a-hidroxiglutarato	147,085	128,7	-11	-280	-10	-22	-12	-24

El mutante R132H reduce α -KG a ácido 2-hidroxiglutarico.

Usando métodos experimentales convencionales, se configuró un espectrómetro de masas API2000 para la detección óptima de 2-hidroxiglutarato (Tabla 6 y FIG. 19). Los productos de reacción del control y las reacciones que contienen enzimas de arriba se investigaron por la presencia de ácido 2-hidroxiglutarico, FIG. 20. En la reacción de control, no se detectó ácido 2-hidroxiglutarico, mientras que en la reacción contiene R132H, se detectó ácido 2-hidroxiglutarico. Estos datos confirman que una neoactividad del mutante R132H es la reducción de α -KG a ácido 2-hidroxiglutarico.

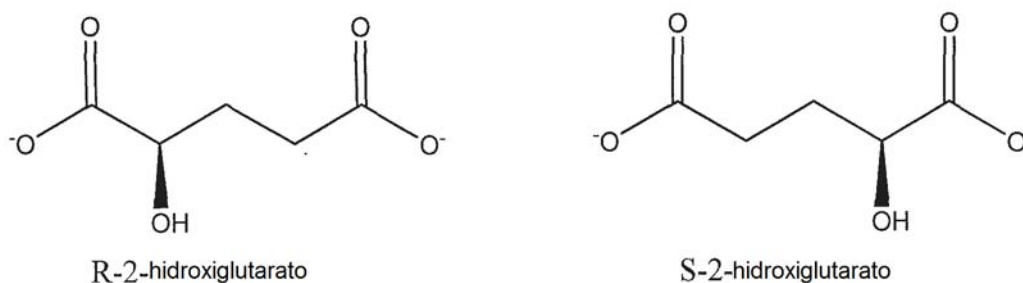
Para determinar si la proteína mutante R132H produjo directamente 2HG a partir de α KG, el producto de la reacción de IDH1 mutante se examinó usando el modo de ion negativo de triple cuadrupolo electrospray LC-MS. Estos experimentos confirmaron que 2HG era el producto directo de la reducción de α KG dependiente de NADPH por la proteína mutante R132H purificada a través de la comparación con estándares de metabolitos conocidos (FIG. 31A). No se observó conversión de α KG a isocitrato.

Se puede determinar la especificidad enantiomérica del producto de reacción a través de la derivación con DATAN (ácido diacetil-L-tartárico) y comparar el tiempo de retención con el de los patrones R y S conocidos. Este método se describe en Struys *et al.* Clin Chem 50:1391-1395 (2004). La producción estereoespecífica del enantiómero R o S del ácido alfa-hidroxiglutarico por ICDH1 R132H puede modificar la actividad biológica de otras enzimas presentes en la célula. La producción racémica también se puede producir.

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

ICDH R132H reduce α KG al enantiómero R de 2-hidroxiglutarato.

Hay dos posibles enantiómeros del producto de reacción reductora ICDHR132H, que convierten alfa-cetoglutarato en 2-hidroxiglutarato, con el centro quiral ubicado en la posición del carbono alfa. Los productos ejemplares se muestran a continuación.

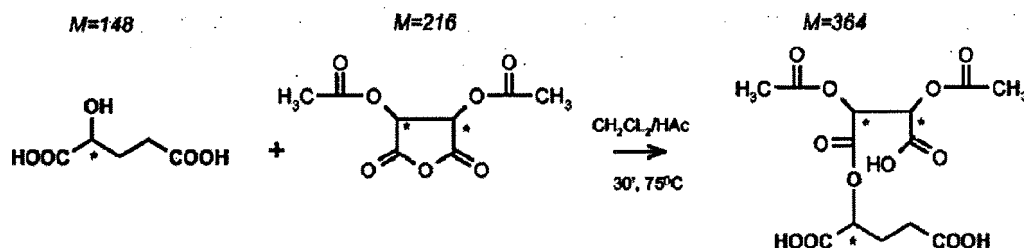


Los expertos en la materia los denominan enantiómeros R (o pro-R) y S (o pro-S), respectivamente. Para determinar qué forma o ambas se producen como resultado de la neoactividad ICDH1 descrita anteriormente, la cantidad relativa de cada forma quiral en el producto de reacción se determinó en el procedimiento que se describe a continuación.

La reducción de α -KG a 2-HG se realizó mediante ICDHR132H en presencia de NADPH como se describió anteriormente, y el progreso de la reacción se controló mediante un cambio en el coeficiente de extinción del cofactor de nucleótidos a 340 nM; una vez que se consideró que la reacción era completa, la reacción se extrajo con metanol y se secó completamente en una corriente de gas nitrógeno. En paralelo, las muestras de R-2-HG

quiralmente puro y una mezcla racémica de R- y S-2-HG (producida por una reducción puramente química de α -KG a 2-HG) se resuspendieron en ddH₂O, se extrajeron de forma similar con metanol, y se secaron.

Los productos de reacción o patrones quirales se resuspendieron luego en una solución de diclorometano:ácido acético (4:1) que contenía 50 g/l de DATAN y se calentaron a 75 °C durante 30 minutos para estimular la derivatización de 2-HG en el esquema que se describe a continuación:



Después de enfriar a temperatura ambiente, Las reacciones de derivatización se secaron completamente y se resuspendieron en ddH₂O para análisis en un sistema LC-MS/MS. El análisis de los productos de reacción y los patrones quirales se realizó en un sistema API2000 LC-MS/MS usando una columna C18 2 x 150 mM con un flujo isocrático de 200 μ l/min de 90:10 (formiato de amonio, pH 3,6: metanol) y se monitorizaron los tiempos de retención del complejo 2-HG-DATAN usando XIC y la transición de MRM de diagnóstico de 363/147 en el modo de ion negativo.

Cabe señalar que los tiempos de retención en los experimentos descritos a continuación son aproximados y precisos en +/- 1 minuto; el pico altamente reproducible visto a los 4 minutos es un artefacto de una válvula de conmutación de columna cuya presencia no tiene ningún resultado en las conclusiones extraídas del experimento.

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

La inyección del producto de reacción enzimática de neoactividad derivatizado solo produce un pico único a los 10 minutos, sugiriendo que el producto de reacción neoactiva es R-2-HG quiralmente puro (FIG. 24D). La coinyección del producto de reacción neoactiva con el patrón R-2-HG da como resultado un pico mayor de > 95 % del área a los 10 minutos (FIG. 24E) y un solo pico menor de < 5 % del área de 8 minutos (observado previamente en la inyección del patrón R-2-HG solo) confirmando la quiralidad del producto de neoactividad como R. La coinyección de una mezcla racémica y el producto de reacción de neoactividad (FIG. 24F) da como resultado un pico del área del 60 % a los 10 minutos y un pico del área del 40 % a los 8 minutos; esta desviación de las áreas de picos previamente simétricas observadas en la muestra de racemato se debe a la presencia excesiva de la forma R-2-HG contribuida por la adición del producto de reacción de neoactividad.

Estos experimentos nos permiten concluir que la neoactividad de ICDH1 es una reducción quiral altamente específica de α -KG a R-2-HG. Propiedades enzimáticas de otras mutaciones IDH1.

Para determinar si las propiedades enzimáticas alteradas resultantes de la mutación R132H eran compartidas por otras mutaciones R132 encontradas en gliomas humanos, R132C recombinante, se generaron proteínas IDH1 mutantes R132L y R132S y se evaluaron las propiedades enzimáticas. Similar a la proteína mutante R132H, las mutaciones R132C, R132L, y R132S dan como resultado una ganancia de función para la reducción de α KG dependiente de NADPH (datos no mostrados). Así, además de la descarboxilación oxidativa alterada del isocitrato, una característica común compartida entre las mutaciones IDH1 que se encuentran en los gliomas humanos es la capacidad de catalizar la reducción directa de α KG dependiente de NADPH.

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

Generación de líneas celulares de glioblastoma de ingeniería genética que expresan proteína IDH-1 de tipo silvestre o mutante. Un clon con marco de lectura abierto (ORF) etiquetado con Myc-DDK de la isocitrato deshidrogenasa humana 1 (IDH1; Ref. ID: NM_005896) clonado en el vector pCMV6 se obtuvo del vendedor comercial Origen Inc. El vector pCMV6 contiene casetes de resistencia a kanamicina y neomicina para la selección en sistemas de células

bacterianas y de mamíferos. Se utilizaron técnicas convencionales de mutagénesis de biología molecular para alterar la secuencia de ADN en el par de bases 364 del ORF para introducir el cambio de pares de bases de guanina a adenina dando como resultado un cambio en el código de aminoácidos en la posición 132 de argenina (wt) a histidina (mutante; o R132H). La alteración específica de la secuencia de ADN se confirmó mediante métodos convencionales para análisis de la secuencia de ADN. El vector parental pCMV6 (sin inserción), pCMV6-wt IDH1 o pCMV6-R132H se transfectaron en líneas celulares de glioblastoma humano inmortalizado ATCC® CRL-2610 (LN-18) o HTB-14 (U-87) en medio de crecimiento convencional (DMEM); Medio de Eagle modificado con Dulbecco que contiene 10 % de suero bovino fetal). Aproximadamente 24 horas después de la transfección, los cultivos celulares se transformaron en DMEM que contenía sal sódica G418 a concentraciones de 750 ug/ml (CRL-2610) o 500 ug/ml (HTB-14) para seleccionar las células en cultivo que expresaban el casete de ADN integrado que expresaba el marcador seleccionable de neomicina y el ORF para de tipo silvestre o R132H humanos. Se generaron poblaciones agrupadas de células resistentes a G418 y se confirmó la expresión de IDH1 de tipo silvestre o R132 IDH1 mediante análisis de transferencia Western convencional de lisados celulares usando anticuerpos comerciales que reconocen el antígeno IDH1 humano o la etiqueta de expresión MYC-DDK carboxiterminal diseñada. Estos grupos clonales estables se utilizaron luego para la preparación y análisis de metabolitos.

Procedimiento de preparación y análisis de metabolitos. Las líneas celulares de glioblastoma (CRL-2610 y HTB-14) que expresan la proteína IDH-1 de tipo silvestre o mutante se cultivaron usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos de mamíferos en medios DMEM que contienen FCS al 10 %, glucosa 25 mM, glutamina 4 mM, y antibiótico G418 (CRL-2610 a 750 ug/ml; HTB-14 a 500 ug/ml) para asegurar la selección en curso para preservar las secuencias de expresión mutantes transfectadas. Para preparar experimentos de extracción de metabolitos, las células se pasaron a placas de cultivo redondas de 10 cm a una densidad de 1×10^6 células. Aproximadamente 12 horas antes de la extracción del metabolito, los medios de cultivo se cambiaron (8 ml por placa) a FCS dializado al 10 % que contenía DMEM (10.000 mwco), glucosa 5 mM, glutamina 4 mM, y antibiótico G-418 como anteriormente; el FCS dializado elimina múltiples moléculas pequeñas del medio de cultivo y permite la evaluación específica de los niveles de metabolitos en cultivos celulares. El medio se cambió de nuevo 2 veces antes de la extracción del metabolito. La extracción de metabolitos se realizó aspirando rápidamente los medios de las placas de cultivo en una campana estéril, colocando inmediatamente las placas en una bandeja que contenía hielo seco para enfriarlos a -80 °C, y tan rápido como sea posible, añadiendo 2,6 ml de MeOH al 80 %/agua al 20 %, pre-enfriado a -80 °C en un baño de hielo seco/acetona. Estas células extraídas con metanol, enfriadas se separaron físicamente de la placa de cultivo raspando con un levantador de células de polietileno estéril (Corning N.º 3008), se pusieron en suspensión y se transfirieron a un vial cónico de 15 ml, luego se enfrió a -20 °C. Se aplicaron 1,0 ml adicionales de MeOH al 80 %/agua al 20 % a la placa de cultivo enfriada y se repitió el procedimiento de levantamiento de células, para dar un volumen de extracción final de 3,6 ml. Los extractos se centrifugaron a 20.000 xg durante 30 minutos para sedimentar los restos celulares, y se transfirieron 3,0 ml de los sobrenadantes a un vial congelador con tapa de rosca y se almacenaron a -80 °C hasta que estuvieron listos para el análisis.

Para preparar el análisis, los extractos se retiraron del congelador y se secaron en un soplador de nitrógeno para eliminar el metanol. Las muestras acuosas al 100 % se analizaron por LCMS como sigue. El extracto (10 µl) se inyectó en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyó usando un gradiente lineal de metanol de grado LCMS (Tampón B) en una solución acuosa. tributilamina 10 mM, Ácido acético 15 mM (tampón A), que va del 3 % de tampón B al 95 % de tampón B durante 45 minutos a 200 µl/min. Los iones del metabolito eluido se detectaron usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición de modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación de 38 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxiglutarato (los parámetros MRM fueron optimizados por infusión previa de patrones de compuestos conocidos). Los datos se procesaron usando Analyst Software (Applied Biosystems, Inc.) y las intensidades de señal del metabolito se convirtieron en concentraciones absolutas usando curvas de acumulación de señal de mezclas inyectadas de patrones de metabolitos en concentraciones conocidas. Las concentraciones finales de metabolitos se informaron como media de al menos tres replicados, +/-desviación estándar.

Resultados. Los análisis revelan niveles significativamente más altos de 2-HG en las células que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H. Como se muestra en la FIG. 26A, los niveles de 2-HG en las líneas celulares CRL-2610 que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H son aproximadamente 28 veces más altos que las líneas idénticas que expresan la proteína de tipo silvestre. De forma similar, los niveles de 2-HG en las líneas celulares HTB-14 que expresan la proteína mutante IDH-1 R132H son aproximadamente 38 veces más altos que las líneas idénticas que expresan la proteína de tipo silvestre, como se muestra en la FIG. 26B.

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

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

Fuente de tejido: Se obtuvieron tumores cerebrales humanos durante la resección quirúrgica, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La clasificación clínica del tejido como gliomas se

realizó mediante clasificación y calificación de patología clínica estándar.

Análisis de secuencia genómica para identificar muestras de tumores cerebrales que contienen isocitrato deshidrogenasa (IDH1) de tipo silvestre o mutaciones que alteran el aminoácido 132. El ADN genómico se aisló a partir de 50-100 mg de tejido de tumor cerebral usando métodos estándar. Luego se realizó un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN genómico aislado para amplificar un fragmento de 295 pares de bases del ADN genómico que contiene secuencias tanto de intrón como 2º exón de IDH1 humana (FIG. 27). En la FIG. 27, la secuencia del intrón se muestra en letra minúscula; la secuencia de ADN de IDH1 del 2º exón se muestra en letra mayúscula; las secuencias del cebador directo (5') e inverso (3') se muestran en fuente subrayada; el nucleótido de guanina mutado en un subconjunto de tumores de glioma humano se muestra en negrita subrayado.

El fragmento de ADN amplificado se secuenció luego usando protocolos estándar y se realizaron alineamientos de secuencia para clasificar las secuencias como de tipo silvestre o mutante en el nucleótido de guanina en el par de bases 170 del fragmento de PCR amplificado. Se identificaron tumores que contenían ADN genómico que tenía dos copias de guanina (tipo silvestre) o una combinación mixta o monoalélica de un alelo IDH1 que contenía guanina y la otra una secuencia de adenina (mutante) en el par de bases 170 del producto amplificado (Tabla 15). El cambio de nucleótido da como resultado un cambio en la posición de aminoácido 132 de la proteína IDH1 humana de arginina (tipo silvestre) a histidina (mutante) como se informó anteriormente.

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

ID Muestra	Base 170	Aminoácido 132 de IDH1	Genotipo
1102	G	arginina	tipo silvestre
1822	A	histidina	mutante
496	G	arginina	tipo silvestre
1874	A	histidina	mutante
816	A	histidina	mutante
534	G	arginina	tipo silvestre
AP-1	A	histidina	mutante
AP-2	A	histidina	mutante

Procedimiento de preparación y análisis de metabolitos. La extracción de metabolitos se realizó mediante la adición de un volumen 10 X (relación m/v) de mezcla de metanol y agua a -80 °C (80 %: 20 %) al tejido cerebral (aproximadamente 100 mg) seguido de homogeneización de 30 s a 4 °C. Estos tejidos homogeneizados extraídos con metanol, enfriados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos para sedimentar los restos celulares y tisulares, y los sobrenadantes de tejidos eliminados se transfirieron a un vial congelador con tapa de rosca y se almacenaron a -80 °C. Para análisis, se añadió un volumen 2X de tributilamina (10 mM) ácido acético (10 mM) pH 5,5 a las muestras y se analizó mediante LCMS como sigue. Los extractos de la muestra se filtraron usando un disco Millex-FG de 0,20 micrómetros y se inyectaron 10 µl en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyeron usando un gradiente lineal de metanol de calidad LCMS (50 %) con 10 mM de tributilamina y 10 mM de ácido acético) hasta el 80 % de metanol: tributilamina 10 mM: ácido acético 10 mM durante 6 minutos a 200 µl/min. Los iones del metabolito eluido se detectaron usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición de modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación para 8 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxiglutarato (los parámetros MRM fueron optimizados por infusión previa de patrones de compuestos conocidos). Los datos se procesaron usando el Software Analyst (Applied Biosystems, Inc.) y las intensidades de señal del metabolito se obtuvieron mediante métodos estándar de integración de picos.

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

Tabla 16

ID Muestra	Diagnóstico de la muestra primaria	Grado	Células tumorales en los focos tumorales (%)	Genotipo	Cambio de nucleótido	Codón	2HG (□ mol/g)	□ KG (□ mol/g)	Malato (□ mol/g)	Fumarato (□ mol/g)	Succinato (□ mol/g)	Isocitrato (□ mol/g)
1	Glioblastoma, residual/recurrente	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,18	0,161	1,182	0,923	1,075	0,041
2	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,16	0,079	1,708	1,186	3,156	0,100
3	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,13	0,028	0,140	0,170	0,891	0,017
4	Oligoastrocitoma	Grado II de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,21	0,016	0,553	1,061	1,731	0,089
5	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	16,97	0,085	1,091	0,807	1,357	0,058
6	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	19,42	0,023	0,462	0,590	1,966	0,073
7	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	31,56	0,068	0,758	0,503	2,019	0,093
8	Oligodendroglioma, anaplásico	Grado III de la OMS	75	mutante	G364A	R132H	12,49	0,033	0,556	0,439	0,507	0,091
9	Oligodendroglioma, anaplásico	Grado III de la OMS	90	mutante	G364A	R132H	4,59	0,029	1,377	1,060	1,077	0,574
10	Oligoastrocitoma	Grado II de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	6,80	0,038	0,403	0,503	1,561	0,065
11	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,686	0,686	0,686	0,686	0,686	0,007
12	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	18,791	18,791	18,791	18,791	18,791	0,031
13	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	4,59	0,029	1,377	1,060	1,077	0,043
14	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,199	0,046	0,180	0,170	0,221	0,014
15	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	C363G	R132G	13,827	0,030	0,905	0,599	1,335	0,046
16	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	G364A	R132H	28,364	0,068	0,535	0,488	2,105	0,054
17	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	mutante	C363A	R132S	9,364	0,029	1,038	0,693	2,151	0,121
18	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	n/a	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,540	0,031	0,468	0,608	1,490	0,102
19	Glioma, maligno, astrocitoma	Grado IV de la OMS	80	mutante	G364A	R132H	19,000	0,050	0,654	0,391	2,197	0,171
20	Oligodendroglioma	Grado III de la OMS	80	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,045	0,037	1,576	0,998	1,420	0,018
21	Glioma, maligno, astrocitoma	Grado de la OMS	95	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,064	0,034	0,711	0,710	2,105	0,165

(continuación)

ID Muestra	Diagnóstico de la muestra primaria	Grado	Células tumorales en los focos tumorales (%)	Genotipo	Cambio de nucleótido	Codón	2HG (□ mol/g)	□ KG (□ mol/g)	Malato (□ mol/g)	Fumarato (□ mol/g)	Succinato (□ mol/g)	Isocitrato (□ mol/g)
		IV										
22	Glioblastoma	Grado IV de la OMS	70	tipo silvestre	tipo silvestre	R132	0,171	0,041	2,066	1,323	0,027	0,072

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

Se sabe que 2HG se acumula en el trastorno metabólico hereditario acididuria 2-hidroxiglutarica. Esta enfermedad es causada por deficiencia en la enzima 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa, que convierte 2HG en α KG (Struys, E. A. *et al.* Am J Hum Genet 76, 358-60 (2005)). Los pacientes con deficiencias de 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa acumulan 2HG en el cerebro según lo evaluado por MRI y análisis de LCR, desarrollan leucoencefalopatía y tienen un mayor riesgo de desarrollar tumores cerebrales (Aghili, M., Zahedi, F. y Rafiee, J Neurooncol 91, 233-6 (2009); Kolker, S., Mayatepek, E. y Hoffmann, G. F. Neuropediatrics 33, 225-31 (2002); Wajner, M., Latini, A., Wyse, A. T. y Dutra-Filho, C. S. J Inherit Metab Dis 27, 427-48 (2004)). Además, los niveles cerebrales elevados de 2HG dan como resultado un aumento de los niveles de ROS (Kolker, S. *et al.* Eur J Neurosci 16, 21-8 (2002); Latini, A. *et al.* Eur J Neurosci 17, 2017-22 (2003)), contribuyendo potencialmente a un mayor riesgo de cáncer. La capacidad de 2HG para actuar como un agonista del receptor de NMDA puede contribuir a este efecto (Kolker, S. *et al.* Eur J Neurosci 16, 21-8 (2002)). 2HG también puede ser tóxico para las células mediante la inhibición competitiva de glutamato y/o α KG usando enzimas. Estas incluyen transaminasas que permiten la utilización de nitrógeno de glutamato para la biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, y prolil hidroxilasas dependientes de α KG como las que regulan los niveles de Hif1 α . Se ha informado que las alteraciones en Hif1 α resultan de la expresión de la proteína IDH1 mutante (Zhao, S. *et al.* Science 324, 261-5 (2009)). Independientemente del mecanismo, parece probable que la capacidad de ganancia de función de las células para producir 2HG como resultado de las mutaciones de R132 en IDH1 contribuye a la tumorigénesis. Los pacientes con deficiencia de 2-hidroxiglutarato deshidrogenasa tienen un alto riesgo de malignidad del SNC (Aghili, M., Zahedi, F. y Rafiee, E. J Neurooncol 91, 233-6 (2009)). La capacidad de IDH1 mutante para actuar directamente sobre α KG puede explicar la prevalencia de mutaciones IDH1 en tumores de tejido del SNC, que son únicos en su alto nivel de captación de glutamato y su conversión a α KG en el citosol (Tsacopoulos, M. J Physiol Paris 96, 283-8 (2002)), proporcionando así altos niveles de sustrato para la producción de 2HG. La aparente co-dominancia de la actividad de IDH1 mutante con la de la enzima de tipo silvestre es consistente con la genética de la enfermedad, en donde solo una copia del gen está mutada. Como se discutió anteriormente, el IDH1 de tipo silvestre podría proporcionar directamente NADPH y α KG a la enzima mutante. Estos datos también demuestran que la mutación de R132 a histidina, serina, cisteína, glicina o leucina comparten una capacidad común para catalizar la conversión dependiente de NADPH de α KG a 2HG. Estos hallazgos ayudan a aclarar por qué las mutaciones en otros restos de aminoácidos de IDH1, incluyendo otros restos esenciales para la actividad catalítica, no se encuentran. Finalmente, estos hallazgos tienen implicaciones clínicas ya que sugieren que la producción de 2HG identificará a los pacientes con tumores cerebrales mutantes IDH1. Esto será importante para el pronóstico ya que los pacientes con mutaciones IDH1 viven más tiempo que los pacientes con gliomas caracterizados por otras mutaciones (Parsons, D. W. *et al.* Science 321, 1807-12 (2008)). Además, los pacientes con gliomas de grado inferior pueden beneficiarse de la inhibición terapéutica de la producción de 2HG. La inhibición de la producción de 2HG por el mutante IDH1 podría ralentizar o detener la conversión del glioma de grado inferior en glioblastoma secundario letal, cambiando el curso de la enfermedad.

El producto de reacción de reducción de ICDH1 R132H de α -KG inhibe la descarboxilación oxidativa de isocitrato por ICDH1 de tipo silvestre.

Una reacción que contiene el ICDH1 de tipo silvestre, NADP y α -KG se ensambló (en las condiciones descritas anteriormente) a las que se agregó en una serie de titulación (R) -2-hidroxiglutarato o el producto de reacción del

mutante ICDH1 R1321H de α -KG a 2-hidroxiglutarato. Se demostró que el producto de reacción 2-HG inhibe la descarboxilación oxidativa del isocitrato por el ICDH1 de tipo silvestre, mientras que el (R)-2-hidroxiglutarato no mostró ningún efecto sobre la velocidad de la reacción. Dado que solo hay dos productos quirales posibles de la reducción mutante de ICDH1 R132H de α -KG a 2-HG, y la (R)-2-HG no mostró inhibición en este ensayo, se deduce que el producto de la reacción mutante es la forma (S)-2-HG. Este experimento se presenta en la FIG. 25.

Para determinar la quiralidad del 2HG producido, los productos de la reacción R132H se derivatizaron con anhídrido diacetil-L-tartárico, que permitió separar los enantiómeros (S) y (R) de 2HG mediante LC de fase inversa simple y detectar los productos mediante espectrometría de masas en tándem (Struys, E. A., Jansen, E. E., Verhoeven, N. M. y Jakobs, C. Clin Chem 50, 1391-5 (2004)) (FIG. 31B). Los picos correspondientes a los isómeros (S) y (R) de 2HG se confirmaron usando patrones racémicos y R(-)- 2HG. El producto de reacción de R132H coeluyó con el pico R(-)-2HG, demostrando que el estereoisómero R(-) es el producto producido a partir de α KG por R132H mutante IDH1.

La observación de que el producto de reacción de la enzima mutante es capaz de inhibir una reacción metabólica que se sabe ocurre en las células sugiere que este producto de reacción también podría inhibir otras reacciones que utilizan α -KG, isocitrato o citrato como sustratos o producirlos como productos *in vivo* o *in vitro*.

Ejemplo 3 análisis metabólico de IDH1 de tipo silvestre y mutantes

La investigación metabólica puede proporcionar una base mecánica para el motivo por el cual las mutaciones R132 confieren una ventaja de supervivencia para los pacientes con GBM que portan tales mutaciones.

1. Metabólica de líneas celulares tumorales GBM: mutantes de tipo silvestre frente a R132

Las líneas celulares con mutaciones R132 se pueden identificar y perfilar. Los experimentos se pueden realizar en un grupo de metabolitos proximales con una amplia gama de metabolitos.

2. Tratamiento con oxalomalato de líneas celulares GBM

El oxalomalato es un inhibidor competitivo de IDH1. Se puede examinar el cambio de NADPH (metabólica) cuando IDH1 es inhibida por una molécula pequeña.

3. Metabólica de tumores primarios de GBM: mutaciones de tipo silvestre frente a R132

Se pueden identificar tumores primarios con mutaciones R132. Los experimentos se pueden realizar en un grupo de metabolitos proximales con una amplia gama de metabolitos.

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

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

Ejemplo 4 evaluación de IDH1 como diana de cáncer

La reducción inducible de shARNmir se puede realizar para examinar el fenotipo celular y los perfiles metabólicos. Las enzimas IDH1 de calidad HTS están disponibles. Las mutaciones IDH descritas en el presente documento pueden usarse para la selección de pacientes.

Ejemplo 5 ARNsi

IDH1

En las siguientes tablas se presentan ejemplos de ARNsi. Se pueden usar métodos conocidos en la técnica para seleccionar otros ARNsi. Los ARNsi pueden ser evaluados, *por ejemplo*, determinando la capacidad de un ARNsi 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 se pueden usar ARNsi 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.

Los ARNsi en la Tabla 7 (con la excepción de la entrada 1356) se generaron usando la herramienta de selección ARNsi disponible en la web mundial en jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/. (Yuan *et al.* Nucl. Acids. Res. 2004 32:W130-W134.) También se pueden usar otras herramientas de selección. La entrada 1356 se adaptó de 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.

Los ARNsi en las Tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 representan candidatos que abarcan el ARNm de IDH1 en las posiciones de nucleótidos 628 y 629 de acuerdo con la secuencia en el N.º de Acceso GenBank NM_005896.2 (SEQ ID NO: 9, FIG. 22).

- 5 Los ARN en las tablas pueden ser modificados, *por ejemplo*, como se describe en el presente documento. Las modificaciones incluyen modificaciones químicas para mejorar las propiedades, *por ejemplo*, resistencia a la degradación, o el uso de salientes. Por ejemplo, una o ambas de las cadenas sentido y antisentido en las tablas pueden incluir un dinucleótido adicional en el extremo 3', *por ejemplo*, TT, UU, dTdT.

10

Tabla 7. ARNsi dirigidos a IDH1 de tipo silvestre

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
13	GGUUUCUGCAGAGUCUAC U	14	AGUAGACUCUGCAGAAAC C	15
118	CUCUUCGCCAGCAUAUCA U	16	AUGAUAUGCUGGCGAAGA G	17
140	GGCAGGCGAUAACUACA U	18	AUGUAGUUUAUCGCCUGC C	19
145	GCGAUAACUACAUUCAG U	20	ACUGAAUGUAGUUUAUCG C	21
199	GAAAUCUAUUCACUGUCA A	22	UUGACAGUGAAUAGAUUU C	23
257	GUUCUGUGGUAGAGAUGC A	24	UGCAUCUCUACCACAGAA C	25
272	GCAAGGAGAUGAAAUGAC A	26	UGUCAUUUCAUCUCCUUG C	27
277	GGAGAUGAAAUGACACGA A	28	UUCGUGUCAUUUCAUCUC C	29
278	GAGAUGAAAUGACACGAA U	30	AUUCGUGUCAUUUCAUCU C	31
280	GAUGAAAUGACACGAAUC A	32	UGAUUCGUGUCAUUUCAU C	33
292	CGAAUCAUUUGGGAUUG A	34	UCAAUUCCCAAUGAUUC G	35
302	GGGAAUUGAUUAAAGAGA A	36	UUCUCUUUAAUCAAUCC C	37
332	CCUACGUGGAAUUGGAUC U	38	AGAUCCAAUCCACGUAG G	39
333	CUACGUGGAAUUGGAUCU A	40	UAGAUCCAAUCCACGUA G	41
345	GGAUCUACAUAGCUAUGA U	42	AUCAUAGCUAUGUAGAUC C	43
356	GCUAUGAUUUAGGCAUAG A	44	UCUAUGCCUAAUUAUAG C	45
408	GGAUGCUGCAGAAGCUAU A	46	UAUAGCUUCUGCAGCAUC C	47

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
416	CAGAAGCUAUAAGAAGC A	48	UGCUCUUUAUAGCUUCU G	49
418	GAAGCUAUAAGAAGCAU A	50	UAUGCUCUUUAUAGCUU C	51
432	GCAUAAUGUUGGCGUCAA A	52	UUUGACGCCAACAUUAUG C	53
467	CUGAUGAGAAGAGGGUUG A	54	UCAACCCUCUUCUCAUCA G	55
481	GUUGAGGAGUUCAAGUUG A	56	UCAACUUGAACUCCUCAA C	57
487	GAGUUCAAGUUGAAACAA A	58	UUUGUUCAACUUGAACU C	59
495	GUUGAAACAAAUGUGGAA A	60	UUUCCACAUUUGUUUCAA C	61
502	CAAAUGUGGAAAUACCA A	62	UUGGUGAUUCCACAUUU G	63
517	CCAAAUGGCACCAUACGA A	64	UUCGU AUGGUGCCAUUUG G	65
528	CAUACGAAAUUUCUGGG U	66	ACCCAGAAUUAUUCGU AU G	67
560	GAGAAGCCAUUAUCUGCA A	68	UUGCAGAUAAUGGCUUCU C	69
614	CUAUCAUCAUAGGUCGUC A	70	UGACGACCUAUGAUGAUA G	71
618	CAUCAUAGGUCGUCAUGC U	72	AGCAUGACGACCUAUGAU G	73
621	CAUAGGUCGUCAUGC UUA U	74	AUAAGCAUGACGACCUAU G	75
691	GAGAUAAACCUACACACCA A	76	UUGGUGUGUAGGUUAUCU C	77
735	CCUGGUACAUAACUUUGA A	78	UUCAAAGUUAUGUACCAG G	79
747	CUUUGAAGAAGGUGGUGG U	80	ACCACCACCUUCUUCAAA G	81
775	GGGAUGUAUAUCAAGAU A	82	UAUCUUGAUUAUACAUC C C	83
811	GCACACAGUCCUUCCAA A	84	UUUGGAAGGAACUGUGUG C	85
818	GUUCCUUCCAA AUGGCUC U	86	AGAGCCAUUUGGAAGGAA C	87

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
844	GGUUGGCCUUUGUAUCUG A	88	UCAGAUACAAAGGCCAAC C	89
851	CUUUGUAUCUGAGCACCA A	90	UUGGUGCUCAGAUACAAA G	91
882	GAAGAAUAUGAUGGGCG U	92	ACGCCCAUCAUAAUUCUU C	93
942	GUCCCAGUUUGAAGCUCA A	94	UUGAGCUUCAAACUGGGA C	95
968	GGUAUGAGCAUAGGCUCA U	96	AUGAGCCUAUGCUCAUAC C	97
998	GGCCCAAGCUAUGAAAUC A	98	UGAUUUCAUAGCUUGGGC C	99
1001	CCCAAGCUAUGAAAUCAG A	100	UCUGAUUUCAUAGCUUGG G	101
1127	CAGAUGGCAAGACAGUAG A	102	UCUACUGUCUUGCCAUCU G	103
1133	GCAAGACAGUAGAAGCAG A	104	UCUGCUUCUACUGUCUUG C	105
1184	GCAUGUACCAGAAAGGAC A	106	UGUCCUUUCUGGUACAUG C	107
1214	CCAAUCCCAUUGCUUCCA U	108	AUGGAAGCAAUGGGAUUG G	109
1257	CCACAGAGCAAAGCUUGA U	110	AUCAAGCUUUGCUCUGUG G	111
1258	CACAGAGCAAAGCUUGAU A	112	UAUCAAGCUUUGCUCUGU G	113
1262	GAGCAAAGCUUGAUACA A	114	UUGUUAUCAAGCUUUGCU C	115
1285	GAGCUUGCCUUCUUUGCA A	116	UUGCAAAGAAGGCAAGCU C	117
1296	CUUUGCAAUUGCUUUGGA A	118	UUCCAAAGCAUUGCAAA G	119
1301	CAAAUGCUUUGGAAGAAG U	120	ACUUCUCCAAAGCAUUU G	121
1307	CUUUGGAAGAAGUCUCUA U	122	AUAGAGACUUCUCCAAA G	123
1312	GAAGAAGUCUCUAUUGAG A	124	UCUCAUAGAGACUUCUU C	125
1315	GAAGUCUCUAUUGAGACA A	126	UUGUCUCAAUAGAGACUU C	127

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
1356	GGACUUGGCUGCUUGCAU U	128	AAUGCAGCAGCCAAGUC C	129
1359	CUUGGCUGCUUGCAUUA A	130	UUUAAUGCAAGCAGCCAA G	131
1371	CAUUAAGGUUUACCCAA U	132	AUUGGGUAAACCUUUAU G	133
1385	CCAAUGUGCAACGUUCUG A	134	UCAGAACGUUGCACAUUG G	135
1390	GUGCAACGUUCUGACUAC U	136	AGUAGUCAGAACGUUGCA C	137
1396	CGUUCUGACUACUUGAAU A	138	UAUUCAAGUAGUCAGAAC G	139
1415	CAUUUGAGUUCAUUGGAUA A	140	UUAUCCAUGAACUCAAA G	141
1422	GUUCAUGGAUAAACUUGG A	142	UCCAAGUUUAUCCAUGAA C	143
1425	CAUGGAUAAACUUGGAGA A	144	UUCUCCAAGUUUAUCCA G	145
1455	CAAACUAGCUCAGGCCAA A	146	UUUGGCCUGAGCUAGUUU G	147
1487	CCUGAGCUAAGAAGGAUA A	148	UUAUCCUUCUAGCUCAG G	149
1493	CUAAGAAGGAUAAUUGUC U	150	AGACAAUUAUCCUUCUUA G	151
1544	CUGUGUUACACUCAAGGA U	152	AUCCUUGAGUGUAACACA G	153
1546	GUGUUACACUCAAGGAUA A	154	UUAUCCUUGAGUGUAACA C	155
1552	CACUCAAGGAUAAAGGCA A	156	UUGCCUUUAUCCUUGAGU G	157
1581	GUAAUUUGUUUAGAAGCC A	158	UGGCUUCUAAACAAAUUA C	159
1646	GUUAUUGCCACCUUUGUG A	160	UCACAAAGGUGGCAAUA C	161
1711	CAGCCUAGGAAUUCGGUU A	162	UAACCGAAUCCUAGGCU G	163
1713	GCCUAGGAAUUCGGUUAG U	164	ACUAACCGAAUCCUAGG C	165
1714	CCUAGGAAUUCGGUUAGU A	166	UACUAACCGAAUCCUAG G	167

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
1718	GGAAUUCGGUUAGUACUC A	168	UGAGUACUAACCGAAUUC C	169
1719	GAAUUCGGUUAGUACUCA U	170	AUGAGUACUAACCGAAUU C	171
1725	GGUUAGUACUCAUUUGUA U	172	AUACAAAUGAGUACUAAC C	173
1730	GUACUCAUUUGUAUUCAC U	174	AGUGAAUACAAAUGAGUA C	175
1804	GGUAAAUGAUAGCCACAG U	176	ACUGUGGCUAUCAUUUAC C	177
1805	GUAAAUGAUAGCCACAGU A	178	UACUGUGGCUAUCAUUUUA C	179
1816	CCACAGUAUUGCUCCCUA A	180	UUAGGGAGCAAUACUGUG G	181
1892	GGGAAGUUCUGGUGUCAU A	182	UAUGACACCAGAACUUCC C	183
1897	GUUCUGGUGUCAUAGAUA U	184	AUAUCUAUGACACCAGAA C	185
1934	GCUGUGCAUUAAACUUGC A	186	UGCAAGUUUAAUGCACAG C	187
1937	GUGCAUUAAACUUGCACA U	188	AUGUGCAAGUUUAAUGCA C	189
1939	GCAUUAAACUUGCACAUG A	190	UCAUGUGCAAGUUUAAUG C	191
1953	CAUGACUGGAACGAAGUA U	192	AUACUUCGUUCCAGUCAU G	193
1960	GGAACGAAGUAUGAGUGC A	194	UGCACUCAUACUUCGUUC C	195
1961	GAACGAAGUAUGAGUGCA A	196	UUGCACUCAUACUUCGUU C	197
1972	GAGUGCAACUCAAAUGUG U	198	ACACAUUUGAGUUGCACU C	199
1976	GCAACUCAAAUGUGUUGA A	200	UUCAACACAUUUGAGUUG C	201
1982	CAAAUGUGUUGAAGAUAC U	202	AGUAUCUUAACACAUUU G	203
1987	GUGUUGAAGAUACUGCAG U	204	ACUGCAGUAUCUUCAACA C	205
1989	GUUGAAGAUACUGCAGUC A	206	UGACUGCAGUAUCUUCAA C	207

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
2020	CCUUGCUGAAUGUUUCCA A	208	UUGGAAACAUUCAGCAAG G	209
2021	CUUGCUGAAUGUUUCCAA U	210	AUUGGAAACAUUCAGCAA G	211
2024	GCUGAAUGUUUCCAAUAG A	212	UCUAUUGGAAACAUUCAG C	213
2035	CCAAUAGACUAAAUACUG U	214	ACAGUAUUUAGUCUAUUG G	215
2067	GAGUUUGGAAUCCGGAAU A	216	UAUUCGGGAUUCCAAACU C	217
2073	GGAAUCCGGAAUAAAUAC U	218	AGUAUUUAUUCGGGAUUC C	219
2074	GAAUCCGGAAUAAAUACU A	220	UAGUAUUUAUUCGGGAUU C	221
2080	GGAAUAAAUACUACCUGG A	222	UCCAGGUAGUAUUUAUUC C	223
2133	GGCCUGGCCUGAAUAUUA U	224	AUAUAUUCAGGCCAGGC C	225
2134	GCCUGAAUAUAUACUAC U	226	AGUAGUAUAUAUUCAGG C	227
2136	CUGGCCUGAAUAUAUAC U	228	AGUAUAUAUUCAGGCCA G	229
2166	CAUAUUUCAUCCAAGUGC A	230	UGCACUUGGAUGAAUAU G	231
2180	GUGCAAUAUGUAAGCUG A	232	UCAGCUUACAUAUUGCA C	233
2182	GCAAUAUGUAAGCUGAA U	234	AUUCAGCUUACAUAUUG C	235
2272	CACUAUCUUAUCUUCUCC U	236	AGGAGAAGAUAGAUAU G	237
2283	CUUCUCCUGAACUGUUGA U	238	AUCAACAGUUCAGGAGAA G	239

Tabla 8. ARNsi dirigidos a IDH1 de tipo silvestre

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUC G	240	CGACCUAUGAUGAUAGGU U	241
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCG U	242	ACGACCUAUGAUGAUAGG U	243
613	CCUAUCAUCAUAGGUCGU C	244	GACGACCUAUGAUGAUAG G	245
614	CUAUCAUCAUAGGUCGUC A	246	UGACGACCUAUGAUGAUA G	247
615	UAUCAUCAUAGGUCGUCA U	248	AUGACGACCUAUGAUGAU A	249
616	AUCAUCAUAGGUCGUCAU G	250	CAUGACGACCUAUGAUGA U	251
617	UCAUCAUAGGUCGUCAUG C	252	GCAUGACGACCUAUGAUG A	253
618	CAUCAUAGGUCGUCAUGC U	254	AGCAUGACGACCUAUGAU G	255
619	AUCAUAGGUCGUCAUGCU U	256	AAGCAUGACGACCUAUGA U	257
620	UCAUAGGUCGUCAUGCUU A	258	UAAGCAUGACGACCUAUG A	259
621	CAUAGGUCGUCAUGCUUA U	260	AUAAGCAUGACGACCUAU G	261
622	AUAGGUCGUCAUGCUUAU G	262	CAUAAGCAUGACGACCUA U	263
623	UAGGUCGUCAUGCUUAUG G	264	CCAUAAGCAUGACGACCU A	265
624	AGGUCGUCAUGCUUAUGG G	266	CCCAUAAGCAUGACGACC U	267
625	GGUCGUCAUGCUUAUGGG G	268	CCCCAUAAGCAUGACGAC C	269
626	GUCGUCAUGCUUAUGGGG A	270	UCCCAUAAGCAUGACGAC C	271
627	UCGUCAUGCUUAUGGGGA U	272	AUCCCAUAAGCAUGACGA C	273

Tabla 9. ARNsi que se dirigen al IDH1 mutante de G395A (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629A de la SEQ ID NO: 9 (FIG. 21B))

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

Tabla 10. ARNsi que se dirigen al IDH1 mutante de C394A (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628A de SEQ ID NO: 9 (FIG. 21B)) (Arg132Ser (SEQ ID NO: 8))

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

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
625	GGUAGUCAUGCUUAUGGGG	336	CCCCAUAAGCAUGACUACC	337
626	GUAGUCAUGCUUAUGGGGA	338	UCCCCAUAAGCAUGACUAC	339
627	UAGUCAUGCUUAUGGGGAU	340	AUCCCCAUAAGCAUGACUA	341

Tabla 11. ARNsi que se dirigen al IDH1 mutante de C394U (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628U de SEQ ID NO: 9 (FIG 21B)) (Arg132Cys (SEQ ID N°: 8))

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUUG	342	CAACCUAUGAUGAUAGGUU	343
612	ACCUAUCAUCAUAGGUUGU	344	ACAACCUAUGAUGAUAGGU	345
613	CCUAUCAUCAUAGGUUGUC	346	GACAACCUAUGAUGAUAGG	347
614	CUAUCAUCAUAGGUUGUCA	348	UGACAACCUAUGAUGAUAG	349
615	UAUCAUCAUAGGUUGUCAU	350	AUGACAACCUAUGAUGAUA	351
616	AUCAUCAUAGGUUGUCAUG	352	CAUGACAACCUAUGAUGAU	353
617	UCAUCAUAGGUUGUCAUGC	354	GCAUGACAACCUAUGAUGA	355
618	CAUCAUAGGUUGUCAUGCU	356	AGCAUGACAACCUAUGAUG	357
619	AUCAUAGGUUGUCAUGCUU	358	AAGCAUGACAACCUAUGAU	359
620	UCAUAGGUUGUCAUGCUUA	360	UAAGCAUGACAACCUAUGA	361
621	CAUAGGUUGUCAUGCUUAU	362	AUAAGCAUGACAACCUAUG	363
622	AUAGGUUGUCAUGCUUAUG	364	CAUAAGCAUGACAACCUAU	365
623	UAGGUUGUCAUGCUUAUGG	366	CCAUAAGCAUGACAACCUA	367
624	AGGUUGUCAUGCUUAUGGG	368	CCCAUAAGCAUGACAACCU	369
625	GGUUGUCAUGCUUAUGGGG	370	CCCCAUAAGCAUGACAACC	371
626	GUUGUCAUGCUUAUGGGGA	372	UCCCCAUAAGCAUGACAAC	373
627	UUGUCAUGCUUAUGGGGAU	374	AUCCCCAUAAGCAUGACAA	375

5 Tabla 12. ARNsi que se dirigen al IDH1 mutante de C394G (SEQ ID NO: 5) (equivalente a C628G de SEQ ID NO: 9 (FIG. 21B)) (Arg132Gly (SEQ ID NO: 8))

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUG G	376	CCACCUAUGAUGAUAGGU U	377
612	ACCUAUCAUCAUAGGUGG U	378	ACCACCUAUGAUGAUAGG U	379
613	CCUAUCAUCAUAGGUGGU C	380	GACCACCUAUGAUGAUAG G	381

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
614	CUAUCAUCAUAGGUGGUC A	382	UGACCACCUAUGAUGAUA G	383
615	UAUCAUCAUAGGUGGUCA U	384	AUGACCACCUAUGAUGAU A	385
616	AUCAUCAUAGGUGGUCAU G	386	CAUGACCACCUAUGAUGA U	387
617	UCAUCAUAGGUGGUCAUG C	388	GCAUGACCACCUAUGAUG A	389
618	CAUCAUAGGUGGUCAUGC U	390	AGCAUGACCACCUAUGAU G	391
619	AUCAUAGGUGGUCAUGCU U	392	AAGCAUGACCACCUAUGA U	393
620	UCAUAGGUGGUCAUGCUU A	394	UAAGCAUGACCACCUAUG A	395
621	CAUAGGUGGUCAUGCUUA U	396	AUAAGCAUGACCACCUAU G	397
622	AUAGGUGGUCAUGCUUAU G	398	CAUAAGCAUGACCACCUA U	399
623	UAGGUGGUCAUGCUUAUG G	400	CCAUAAGCAUGACCACCU A	401
624	AGGUUGUCAUGCUUAUGG G	402	CCCAUAAGCAUGACCACC U	403
625	GGUUGUCAUGCUUAUGGG G	404	CCCCAUAAGCAUGACCAC C	405
626	GUUGUCAUGCUUAUGGGG A	406	UCCCCAUAAGCAUGACCA C	407
627	UUGUCAUGCUUAUGGGGA U	408	AUCCCCAUAAGCAUGACC A	409

Tabla 13. ARNsi dirigidos al IDH1 mutante de G395C (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629C de SEQ ID NO: 9 (FIG. 21B)) (Arg132Pro (SEQ ID NO: 8))

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUC G	410	CGACCUAUGAUGAUAGGU U	411
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCC U	412	ACGACCUAUGAUGAUAGG U	413

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
613	CCUAUCAUCAUAGGUCGU C	414	GACGACCUAUGAUGAUAG G	415
614	CUAUCAUCAUAGGUCGUC A	416	UGACGACCUAUGAUGAUA G	417
615	UAUCAUCAUAGGUCGUCA U	418	AUGACGACCUAUGAUGAU A	419
616	AUCAUCAUAGGUCGUCAU G	420	CAUGACGACCUAUGAUGA U	421
617	UCAUCAUAGGUCGUCAUG C	422	GCAUGACGACCUAUGAUG A	423
618	CAUCAUAGGUCGUCAUGC U	424	AGCAUGACGACCUAUGAU G	425
619	AUCAUAGGUCGUCAUGCU U	426	AAGCAUGACGACCUAUGA U	427
620	UCAUAGGUCGUCAUGCUU A	428	UAAGCAUGACGACCUAUG A	429
621	CAUAGGUCGUCAUGCUUA U	430	AUAAGCAUGACGACCUAU G	431
622	AUAGGUCGUCAUGCUUAU G	432	CAUAAGCAUGACGACCUA U	433
623	UAGGUCGUCAUGCUUAUG G	434	CCUAAGCAUGACGACCU A	435
624	AGGUCGUCAUGCUUAUGG G	436	CCCAUAAGCAUGACGACC U	437
625	GGUCGUCAUGCUUAUGGG G	438	CCCCUAAGCAUGACGAC C	439
626	GUCGUCAUGCUUAUGGGG A	440	UCCCCUAAGCAUGACGA C	441
627	UCGUCAUGCUUAUGGGGA U	442	AUCCCCUAAGCAUGACG A	443

Tabla 14. ARNsi dirigidos al IDH1 mutante de G395U (SEQ ID NO: 5) (equivalente a G629U de SEQ ID NO: 9 (FIG. 21B)) (Arg132Leu (SEQ ID NO: 8))

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
611	AACCUAUCAUCAUAGGUC U	444	AGACCUAUGAUGAUAGGU U	445

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 21B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
612	ACCUAUCAUCAUAGGUCU U	446	AAGACCUAUGAUGAUAGG U	447
613	CCUAUCAUCAUAGGUCUU C	448	GAAGACCUAUGAUGAUAG G	449
614	CUAUCAUCAUAGGUCUUC A	450	UGAAGACCUAUGAUGAUA G	451
615	UAUCAUCAUAGGUCUUCA U	452	AUGAAGACCUAUGAUGAU A	453
616	AUCAUCAUAGGUCUUCAU G	454	CAUGAAGACCUAUGAUGA U	455
617	UCAUCAUAGGUCUUCAUG C	456	GCAUGAAGACCUAUGAUG A	457
618	CAUCAUAGGUCUUCAUGC U	458	AGCAUGAAGACCUAUGAU G	459
619	AUCAUAGGUCUUCAUGCU U	460	AAGCAUGAAGACCUAUGA U	461
620	UCAUAGGUCUUCAUGCUU A	462	UAAGCAUGAAGACCUAUG A	463
621	CAUAGGUCUUCAUGCUUA U	464	AUAAGCAUGAAGACCUAU G	465
622	AUAGGUCUUCAUGCUUAU G	466	CAUAAGCAUGAAGACCUA U	467
623	UAGGUCUUCAUGCUUAUG G	468	CCAUAAGCAUGAAGACCU A	469
624	AGGUCUUCAUGCUUAUGG G	470	CCCAUAAGCAUGAAGACC U	471
625	GGUCUUCAUGCUUAUGGG G	472	CCCCAUAAGCAUGAAGAC C	473
626	GUCUUCAUGCUUAUGGGG A	474	UCCCCAUAAGCAUGAAGA C	475
627	UCUUCAUGCUUAUGGGGA U	476	AUCCCCAUAAGCAUGAAG A	477

IDH2

- En las siguientes tablas se presentan ejemplos de ARNsi. Se pueden usar métodos conocidos en la técnica para seleccionar otros ARNsi. Los ARNsi pueden ser evaluados, *por ejemplo*, determinando la capacidad de un ARNsi para silenciar una *por ejemplo*, IDH2, *por ejemplo*, en un sistema *in vitro*, *por ejemplo*, en células cultivadas, *por ejemplo*, células HeLa o células de glioma cultivadas. Por ejemplo, los ARNsi en la Tabla 15 se generaron usando la herramienta de selección de ARNsi disponible en la web mundial en jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/. (Yuan *et al.* Nucl. Acids. Res. 2004 32:W130-W134.) También se pueden usar otras herramientas de selección. La entrada 1356 se adaptó de *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.

Los ARNsi en las Tablas 16-23 representan candidatos que abarcan el ARNm de IDH2 en las posiciones de nucleótido 600, 601 y 602 de acuerdo con la secuencia de ARNm presentada en el N.º de Acceso GenBank NM_002168.2 (Registro del 16 de agosto, 2009; GI28178831) (SEQ ID NO: 12, FIG. 22B; equivalente a las posiciones de nucleótidos 514, 515 y 516 de la secuencia de ADNc representada por la SEQ ID NO: 11, FIG. 22A).

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

Tabla 15. ARNsi dirigidos a IDH2 de tipo silvestre

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
250	GUGAUGAGAUGACCCGUUAU	478	AUACGGGUCAUCUCAUCAC	479
252	GAUGAGAUGACCCGUUAUUA	480	UAAUACGGGUCAUCUCAUC	481
264	CGUAUUUAUCUGGCAGUUA	482	UGAACUGCCAGAUAAUACG	483
274	GGCAGUUAUCAAGGAGAA	484	UUCUCCUUGAUGAACUGCC	485
451	GUGUGGAAGAGUUAAGCU	486	AGCUUGAACUCUCCACAC	487
453	GUGGAAGAGUUAAGCUGA	488	UCAGCUUGAACUCUCCAC	489
456	GAAGAGUUAAGCUGAAGA	490	UCUUCAGCUUGAACUCUUC	491
795	CAGUAUGCCAUAUCCAGAAGA	492	UCUUCUGGAUGGCAUACUG	493
822	CUGUACAUGAGCACCAAGA	494	UCUUGGUGCUCAUGUACAG	495
832	GCACCAAGAACACCAUACU	496	AGUAUGGUGUUCUUGGUGC	497
844	CCAUAUCUGAAAGCCUACGA	498	UCGUAGGCUUUCAGUAUGG	499
845	CAUACUGAAAGCCUACGAU	500	AUCGUAGGCUUUCAGUAUG	501
868	GUUUCAAGGACAUCUCCA	502	UGGAAGAUGUCCUUGAAAC	503
913	CCGACUUCGACAAGAAUAA	504	UUUUUCUUGUCGAAGUCGG	505
915	GACUUCGACAAGAAUAGA	506	UCUUUUUCUUGUCGAAGUC	507
921	GACAAGAAUAGAUCUGGU	508	ACCAGAUCUUUUUCUUGUC	509
949	GGCUCAUUGAUGACAUGGU	510	ACCAUGUCAUCAAUGAGCC	511
1009	GCAAGAACUAUGACGGAGA	512	UCUCCGUCAUAGUUCUUGC	513
1010	CAAGAACUAUGACGGAGAU	514	AUCUCCGUCAUAGUUCUUG	515
1024	GAGAUGUGCAGUCAGACAU	516	AUGUCUGACUGCACAUCUC	517
1096	CUGAUGGGAAGACGAUUGA	518	UCAAUCGUCUCCCAUCAG	519
1354	GCAAUGUGAAGCUGAACGA	520	UCGUUCAGCUUCACAUUGC	521
1668	CUGUAAUUUAUUAUUGCCCU	522	AGGGCAAUAUAAAUAACAG	523
1694	CAUGGUGCCAUAUUUAGCU	524	AGCUAAAUAUGGCACCAUG	525
1697	GGUGCCAUAUUUAGCUACU	526	AGUAGCUAAAUAUGGCACC	527
1698	GUGCCAUAUUUAGCUACUA	528	UAGUAGCUAAAUAUGGCAC	529
1700	GCCAUAUUUAGCUACUAAA	530	UUUAGUAGCUAAAUAUGGC	531

Tabla 16. ARNsi dirigidos a IDH2 de tipo silvestre

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

Tabla 17. ARNsi dirigidos al mutante A514G IDH2 (equivalente a A600G de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCGGG	566	CCCGCCAAUGGUGAUGGGC	567
585	CCCAUCACCAUUGGCGGGC	568	GCCCGCCAAUGGUGAUGGG	569
586	CCAUCACCAUUGGCGGGCA	570	UGCCCGCCAAUGGUGAUGG	571
587	CAUCACCAUUGGCGGGCAC	572	GUGCCCGCCAAUGGUGAUG	573
588	AUCACCAUUGGCGGGCACG	574	CGUGCCCGCCAAUGGUGAU	575
589	UCACCAUUGGCGGGCACGC	576	GCGUGCCCGCCAAUGGUGA	577
590	CACCAUUGGCGGGCACGCC	578	GGCGUGCCCGCCAAUGGUG	579
591	ACCAUUGGCGGGCACGCCC	580	GGGCGUGCCCGCCAAUGGU	581
592	CCAUUGGCGGGCACGCCCA	582	UGGGCGUGCCCGCCAAUGG	583
593	CAUUGGCGGGCACGCCCAU	584	AUGGGCGUGCCCGCCAAUG	585
594	AUUGGCGGGCACGCCCAUG	586	CAUGGGCGUGCCCGCCAAU	587
595	UUGGCGGGCACGCCCAUGG	588	CCAUGGGCGUGCCCGCCAA	589
596	UGGCGGGCACGCCCAUGGC	590	GCCAUGGGCGUGCCCGCCA	591
597	GGCGGGCACGCCCAUGGCG	592	CGCCAUGGGCGUGCCCGCC	593
598	GCGGGCACGCCCAUGGCGA	594	UCGCCAUGGGCGUGCCCGC	595

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
599	CGGGCACGCCCAUGGCGAC	596	GUCGCCAUGGGCGUGCCCG	597
600	GGGCACGCCCAUGGCGACC	598	GGUCGCCAUGGGCGUGCCC	599

Tabla 18. ARNsi dirigidos al mutante IDH2 de A514U (equivalente a A600U de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCUUGG	600	CCAGCCAAUGGUGAUGGGC	601
585	CCCAUCACCAUUGGCUUGG	602	GCCAGCCAAUGGUGAUGGG	603
586	CCAUCACCAUUGGCUUGGCA	604	UGCCAGCCAAUGGUGAUGG	605
587	CAUCACCAUUGGCUUGGCAC	606	GUGCCAGCCAAUGGUGAUG	607
588	AUCACCAUUGGCUUGGCACG	608	CGUGCCAGCCAAUGGUGAU	609
589	UCACCAUUGGCUUGGCACGC	610	GCGUGCCAGCCAAUGGUGA	611
590	CACCAUUGGCUUGGCACGCC	612	GGCGUGCCAGCCAAUGGUG	613
591	ACCAUUGGCUUGGCACGCCC	614	GGGCGUGCCAGCCAAUGGU	615
592	CCAUUGGCUUGGCACGCCCA	616	UGGGCGUGCCAGCCAAUGG	617
593	CAUUGGCUUGGCACGCCCAU	618	AUGGGCGUGCCAGCCAAUG	619
594	AUUGGCUUGGCACGCCCAUG	620	CAUGGGCGUGCCAGCCAAU	621
595	UUGGCUUGGCACGCCCAUGG	622	CCAUGGGCGUGCCAGCCAA	623
596	UGGCUUGGCACGCCCAUGGC	624	GCCAUGGGCGUGCCAGCCA	625
597	GGCUUGGCACGCCCAUGGCG	626	CGCCAUGGGCGUGCCAGCC	627
598	GCUGGCACGCCCAUGGCGA	628	UCGCCAUGGGCGUGCCAGC	629
599	CUGGCACGCCCAUGGCGAC	630	GUCGCCAUGGGCGUGCCAG	631
600	UGGCACGCCCAUGGCGACC	632	GGUCGCCAUGGGCGUGCCA	633

Tabla 19. ARNsi dirigidos al mutante IDH2 de G515A (equivalente a G601A de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAAG	634	CUUGCCAAUGGUGAUGGGC	635
585	CCCAUCACCAUUGGCAAGC	636	GCUUGCCAAUGGUGAUGGG	637
586	CCAUCACCAUUGGCAAGCA	638	UGCUUGCCAAUGGUGAUGG	639
587	CAUCACCAUUGGCAAGCAC	640	GUGCUUGCCAAUGGUGAUG	641
588	AUCACCAUUGGCAAGCACG	642	CGUGCUUGCCAAUGGUGAU	643
589	UCACCAUUGGCAAGCACGC	644	GCGUGCUUGCCAAUGGUGA	645
590	CACCAUUGGCAAGCACGCC	646	GGCGUGCUUGCCAAUGGUG	647
591	ACCAUUGGCAAGCACGCCC	648	GGGCGUGCUUGCCAAUGGU	649
592	CCAUUGGCAAGCACGCCCA	650	UGGGCGUGCUUGCCAAUGG	651
593	CAUUGGCAAGCACGCCCAU	652	AUGGGCGUGCUUGCCAAUG	653

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
594	AUUGGCAAGCACGCCCAUG	654	CAUGGGCGUGCUUGCCAAU	655
595	UUGGCAAGCACGCCCAUGG	656	CCAUGGGCGUGCUUGCCAA	657
596	UGGCAAGCACGCCCAUGGC	658	GCCAUGGGCGUGCUUGCCA	659
597	GGCAAGCACGCCCAUGGCG	660	CGCCAUGGGCGUGCUUGCC	661
598	GCAAGCACGCCCAUGGCGA	662	UCGCCAUGGGCGUGCUUGC	663
599	CAAGCACGCCCAUGGCGAC	664	GUCGCCAUGGGCGUGCUUG	665
600	AAGCACGCCCAUGGCGACC	666	GGUCGCCAUGGGCGUGCUU	667

Tabla 20. ARNsi dirigidos a G515C mutante IDH2 (equivalente a G601C de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCACG	668	CGUGCCAAUGGUGAUGGGC	669
585	CCCAUCACCAUUGGCACGC	670	GCGUGCCAAUGGUGAUGGG	671
586	CCAUCACCAUUGGCACGCA	672	UGCGUGCCAAUGGUGAUGG	673
587	CAUCACCAUUGGCACGCAC	674	GUGCGUGCCAAUGGUGAUG	675
588	AUCACCAUUGGCACGCACG	676	CGUGCGUGCCAAUGGUGAU	677
589	UCACCAUUGGCACGCACGC	678	GCGUGCGUGCCAAUGGUGA	679
590	CACCAUUGGCACGCACGCC	680	GGCGUGCGUGCCAAUGGUG	681
591	ACCAUUGGCACGCACGCCC	682	GGGCGUGCGUGCCAAUGGU	683
592	CCAUUGGCACGCACGCCCA	684	UGGGCGUGCGUGCCAAUGG	685
593	CAUUGGCACGCACGCCCAU	686	AUGGGCGUGCGUGCCAAUG	687
594	AUUGGCACGCACGCCCAUG	688	CAUGGGCGUGCGUGCCAAU	689
595	UUGGCACGCACGCCCAUGG	690	CCAUGGGCGUGCGUGCCAA	691
596	UGGCACGCACGCCCAUGGC	692	GCCAUGGGCGUGCGUGCCA	693
597	GGCACGCACGCCCAUGGCG	694	CGCCAUGGGCGUGCGUGCC	695
598	GCACGCACGCCCAUGGCGA	696	UCGCCAUGGGCGUGCGUGC	697
599	CACGCACGCCCAUGGCGAC	698	GUCGCCAUGGGCGUGCGUG	699
600	ACGCACGCCCAUGGCGACC	700	GGUCGCCAUGGGCGUGCGU	701

Tabla 21. ARNsi dirigidos a G515U mutante IDH2 (equivalente a G601U de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAUG	702	CAUGCCAAUGGUGAUGGGC	703
585	CCCAUCACCAUUGGCAUGC	704	GCAUGCCAAUGGUGAUGGG	705
586	CCAUCACCAUUGGCAUGCA	706	UGCAUGCCAAUGGUGAUGG	707
587	CAUCACCAUUGGCAUGCAC	708	GUGCAUGCCAAUGGUGAUG	709
588	AUCACCAUUGGCAUGCACG	710	CGUGCAUGCCAAUGGUGAU	711

(continuación)

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
589	UCACCAUUGGCAUGCACGC	712	GCGUGCAUGCCAAUGGUGA	713
590	CACCAUUGGCAUGCACGCC	714	GGCGUGCAUGCCAAUGGUG	715
591	ACCAUUGGCAUGCACGCCC	716	GGGCGUGCAUGCCAAUGGU	717
592	CCAUUGGCAUGCACGCCCA	718	UGGGCGUGCAUGCCAAUGG	719
593	CAUUGGCAUGCACGCCCAU	720	AUGGGCGUGCAUGCCAAUG	721
594	AUUGGCAUGCACGCCCAUG	722	CAUGGGCGUGCAUGCCAAU	723
595	UUGGCAUGCACGCCCAUGG	724	CCAUGGGCGUGCAUGCCAA	725
596	UGGCAUGCACGCCCAUGGC	726	GCCAUGGGCGUGCAUGCCA	727
597	GGCAUGCACGCCCAUGGCG	728	CGCCAUGGGCGUGCAUGCC	729
598	GCAUGCACGCCCAUGGCGA	730	UCGCCAUGGGCGUGCAUGC	731
599	CAUGCACGCCCAUGGCGAC	732	GUCGCCAUGGGCGUGCAUG	733
600	AUGCACGCCCAUGGCGACC	734	GGUCGCCAUGGGCGUGCAU	735

Tabla 22. ARNsi dirigidos al mutante IDH2 de G516C (equivalente a G602C de la SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

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

Tabla 23. ARNs dirigidos al mutante IDH2 de G516U (equivalente a G602U de SEQ ID NO: 12, (FIG. 22B))

Posición en el ARNm (FIG. 22B)	sentido (5' a 3')	SEQ ID NO:	antisentido (5' a 3')	SEQ ID NO:
584	GCCCAUCACCAUUGGCAGU	770	ACUGCCAAUGGUGAUGGGC	771
585	CCCAUCACCAUUGGCAGUC	772	GACUGCCAAUGGUGAUGGG	773
586	CCAUCACCAUUGGCAGUCA	774	UGACUGCCAAUGGUGAUGG	775
587	CAUCACCAUUGGCAGUCAC	776	GUGACUGCCAAUGGUGAUG	777
588	AUCACCAUUGGCAGUCACG	778	CGUGACUGCCAAUGGUGAU	779
589	UCACCAUUGGCAGUCACGC	780	GCGUGACUGCCAAUGGUGA	781
590	CACCAUUGGCAGUCACGCC	782	GGCGUGACUGCCAAUGGUG	783
591	ACCAUUGGCAGUCACGCCC	784	GGGCGUGACUGCCAAUGGU	785
592	CCAUUGGCAGUCACGCCCA	786	UGGCGUGACUGCCAAUGG	787
593	CAUUGGCAGUCACGCCCAU	788	AUGGGCGUGACUGCCAAUG	789
594	AUUGGCAGUCACGCCCAUG	790	CAUGGGCGUGACUGCCAAU	791
595	UUGGCAGUCACGCCCAUGG	792	CCAUGGGCGUGACUGCCAA	793
596	UGGCAGUCACGCCCAUGGC	794	GCCAUGGGCGUGACUGCCA	795
597	GGCAGUCACGCCCAUGGCG	796	CGCCAUGGGCGUGACUGCC	797
598	GCAGUCACGCCCAUGGCGA	798	UCGCCAUGGGCGUGACUGC	799
599	CAGUCACGCCCAUGGCGAC	800	GUCGCCAUGGGCGUGACUG	801
600	AGUCACGCCCAUGGCGACC	802	GGUCGCCAUGGGCGUGACU	803

Ejemplo 6 análisis estructural de IDH1 mutante R132H

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

La estructura cuaternaria general de la enzima mutante R132H homodimérica adopta la misma conformación catalíticamente competente cerrada (mostrada como un monómero en la Figura 29A) que se ha descrito previamente para la enzima de tipo silvestre (Xu, X. *et al.* J Biol Chem 279, 33946-57 (2004)). NADPH se coloca como se espera para la transferencia de hidruro a α KG en una orientación que produciría R(-)-2HG, coherente con nuestra determinación quiral del producto 2HG.

- 15 Se observaron dos características importantes por el cambio de R132 a histidina: el efecto sobre el equilibrio de la conformación catalítica y la reorganización del sitio activo. Ubicándose encima de una lámina β en el pequeño dominio relativamente rígido, R132 actúa como un resto guardián y parece orquestar el movimiento de la bisagra entre las conformaciones abiertas y cerradas. El resto de guanidinio de R132 oscila entre la conformación abierta y la cerrada con una distancia de casi 8 Å. Es probable que la sustitución de la histidina por arginina cambie el equilibrio a favor de la conformación cerrada que forma la hendidura catalítica para que el cofactor y el sustrato se unan de manera eficaz, lo que explica en parte la alta afinidad por NADPH exhibida por la enzima mutante R132H.
- 20 Esta característica puede ser ventajosa para la reducción de α KG a R(-)-2HG dependiente de NADPH en un entorno donde las concentraciones de NADPH son bajas. En segundo lugar, un examen más detallado del bolsillo catalítico de la estructura de IDH1 mutante en comparación con la enzima de tipo silvestre mostró no solo la pérdida esperada de interacciones clave entre el puente de sal entre el guanidinio de R132 y los carboxilatos α β de isocitrato, así como los cambios en la red que coordina el ion metálico, sino también una reorganización inesperada del sitio activo.
- 25 La mutación a histidina resultó en un cambio significativo en la posición de los restos Y139 altamente conservados de la subunidad A y K212' de la subunidad B (FIG. 29B), los cuales se cree que son críticos para la catálisis de esta familia de enzimas (Aktas, DF y Cook, P. F. Biochemistry 48, 3565-77 (2009)). En particular, el resto hidroxilo de Y139 ahora ocupa el espacio del β -carboxilato de isocitrato. Además, se realizó un reposicionamiento significativo de α KG en comparación con el isocitrato donde el carboxilato distal de α KG ahora apunta hacia arriba para establecer nuevos contactos con N96 y S94. En general, esta única mutación R132 da como resultado la formación de un sitio activo distinto en comparación con IDH1 de tipo silvestre.
- 30

Ejemplo 7 materiales y métodos

Resumen

Se introdujeron las mutaciones R132H, R132C, R132L y R132S en la IDH1 humana mediante técnicas estándar de biología molecular. 293T y las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG y LN-18 se cultivaron en DMEM, suero fetal bovino al 10 %. Las células fueron transfectadas y seleccionadas usando técnicas estándar. Los niveles de expresión de proteínas se determinaron mediante análisis de transferencia Western usando el anticuerpo IDHc (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo IDH1 (proteintech), anticuerpo de etiqueta MYC (Cell Signaling Technology), y Anticuerpo IDH2 (Abcam). Los metabolitos se extrajeron de células cultivadas y de muestras de tejido de acuerdo con variantes cercanas de un método previamente informado (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 raspado de tejidos u homogeneización para romper las células. La actividad enzimática en los lisados celulares se evaluó siguiendo un cambio en la fluorescencia de NADPH a lo largo del tiempo en presencia de isocitrato y NADP, o α KG y NADPH. Para ensayos enzimáticos que usan la enzima IDH1 recombinante, se produjeron proteínas en *E. coli* y se purificaron usando cromatografía de afinidad con Ni seguida de cromatografía de exclusión por tamaño de 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 de flujo de parada en presencia de isocitrato y NADP o α KG y NADPH. La quiralidad de 2HG se determinó como se describió anteriormente (Struys, E. A., Jansen, E. E., Verhoeven, N. M. y Jakobs, C. Clin Chem 50, 1391-5 (2004)). Para estudios de cristalografía, IDH1 recombinante purificado (R132H) a 10 mg/ml en Tris 20 mM, pH 7,4, se preincubó NaCl 100 mM durante 60 minutos con NADPH 10 mM, cloruro calificado 10 mM, y α KG 75 mM. Los cristales se obtuvieron a 20 °C mediante equilibrio de difusión de vapor usando 3 μ l de gotas mezcladas 2:1 (proteína: precipitante) contra una solución de pocillo de MES 100 mM, pH 6,5, PEG 6000 al 20 %. Las muestras de tumores de pacientes se obtuvieron después del consentimiento informado como parte de un protocolo de investigación aprobado por el IRB de UCLA. Se obtuvieron muestras de tumor cerebral tras resección quirúrgica, se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado por nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. El estado de mutación IDH1 de cada muestra se determinó usando técnicas convencionales de biología molecular como se describió anteriormente (Yan, H. et al. N Engl J Med 360, 765-73 (2009)). Los metabolitos se extrajeron y analizaron por LC-MS/MS como se describe anteriormente. Los métodos completos están disponibles en el material complementario.

Metodos suplementarios

Clonación, Expresión, y Purificación de IDH1 wt y mutantes en *E. coli*. El clon de marco de lectura abierto (ORF) de la isocitrato deshidrogenasa 1 (cDNA) humana (IDH1; ref. ID NM_005896) se adquirió en Invitrogen en pENTR221 (Carlsbad, CA) y Origene Inc. en pCMV6 (Rockville, MD). Para transfectar células con IDH1 de tipo silvestre o mutante, se utilizaron técnicas convencionales de mutagénesis de biología molecular para alterar la secuencia de ADN en el par de bases 395 del ORF en pCMV6 para introducir el cambio del par de bases de guanina a adenina, que dio lugar a un cambio en el código de aminoácidos en la posición 132 de arginina (wt) a histidina (mutante; o R132H), y confirmado por métodos de secuenciación de ADN convencionales. Para transfección de células 293T, el tipo silvestre y el mutante R132H IDH1 se subclonaron en pCMV-Sport6 con o sin una etiqueta Myc-DDK carboxiterminal. Para generación de líneas celulares estables, se usaron constructos en pCMV6. Para expresión en *E. coli*, la región de codificación se amplificó de pENTR221 mediante PCR usando cebadores diseñados para añadir sitios de restricciones NDEI y XHO1 en los extremos 5' y 3' respectivamente. El fragmento resultante se clonó en el vector pET41a (EMD Biosciences, Madison, WI) para permitir la expresión de *E. coli* de la proteína etiquetada con His8 C-terminal. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó en el plásmido pET41a-ICH1D1 usando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA) para cambiar G395 a A, dando como resultado la mutación Arg a His. R132C, Los mutantes R132L y R132S se introdujeron en pET41a-ICH1D1 de manera análoga.

Las proteínas de tipo silvestre y mutantes se expresaron y purificaron a partir de la cepa Rosetta™ de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de la siguiente manera. Las células se cultivaron en LB (20 μ g/ml de Kanamicina) a 37 °C con agitación hasta que DO600 alcanza 0,6. La temperatura se cambió a 18 °C y la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 12-16 horas de inducción de IPTG, las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1 %, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10 %) y se interrumpió por microfluidación. El sobrenadante a 20.000 g se cargó en resina de afinidad de quelato metálico (MCAC) equilibrada con un tampón de columna de níquel A (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 realizó mediante un gradiente lineal de 20 columnas de volumen de 10 % a 100 % de tampón de columna de níquel B (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, Imidazol 500 mM, glicerol al 10 %) en tampón de columna de níquel A). Las fracciones que contenían la proteína de interés se identificaron mediante SDS-PAGE, se agruparon y dializaron dos veces contra un exceso de 200 volúmenes de tampón de filtración de gel (200 mM NaCl, 50 mM Tris 7,5, β -mercaptoetanol 5 mM, MnSO₄ 2 mM, glicerol al 10 %), luego se concentró a 10 ml usando concentradores centrífugos Centricon (Millipore, Billerica, MA). La purificación de los dímeros activos se logró aplicando el eluyente concentrado de la columna MCAC a una columna Sephacryl S-200 (GE Life Sciences, Piscataway, NJ) equilibrada con el tampón de filtración en gel y eluyó la columna con 20 volúmenes de columna del mismo tampón. Las fracciones correspondientes al tiempo de retención de la proteína

dimérica se identificaron mediante SDS-PAGE y se agruparon para su almacenamiento a -80 °C.

Líneas celulares y cultivo celular. Se cultivaron células 293T en DMEM (Medio de Eagle modificado con Dulbecco) con suero bovino fetal al 10 % y se transfectaron usando constructos de IDH-1 basados en pCMV-6 en placas de seis pocillos con Eugene 6 (Roche) o Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. El vector parental pCMV6 (sin inserción), pCMV6-wt IDH1 o pCMV6-R132H se transfectaron en líneas celulares de glioblastoma humano (U87MG; LN-18 (ATCC, HTB-14 y CRL-2610; respectivamente) cultivados en DMEM con suero bovino fetal al 10 %. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, los cultivos celulares se pasaron a un medio que contenía sal sódica G418 en concentraciones de 500 ug/ml (U87MG) o 750 ug/ml (LN-18) para seleccionar transfectantes estables. Se generaron poblaciones agrupadas de células resistentes a G418 y se confirmó la expresión de IDH1 de tipo silvestre o IDH1 de R132 mediante análisis de transferencia de Western convencional.

Transferencia de Western. Para experimentos de transfección transitoria en células 293, las células se lisaron 72 horas después de la transfección con tampón RIPA convencional. Los lisados se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon con anticuerpo de cabra anti-IDHc (Santa Cruz Biotechnology sc49996) o con anticuerpo de conejo con etiqueta anti-MYC (Cell Signaling Technology N.º 2278) y luego se detectaron con anticuerpo de burro anti-cabra conjugado con HRP o cabra-anti-conejo conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology sc2004). El anticuerpo IDH1 para confirmar la expresión tanto de tipo silvestre como R132H IDH1 se obtuvo en Proteintech. El anticuerpo monoclonal de ratón IDH2 usado se obtuvo en Abcam.

Detección de isocitrato, α KG y 2HG en reacciones enzimáticas purificadas por LC-MS/MS. Las reacciones enzimáticas realizadas como se describe en el texto se ejecutaron hasta su finalización según se determinó mediante la medición del estado de oxidación de NADPH a 340 nm. Las reacciones se extrajeron con ocho volúmenes de metanol y se centrifugaron para eliminar la proteína precipitada. El sobrenadante se secó bajo una corriente de nitrógeno y se resuspendió en H₂O. El análisis se realizó en un API2000 LC-MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA). La separación y el análisis de la muestra se realizó en una columna Synergi Hydro-RP 80 A de 150 x 2 mm, 4 μ M, 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 MRM.

Ensayos enzimáticos basados en lisados celulares. Los lisados celulares 293T para medir la actividad enzimática se obtuvieron 48 horas después de la transfección con tampón de lisis M-PER suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa. Después de que los lisados se trataron con ultrasonidos y se centrifugaron a 12.000 g, los sobrenadantes se recolectaron y normalizaron para la concentración total de proteína. Para medir la actividad oxidante de IDH, se añadieron 3 μ g de proteína lisada a 200 μ l de una solución de ensayo que contenía 33 mM de tampón de Tris-acetato (pH 7,4), MgCl₂ 1,3 mM, EDTA 0,33 mM, β -NADP 100 μ M y concentraciones variables de D-(+)-*treo*-isocitrato. Absorbancia a 340 nm, reflejando la producción de NADPH, se midió cada 20 segundos durante 30 minutos en un espectrofotómetro SpectraMax 190 (Molecular Devices). Los puntos de datos representan la actividad media de 3 repeticiones por lisado, promediado entre 5 puntos de tiempo centrado en cada 5 min. Para medir la actividad reductora de IDH, se añadieron 3 μ g de proteína lisada a 200 μ l de una solución de ensayo que contenía Tris-acetato 33 mM (pH 7,4), MgCl₂ 1,3 mM, β -NADPH 25 μ M, NaHCO₃ 40 mM, y α KG 0,6 mM. La disminución de la absorbancia de 340 nm a lo largo del tiempo se midió para evaluar el consumo de NADPH, con 3 repeticiones por lisado.

Ensayos de enzimas IDH1 recombinantes. Todas las reacciones se realizaron en un tampón de reacción enzimática convencional (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, glicerol al 10 %, MgCl₂ 5 mM y 0,03 % (p/v) de albúmina de suero bovino). Para la determinación de parámetros cinéticos, se añadió suficiente enzima para dar 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 parado SFM-400 (BioLogi, Knoxville, TN). Las constantes enzimáticas se determinaron usando algoritmos de ajuste de curvas para modelos cinéticos estándar con el paquete de software Sigmaplot (Systat Software, San José, CA).

Determinación de la quiralidad de productos de reacción a partir de reacciones enzimáticas y tumores. Las reacciones enzimáticas se completaron y se extrajeron con metanol como se describe anteriormente, luego se derivatizó con ácido tartárico enantioméricamente puro antes de la resolución y el análisis por LC-MS/MS. Después de estar completamente secas, las muestras se resuspendieron en 50 mg/ml de ácido (2R,3R)-(+)-tartárico recién preparado en diclorometano: ácido acético (4: 1) y se incubó durante 30 minutos a 75 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron brevemente a 14.000 g, se secaron bajo una corriente de nitrógeno y se resuspendieron en H₂O. El análisis se realizó en un API200 LC-MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando un flujo isocrático de 90:10 (formiato de amonio 2 mM, pH 3,6:MeOH) en una Columna Luna C18(2) 150 x 2 mm, 5 μ M. El 2HG derivado de ácido tartárico se detectó usando la transición MRM 362,9/146,6 y los siguientes ajustes del instrumento: DP -1, FP -310, EP -4, CE-12, CXP-26. Análisis del patrón (R)-2HG, La mezcla racémica 2HG y la biomasa tumoral extraída con metanol (q.v.) se realizaron de manera similar.

Condiciones de cristalografía. Los cristales se obtuvieron a 20 °C mediante equilibrio de difusión de vapor usando 3 μ l de gotas mezcladas 2:1 (proteína: precipitante) contra una solución de pocillo de MES 100 mM, pH 6,5, PEG 6000

al 20 %.

Caracterización de proteínas. Aproximadamente 90 mg de isocitrato deshidrogenasa citosólica (HcIDH) humana se suministraron a Xtal BioStructures por Agios. Esta proteína era una forma mutante diseñada, R132S, con una etiqueta de purificación por afinidad C-terminal de 11 restos (secuencia SLEHHHHHHHH). El peso molecular monomérico calculado fue de 48,0 kDa y el pI teórico fue de 6,50. La proteína, a aproximadamente 6 mg/ml de concentración, se almacenó en alícuotas de 1 ml en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 5 mM y glicerol al 10 % a -80 °C. Como se muestra en la FIG. 32A, se realizó SDS-PAGE para probar la pureza de la proteína y se realizó una transferencia de Western anti-histidina para demostrar que la proteína estaba marcada con su etiqueta. Se inyectó una muestra de la proteína en una columna de exclusión por tamaño de FPLC para evaluar la pureza de la muestra y determinar el estado polimérico en solución. FIG. 32B es un cromatograma de esta ejecución que muestra un pico único que se ejecuta a un estimado de 87,6 kDa, sugiriendo que IDH existe como un dímero a pH 7,4. Antes de la cristalización, la proteína se intercambiaba en Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM usando concentradores centrífugos Amicon. En este momento, la proteína también se concentró hasta aproximadamente 15 mg/ml. A esta concentración de proteína y fuerza iónica, la proteína tendió a formar un nivel detectable de precipitado. Después de girar el precipitado, la solución era estable a ~ 10 mg/ml a 4 °C.

Intentos iniciales de cristalización. La estrategia para obtener cristales de calidad de difracción se derivó de las condiciones de la bibliografía, específicamente "Structures of Human Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase Reveal a Novel Self-regulatory Mechanism of Activity", Xu, *et al.* (2005) J.Biol.Chem. 279: 33946-56. En este estudio, se produjeron dos formas cristalinas de la proteína de tipo silvestre HcIDH. una contenía su "complejo binario", IDH-NADP, que cristalizó a partir de gotas colgantes en el grupo espacial tetragonal $P4_32_12$. Las gotas se formaron a partir de partes iguales de solución de proteína (15 mg/ml IDH, NADP 10 mM) y precipitante que consiste en MES 100 mM (pH 6,5) y PEG 20000 al 12 %. La otra forma de cristal contenía su "complejo cuaternario", IDH-NADP/isocitrato/ Ca^{2+} , que cristalizó en el grupo espacial monoclinico. $PAG2_1$, usando MES 100 mM (pH 5,9) y 20 % de PEG 6000 como precipitante. Aquí se agregaron 10 mM de isocitrato de DL y 10 mM de cloruro de calcio a la solución de proteína. Los primeros intentos de cristalizar el mutante R132S en este estudio se centraron en estas dos condiciones informadas con poca variación. A continuación se enumeran los componentes de la cristalización que podrían variarse; Se probaron varias combinaciones diferentes de estos componentes en el proceso de selección.

En la solución de proteínas:

HcIDH (R132S)	siempre ~ 10 mg/ml o ~ 0,2 mM
Tris-HCl (pH 7,4)	siempre 20 mM
NaCl	siempre 100 mM
NADP ⁺ /NADPH	ausente o 5 mM NADP ⁺ (no se probó NADPH)
ácido DL-isocítico, sal trisódica	ausente o 5 mM
cloruro cálcico	ausente o 10 mM
En el precipitante:	MES 100 mM (pH 6,5) y PEG 20000 al 12 %
O	
Tamaño de gota:	MES 100 mM (pH 6,0) y PEG 6000 al 20 % siempre 3 μ l
Proporciones de caída:	2:1, 1:1 o 1:2 (proteína:precipitante)

Al formar las gotas colgantes, siempre se observó un precipitado lechoso. En la inspección después de 2-4 días a 20 °C, la mayoría de las gotas mostraron una precipitación densa o separación de fases. En algunos casos, el precipitado disminuyó y fue a partir de este tipo de gotas que pequeños cristales habían crecido, por ejemplo, como se muestra en la FIG. 33.

Optimización del cristal. Una vez que se consiguieron buenos cristales, la siguiente etapa fue optimizar las condiciones para obtener cristales más grandes y de forma más regular de IDH-NADP/isocitrato/ Ca^{2+} de manera oportuna y coherente. La identificación óptima se centró en variar el pH de 5,7 a 6,2, la concentración de MES de 50 a 200 mM y la concentración de PEG 6000 de 20 a 25 %. También, se colocaron gotas más grandes (5-6 μ l) y las relaciones de caída se variaron nuevamente. Estos intentos fallaron al producir cristales de calidad de difracción, más grandes pero reproducían los resultados informados anteriormente. Se observaron o un precipitado denso, separación de fases oleosas o cristales pequeños.

Usando α -Cetoglutarato. Simultáneamente a la optimización de los cristales de isocitrato, se realizaron otras identificaciones para obtener cristales de IDH(R132S) formando complejos con α -cetoglutarato en su lugar. La solución de proteína fue consistentemente de 10 mg/ml de IDH en Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM. Lo siguiente se añadió en este orden: NADP 5 mM, ácido α -cetoglutarico 5 mM (ácido libre, pH equilibrado con NaOH) y cloruro de calcio 10 mM. La proteína se dejó incubar con estos compuestos durante al menos una hora antes de que se establecieran las gotas. El precipitante fue MES 100 mM (pH 6,5) y PEG 20000 al 12 % o MES 100 mM (pH 6,5)

y PEG 6000 al 20 %. Otra vez, la precipitación o la separación de fases se observó principalmente, pero en algunas gotas se formaron pequeños cristales. Al borde de una de las gotas, se formó un solo cristal grande, representado a continuación. Este fue el único cristal usado en la siguiente determinación estructural. FIG. 34 muestra el cristal obtenido de una solución de proteína que contiene NADP 5 mM, α -cetoglutarato 5 mM, Ca^{2+} 10 mM. El precipitante contenía MES 100 mM (pH 6,5) y 12 % de PEG 20000.

Condiciones criogénicas. Para enviar el cristal a la fuente de rayos X y protegerlo durante la criocristalografía, se necesitaba un crioprotector adecuado. El glicerol se usa mucho y fue la primera opción. Se hizo una solución criogénica, básicamente como una mezcla de tampón proteico y solución precipitante más glicerol: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, NADP 5 mM, ácido α -cetoglutarico 5 mM, cloruro de calcio 10 mM, MES 100 mM (pH 6,5), 12 % de PEG 20000 y 12,5 % de glicerol o 25 % de glicerol. El cristal se transfirió a la solución criogénica en dos etapas. Primero, se añadieron 5 μl de la solución de glicerol al 12,5 % directamente a la gota y se incubaron durante 10 minutos, observando posibles roturas del cristal. El líquido se retiró de la gota y se añadieron 10 μl de la solución de glicerol al 25 % sobre el cristal. Otra vez, se incubó durante 10 minutos, se cosechó en un bucle de nailon y se sumergió en nitrógeno líquido. El cristal se almacenó sumergido en una solución de nitrógeno líquido para su transporte.

Recogida y procesamiento de datos. El cristal congelado se montó en un instrumento de rayos X Rigaku RAXIS IV bajo una corriente de gas nitrógeno a temperaturas cercanas a -170°C . Se recogió un conjunto de datos de 200° con el detector de placa de imagen usando una radiación de longitud de onda de $1,54 \text{ \AA}$ de una fuente de origen de ánodo de cobre giratorio, oscilaciones de 1° y exposiciones de 10 minutos. La presencia de glicerol al 25 % como crioprotector fue suficiente para una congelación adecuada, ya que no se observaron signos de agrietamiento del cristal (manchas o retículas superpuestas). Se observó un anillo difuso a una resolución de $3,6 \text{ \AA}$, muy probablemente causado por la formación de hielo. El patrón de difracción de rayos X mostró planos de red cristalina claros y una separación de puntos razonable, aunque el espaciado a lo largo de un eje recíproco era bastante pequeño ($b = 275,3$). Los datos se relacionaron a una resolución de $2,7 \text{ \AA}$ en un grupo espacial $P2_12_12$ con HKL2000 (Otwinowski y Minor, 1997). Se conocen tres estructuras para HcIDH, denominadas forma cerrada (1T0L), forma abierta (subunidad A de 1T09) y forma semiabierta (subunidad B de 1T09). El reemplazo molecular se realizó con el programa PHASER de CCP4 (Bailey, 1994) usando solo los átomos de proteína de estas tres formas. Solo la forma cerrada produjo un resultado de reemplazo molecular exitoso con 6 subunidades de proteínas en la unidad asimétrica. La celda unitaria contiene aproximadamente 53,8 % de solvente.

Refinamiento del modelo. Usando el programa REFMAC5 de CCP4, se realizó un refinamiento de cuerpo rígido para ajustar cada una de las 6 subunidades de IDH en la unidad asimétrica. Esto fue seguido por un refinamiento de cuerpo rígido de los tres dominios en cada subunidad de proteína. El refinamiento restringido usando un promedio de simetría no cristalográfica de pares de subunidades relacionadas produjo una estructura inicial con R_{crist} de 33 % y R_{libre} del 42 %. La construcción de modelos y el refinamiento del espacio real se realizaron usando el programa de gráficos COOT (Emsley y Cowtan, 2004). Se calculó un mapa de diferencias que mostró una fuerte densidad de electrones en donde seis copias individuales del ligando de NADP y el ion de calcio se ajustaron manualmente con COOT. La densidad para la estructura de α -cetoglutarato fue menos definida y se ajustó después de ajustar los restos de proteínas del sitio de unión usando un mapa de omisión compuesto de $2F_o - F_c$. Se aplicó la optimización automatizada del diagrama de Ramachandran acoplada con el ajuste manual de densidad en el espacio real para mejorar la geometría y el ajuste en general. Una ronda final de refinamiento restringido con NCS proporcionó un R_{cristal} de 30,1 % y R_{libre} de 35,2 %.

a, Å	b, Å	c, Å	α	B	γ	Volumen de celda unitaria, Å ³	Z
116,14	275,30	96,28	90°	90°	90°	$3,08 \times 10^6$	24

Reflexiones en conjunto de trabajo/conjunto de ensayo	
R_{crist}	30,1 %
R_{libre}	35,2 %

Datos de rayos X y estadísticas de refinamiento para IDH(R132S)-NADP/ α -cetoglutarato/ Ca^{2+}

Parámetros cristalinos	
Grupo espacial	$P2_12_12$
Dimensiones de la celda unitaria	

(continuación)

a, b, c, Å	116,139, 275,297, 96,283
Dimensiones de la celda unitaria	
$\alpha, \beta, \gamma, ^\circ$	90,0, 90,0, 90,0
Volumen, Å ³	3.078.440
N.º moléculas de proteína en unidad asimétrica	6
N.º moléculas de proteína en celda unitaria, Z	24
Recopilación de datos	
Línea de haz	
Fecha de recopilación	25 Abril, 2009
λ , Å	1,5418
Detector	Rigaku Raxis IV
Conjunto de datos (ϕ), °	200
Resolución, Å	25-2,7 (2,8-2,7)
Reflexiones únicas ($N, F > 0$)	73.587
Integridad, %	85,4 (48,4)
$\langle I \rangle / \sigma I$	9,88 (1,83)
Fusión de R	0,109 (0,33)
Redundancia	4,3 (1,8)
Mosaicidad	0,666
Factor de Wilson B	57,9
Factor de anisotropía B, Å ²	-1,96
Estadística de Refinamiento	
Límite de resolución, Å	20,02-2,70
N.º de reflexiones utilizadas para R -trabajo ^a / R -libre ^b	68.755/3608
Átomos de proteína	19788
Átomos de ligando	348
N.º de aguas	357
Iones etc.	6
coef. Matthews Å ³ / Dalton	2,68
Disolvente, %	53,8
R -trabajo ^a / R -libre ^b , (%)	30,1/35,2
Factor-de-calidad ^c	0,80 (0,74)
Factores B promedio	31,0
Error de coordenadas (representación de Luzzati), Å	0,484
Desviaciones de R.M.S.	
Longitudes de enlace, Å	0,026
Desviaciones de R.M.S.	
Ángulos de enlace, °	2,86

(continuación)

La integridad y la fusión de R se dan para todos los datos y para datos en la protección e mayor resolución. Los valores de protección más altos están entre paréntesis.

^aR factor $\sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} F_o$, donde F_o y F_c son las amplitudes de factor de estructura observadas y calculadas, respectivamente para todas las reflexiones hkl utilizado en el refinamiento.

^bR-libre se calcula para el 5 % de los datos que no se usaron en el refinamiento.

^cFactor-de-calidad = $\sqrt{x^2 + y^2}$, donde $x = (\sum_0^{2\pi} P(\alpha) \cos \alpha) / (\sum_0^{2\pi} P(\alpha))$, $y = (\sum_0^{2\pi} P(\alpha) \sin \alpha) / (\sum_0^{2\pi} P(\alpha))$, y la probabilidad de fase $P(\alpha) = \exp(A \cos \alpha + B \sin \alpha + C \cos(2\alpha) + D \sin(2\alpha))$, donde A , B , C , y D son los coeficientes de Hendrickson-Lattman y α es la fase.

Estereoquímica de IDH(R132S)-NADP/ α -cetoglutarato/ Ca^{2+}

Gráfico de representación de Ramachandran	N.º de aminoácidos	% de restos
Restos en las regiones más favorecidas [A, B, L]	1824	82,2
Restos en regiones adicionales permitidas [a, b, l, p]	341	15,4
Restos en regiones generosamente permitidas [-a, -b, -l, -p]	38	1,7
Restos en regiones prohibidas	17	0,8
Número de restos no glicina y no prolina	2220	100
Número de restos finales (excl. Gly y Pro)	387	
Número de restos de glicina	198	
Número de restos de prolina	72	
Número total de restos	2877	
Puntuación de <G>-factor ^d general (> -1,0)	-0,65	
Generado por PROCHECK (Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) J Appl Crystallogr 26: 283-291.)		
Factores ^d G para ángulos diédricos de las cadenas principales y laterales, y fuerzas covalentes de las cadenas principales (longitudes de enlace y ángulos de enlace). Los valores deberían ser idealmente -0,5 o superiores a -1,0.		

Longitud de onda de radiación, Å	1,54
Resolución, Å (capa exterior)	20-2,70 (2,80-2,70)
Reflexiones únicas	73.587
Integridad (capa exterior)	85,4 % (48,4 %)
Redundancia (capa exterior)	4,3 (1,8)
R _{fusión} (capa exterior)	10,9 % (33 %)
<I>/< σ (I)> (capa exterior)	9,88 (1,83)

- 5 Muestras Clínicas, Extracción y análisis de metabolitos. Se obtuvieron tumores cerebrales humanos durante la resección quirúrgica, se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. La clasificación clínica del tejido se realizó usando la clasificación y clasificación de patología clínica estándar según lo establecido por la OMS. El análisis de la secuencia genómica se implementó para identificar muestras de tumores cerebrales que contienen isocitrato deshidrogenasa (IDH1) de tipo silvestre o mutaciones que alteran el aminoácido 132. El ADN genómico se aisló a partir de 50-100 mg de tejido de tumor cerebral usando métodos estándar. Se usó una reacción en cadena de la polimerasa en el ADN genómico aislado para amplificar un fragmento de 295 pares de bases del ADN genómico que contiene las secuencias tanto del intrón como del 2º exón de IDH1 humana y estado de mutación evaluados mediante técnicas estándar de biología molecular.
- 10
- 15 La extracción de metabolitos se realizó mediante la adición de un volumen 10x (relación m/v) de mezcla de metanol y agua a -80 °C (80 %:20 %) al tejido cerebral (aproximadamente 100 mg) seguido de una homogeneización de 30 s a 4 °C. Estos tejidos homogeneizados extraídos con metanol, enfriados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30

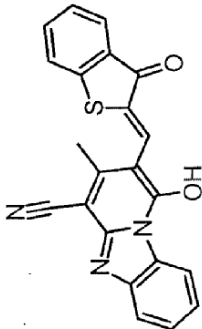
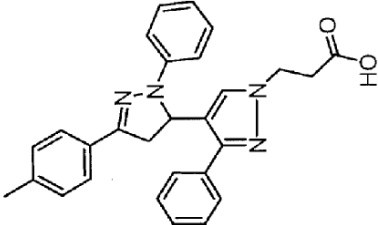
minutos para sedimentar los restos celulares y tisulares y los sobrenadantes de tejidos eliminados se transfirieron a un vial congelador con tapa de rosca y se almacenaron a -80 °C. Para análisis, se añadió un volumen 2X de tributilamina (10 mM) ácido acético (10 mM) pH 5,5 a las muestras y se analizó mediante LCMS como sigue. Los extractos de la muestra se filtraron usando un disco Millex-FG de 0,20 micrómetros y se inyectaron 10 µl en una columna de HPLC de fase inversa (Synergi 150 mm x 2 mm, Phenomenex Inc.) y se eluyeron usando un gradiente lineal de metanol de calidad LCMS (50 %) con 10 mM de tributilamina y 10 mM de ácido acético) hasta el 80 % de metanol: tributilamina 10 mM: ácido acético 10 mM durante 6 minutos a 200 µl/min. Los iones de metabolitos eluidos se detectaron usando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, sintonizado para detectar en modo negativo con el conjunto de transición de modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) de acuerdo con los pesos moleculares y los patrones de fragmentación para 8 metabolitos centrales conocidos, incluyendo 2-hidroxiglutarato como se describe anteriormente. Los datos se procesaron usando el Software Analyst (Applied Biosystems, Inc.) y las intensidades de señal del metabolito se obtuvieron mediante métodos estándar de integración de picos.

Ejemplo 9 compuestos que inhiben IDH1 R132H

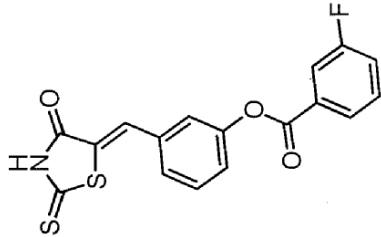
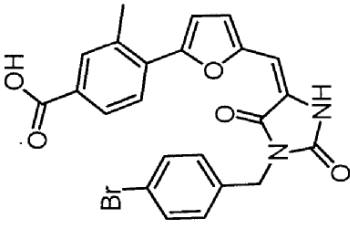
Los ensayos se realizaron en un volumen de 76 µl de tampón de ensayo (NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris 20 mM pH 7,5, 0,03 % de albúmina de suero bovino) como sigue en una placa estándar de 384 pocillos: A 25 µl de la mezcla de sustrato (8 µM de NADPH, aKG 2 mM), se añadió 1 µl de compuesto de ensayo en DMSO. La placa se centrifugó brevemente y luego se añadieron 25 µl de mezcla de enzimas (0,2 µg/ml de IDH1 R132H) seguido de una breve centrifugación y agitación a 100 RPM. La reacción se incubó durante 50 minutos a temperatura ambiente, luego se añadieron 25 µl de la mezcla de detección (30 µM de resazurina, 36 µg/ml) y la mezcla se incubó adicionalmente durante 5 minutos a temperatura ambiente. La conversión de resazurina en resorufina se detectó mediante espectroscopía fluorescente en Ex544 Em590 c/o 590.

La Tabla 24a muestra el perfil de selectividad de tipo silvestre frente a mutante de 5 ejemplos de inhibidores de IDH1R132H. El ensayo IDH1wt se realizó a 1x Km de NADPH en lugar de IDH1R132H a 10x o 100x Km de NADPH. El segundo ejemplo no mostró inhibición, incluso a 100 µM. También, el primer ejemplo tiene CI₅₀ = 5,74 µM pero se modifica significativamente cuando se analiza a 100x Km, indicando inhibidor directo competitivo para NADPH. La selectividad entre el tipo silvestre y el mutante podría ser > 20 veces.

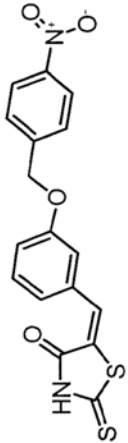
Tabla 24a

ESTRUCTURA	LDHa CI50	LDHb CI50	ICDH CI50 (uM) @ 4 uM (10x Km) NADPH	ICDH CI50 (uM) @ 40 uM NADPH	Relación CI50 (40/4)	IDHwt CI50 @ 1x Km (uM)
	25,43	64,07	5,74	> 100	17,42	16,22
	5,92	17,40	12,26	41,40	3,38	Inhibición de NO

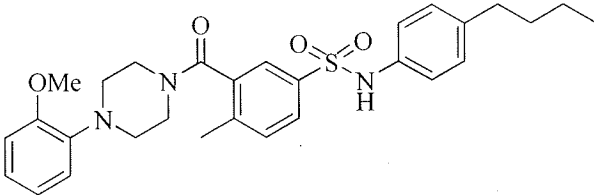
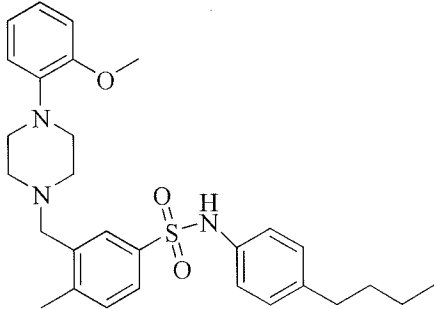
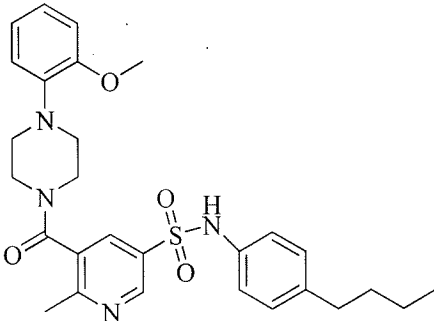
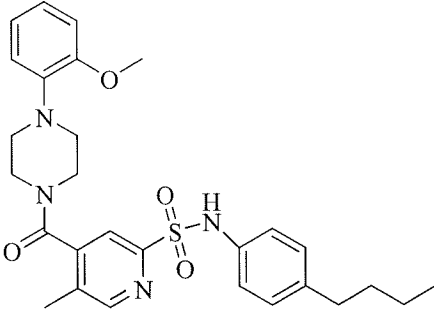
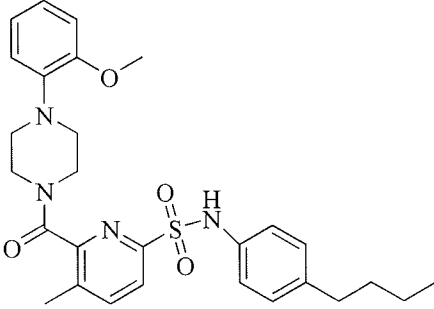
(continuación)

ESTRUCTURA	LDH _a C _i 50	LDH _b C _i 50	ICDH C _i 50 (μM) @ 4 μM (10x Km) NADPH	ICDH C _i 50 (μM) @ 40 μM NADPH	Relación C _i 50 (40/4)	IDHwt C _i 50 @ 1x Km (μM)
	8,61	> 100	12,79	14,70	1,15	19,23
	33,75	> 100	14,98	19,17	1,28	46,83

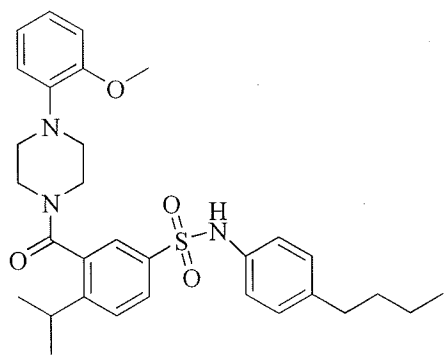
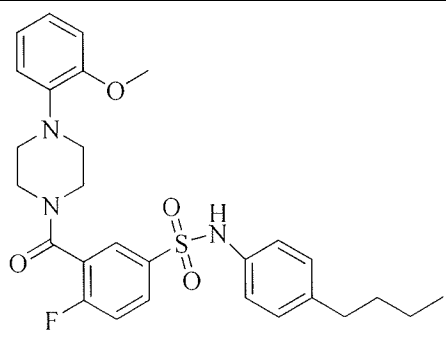
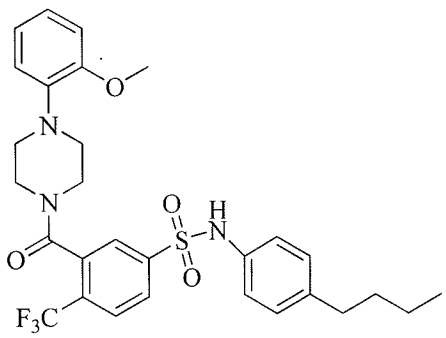
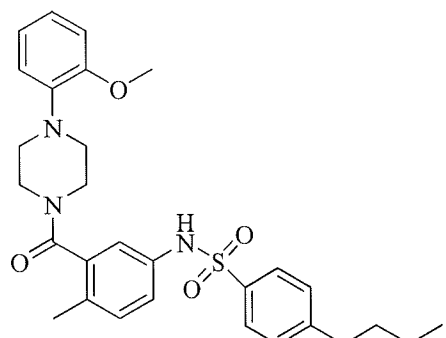
(continuación)

ESTRUCTURA	LDH _a Cl50	LDH _b Cl50	ICDH Cl50 (uM) @ 4 uM (10x Km) NADPH	ICDH Cl50 (uM) @ 40 uM NADPH	Relación Cl50 (40/4)	IDHwt Cl50 @ 1x Km (uM)
	12,76	> 100	23,80	33,16	1,39	69,33

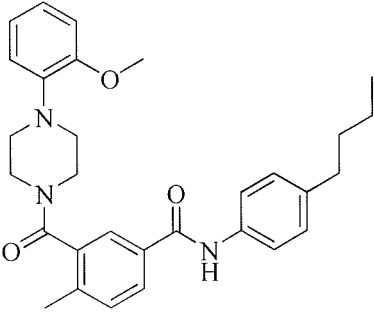
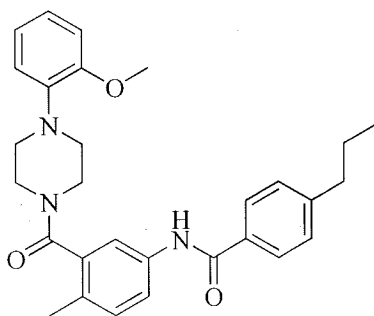
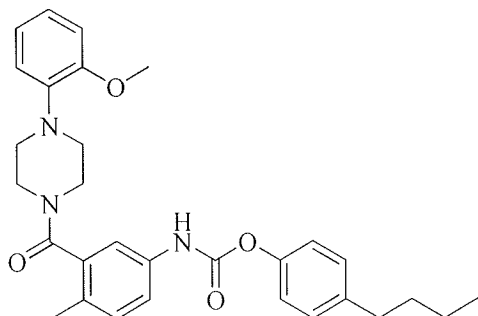
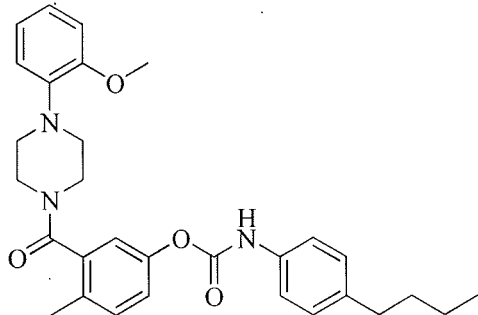
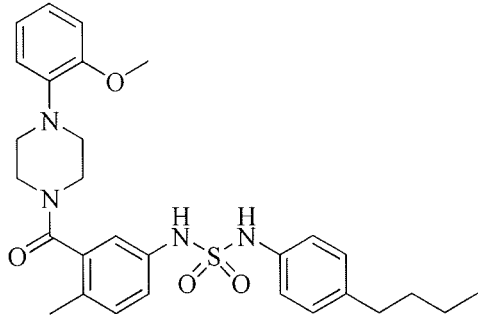
Los compuestos ejemplares adicionales que inhiben IDH1R132H se proporcionan a continuación en la Tabla 24b.

Compuesto	N.º
	1
	2
	3
	4
	5

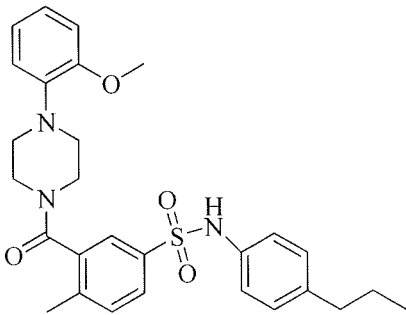
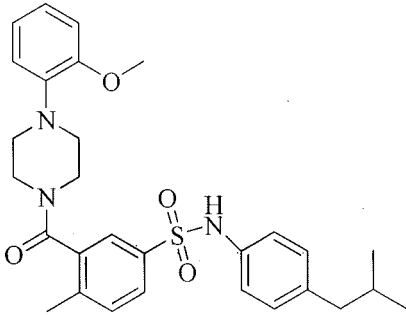
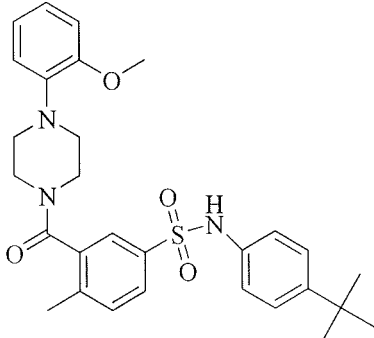
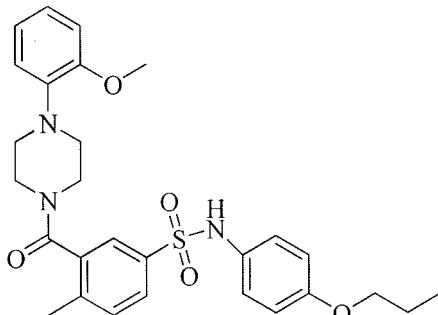
(continuación)

Compuesto	N.º
	6
	7
	8
	9

(continuación)

Compuesto	N.º
	10
	11
	12
	13
	14

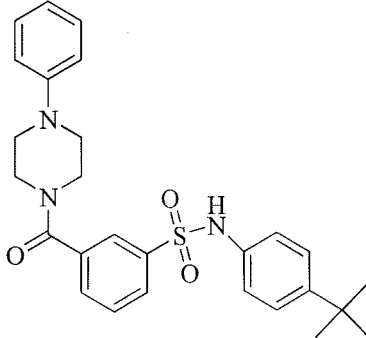
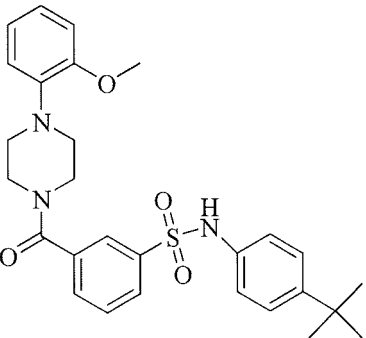
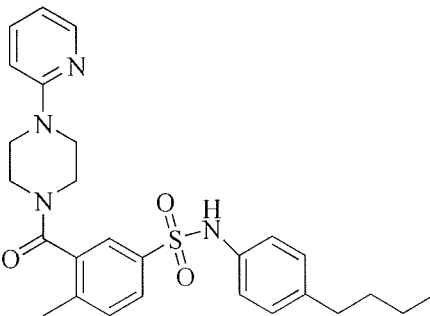
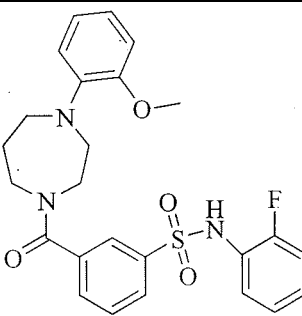
(continuación)

Compuesto	N.º
	15
	16
	17
	18

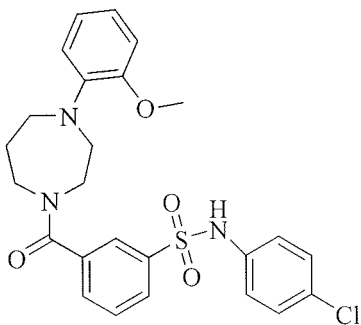
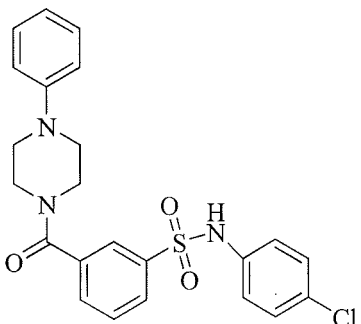
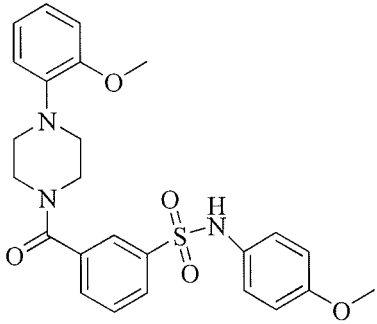
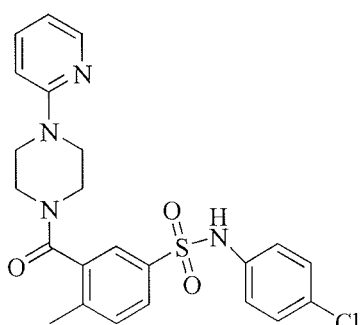
(continuación)

Compuesto	N.º
	19
	20
	21
	22

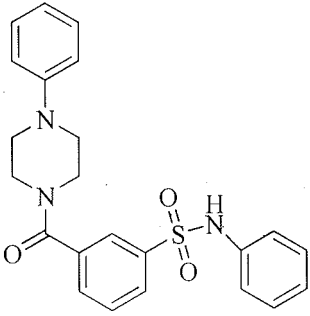
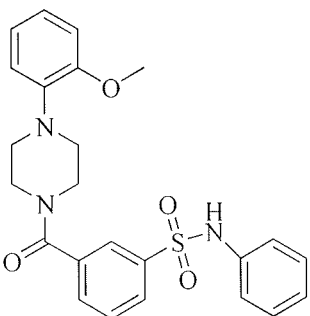
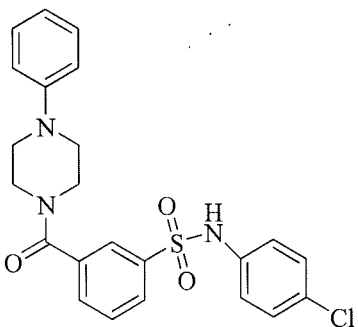
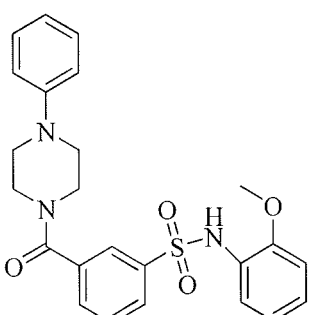
(continuación)

Compuesto	N.º
	23
	24
	25
	26

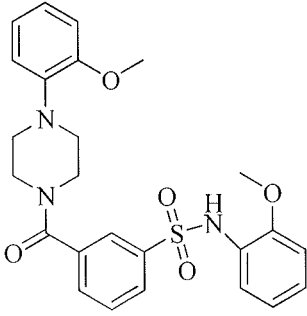
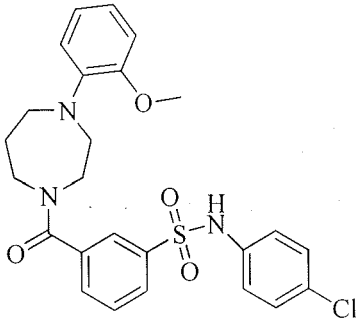
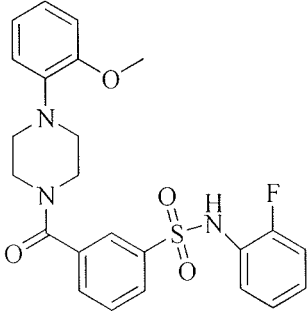
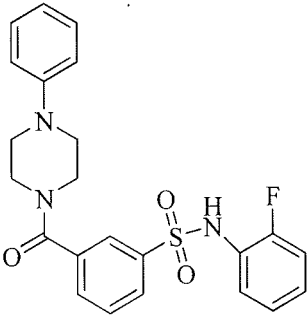
(continuación)

Compuesto	N.º
	27
	28
	29
	30

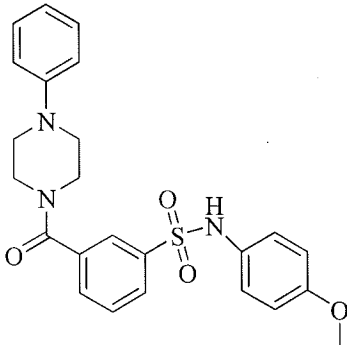
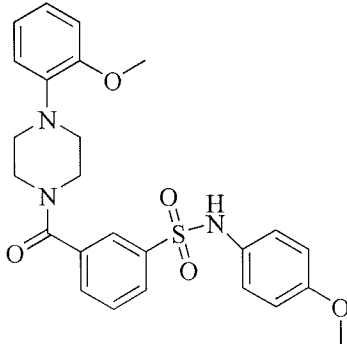
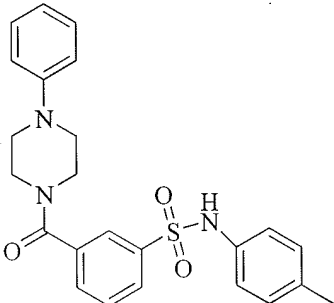
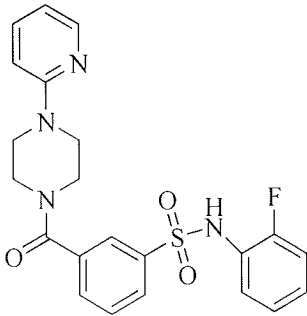
(continuación)

Compuesto	N.º
	31
	32
	33
	34

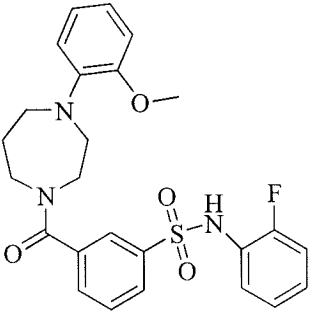
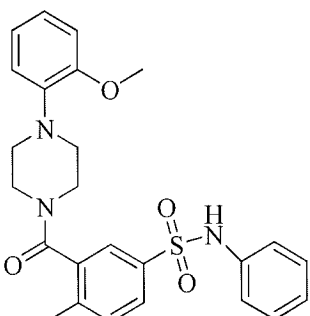
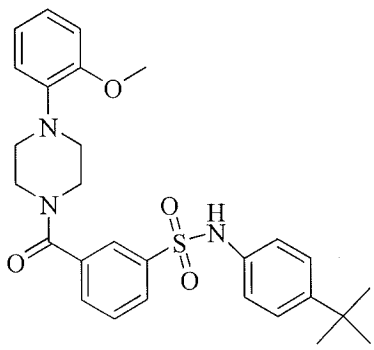
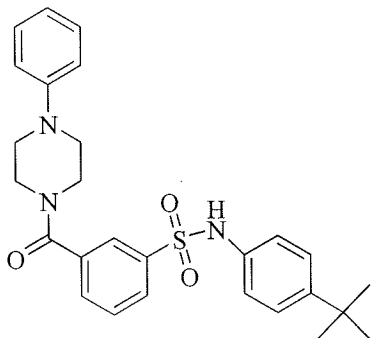
(continuación)

Compuesto	N.º
	35
	36
	37
	38

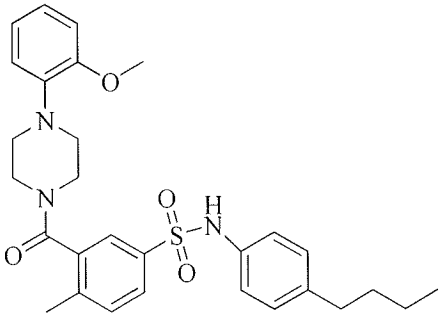
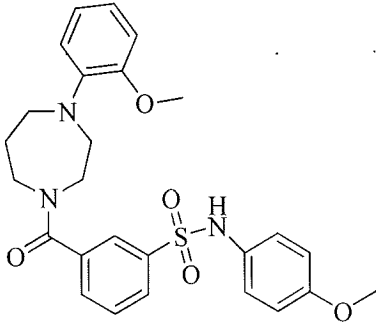
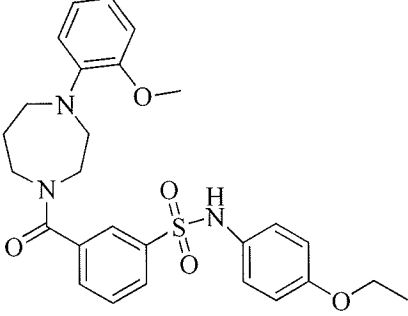
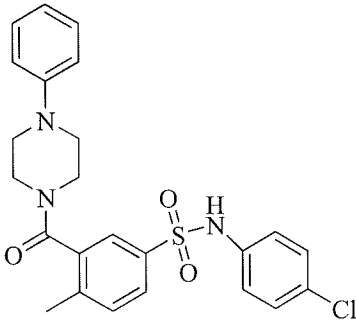
(continuación)

Compuesto	N.º
	39
	40
	41
	42

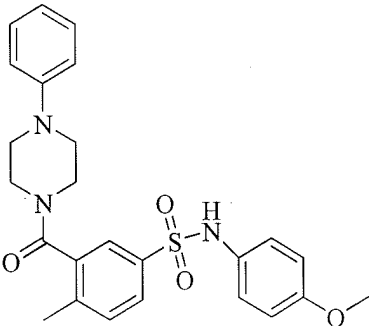
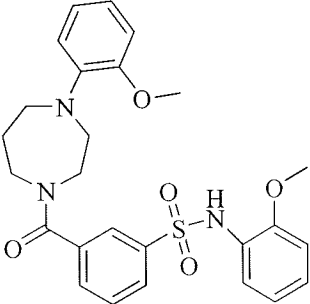
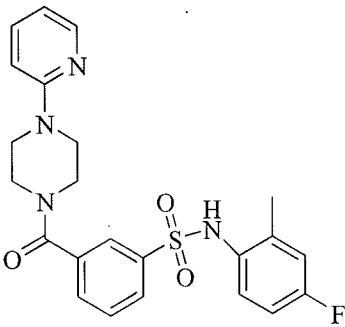
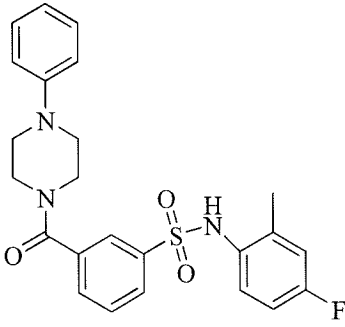
(continuación)

Compuesto	N.º
	43
	44
	45
	46

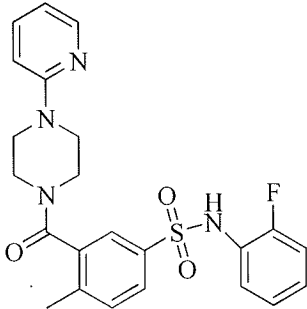
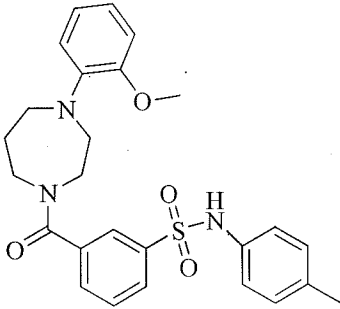
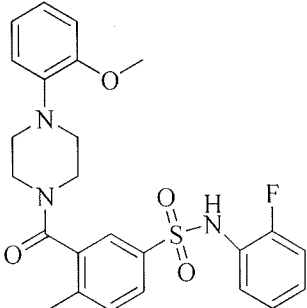
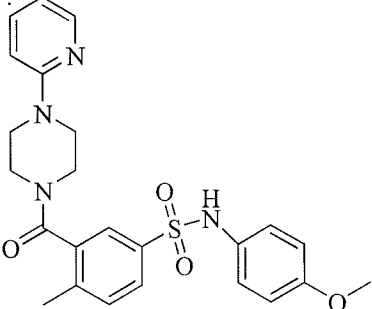
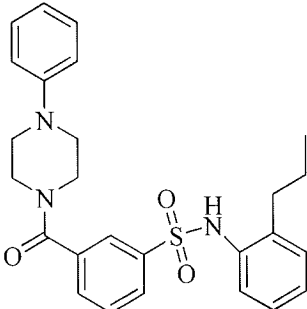
(continuación)

Compuesto	N.º
	47
	48
	49
	50

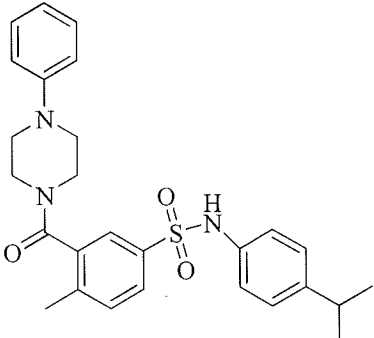
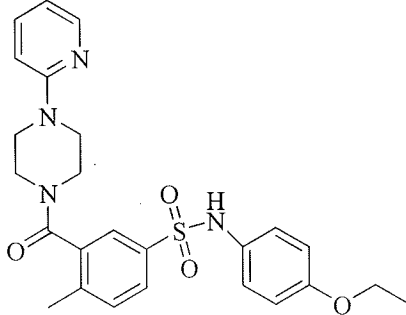
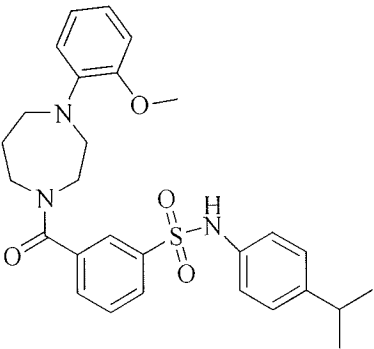
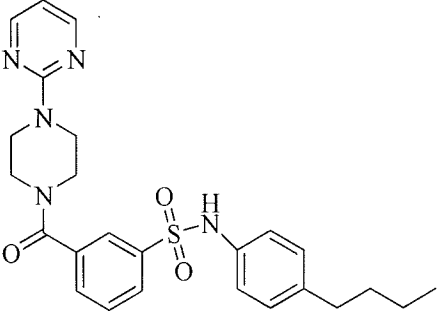
(continuación)

Compuesto	N.º
	51
	52
	53
	54

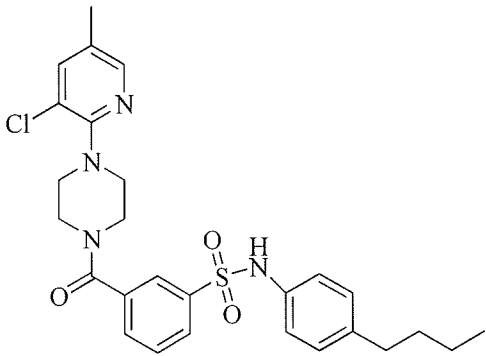
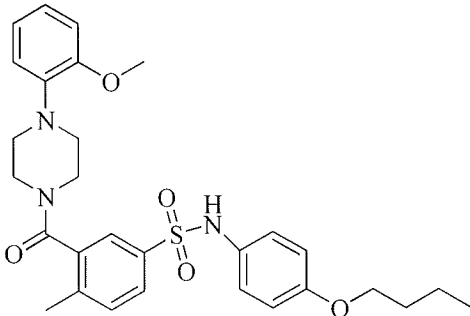
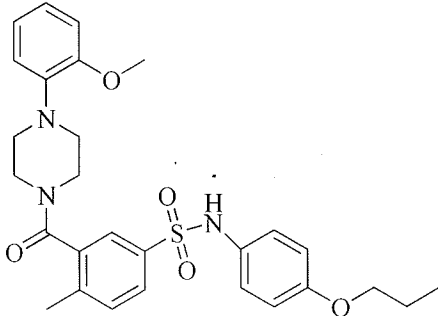
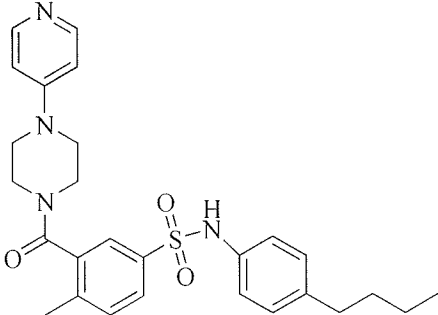
(continuación)

Compuesto	N.º
	55
	56
	57
	58
	59

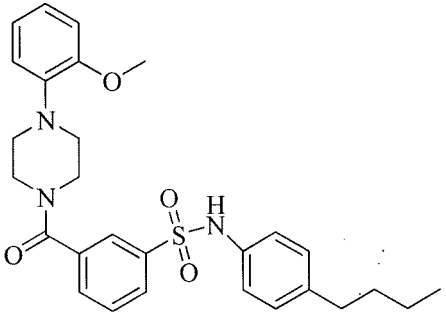
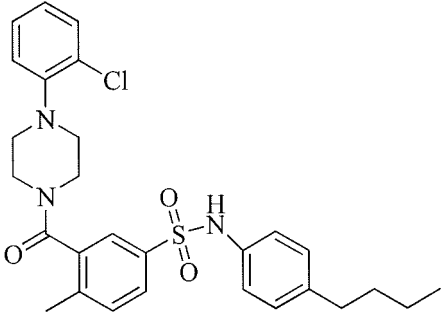
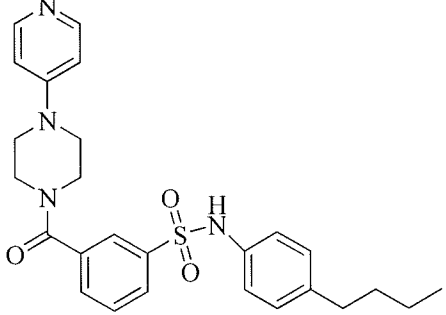
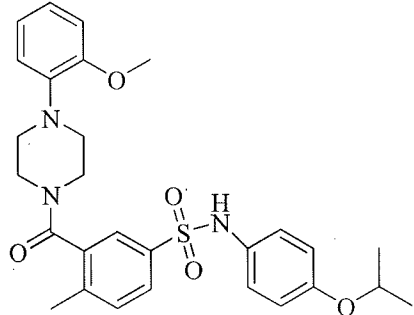
(continuación)

Compuesto	N.º
	60
	61
	62
	63

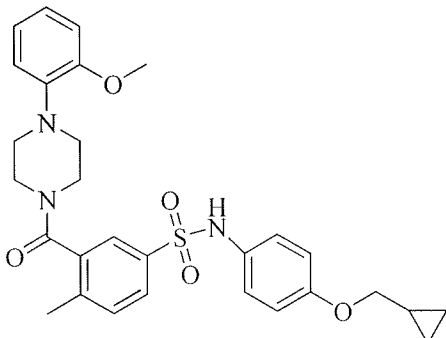
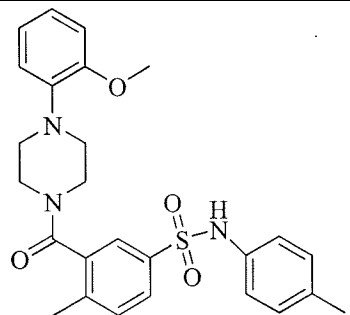
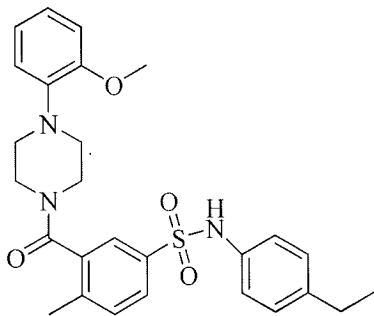
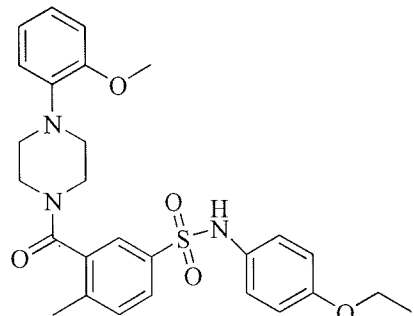
(continuación)

Compuesto	N.º
	64
	65
	66
	67

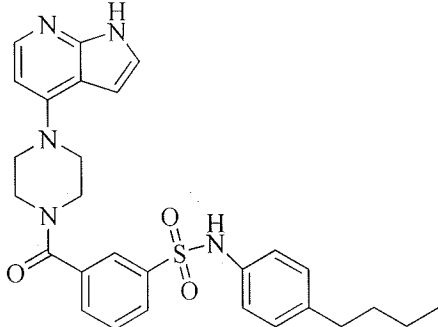
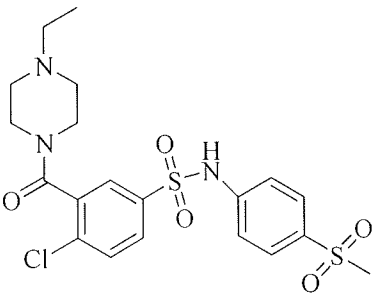
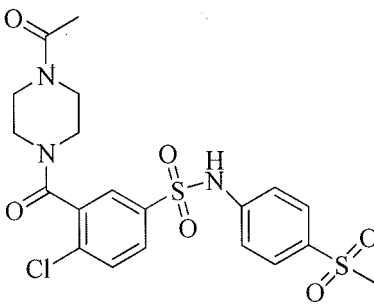
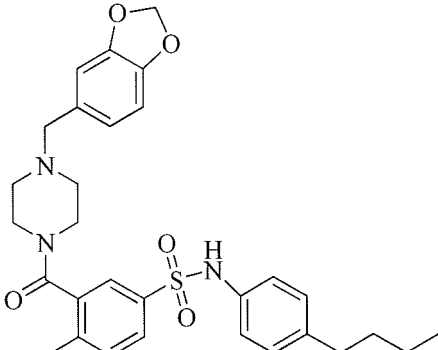
(continuación)

Compuesto	N.º
	68
	69
	70
	71

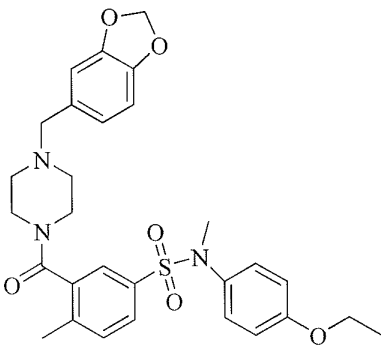
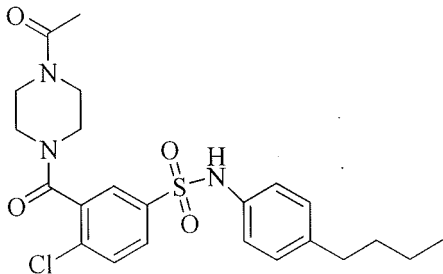
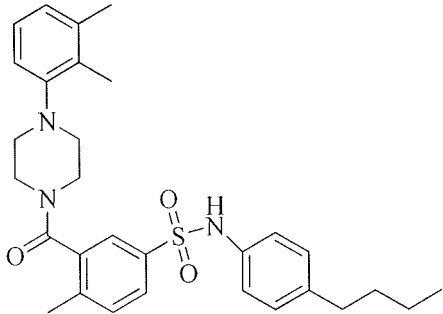
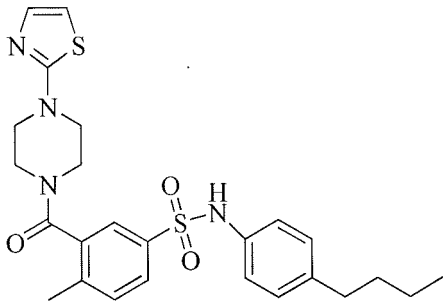
(continuación)

Compuesto	N.º
	72
	73
	74
	75

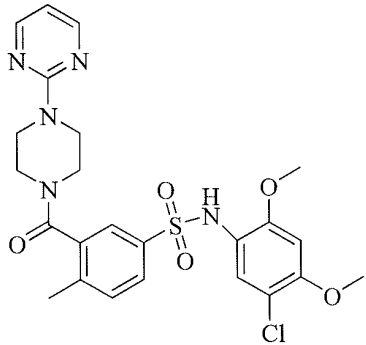
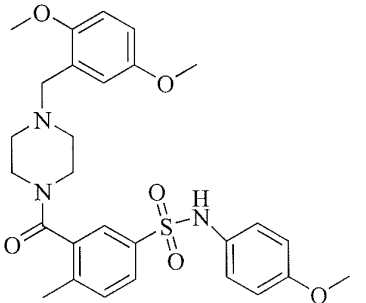
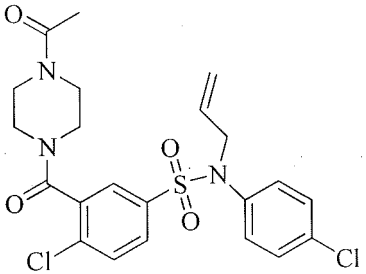
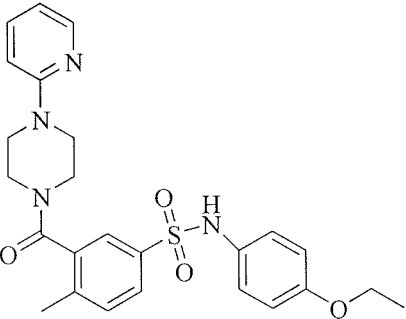
(continuación)

Compuesto	N.º
	76
	77
	78
	79

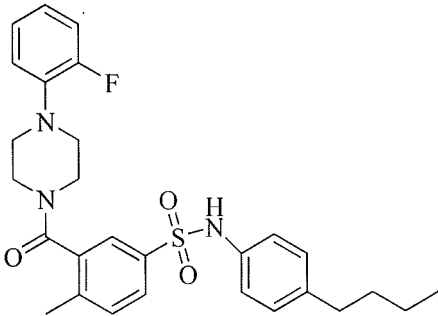
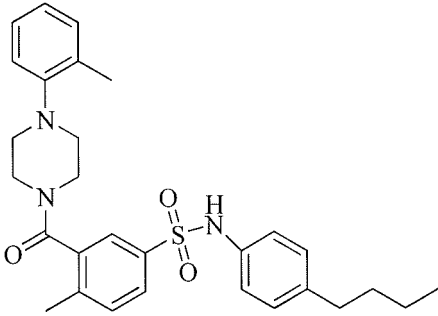
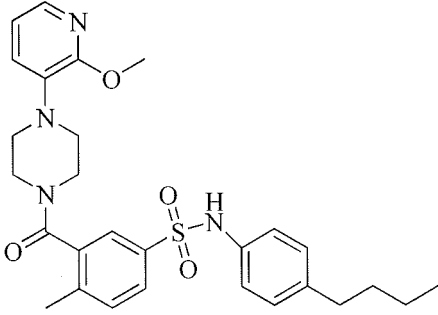
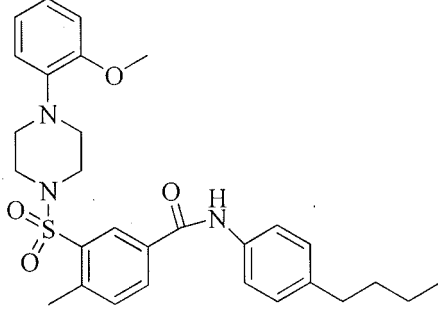
(continuación)

Compuesto	N.º
	80
	81
	82
	83

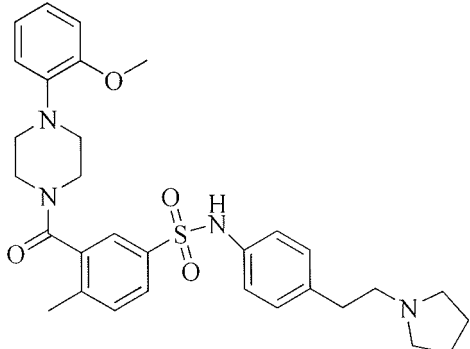
(continuación)

Compuesto	N.º
	84
	85
	86
	87

(continuación)

Compuesto	N.º
	88
	89
	90
	91

(continuación)

Compuesto	N.º
	92

Ejemplo 10. La enzima mutante IDH2-R172K tiene una actividad de catálisis reductora de NADPH elevada en comparación con la enzima IDH2 de tipo silvestre.

- 5 La actividad de reducción de NADPH se midió para las enzimas IDH2-R172K, IDH2-tipo silvestre, IDH1-R132H y IDH1- tipo silvestre. Las concentraciones finales de reactivo para cada reacción fueron las siguientes: Tris 20 mM 7,5, NaCl 150 mM, MnCl₂ 2 mM, 10 % de glicerol, BSA al 0,03 %, enzima (1-120 µg/ml), NADPH 1 mM y αKG 5 mM (alfa cetoglutarato). Las actividades específicas resultantes (µmol/min/mg) se presentan en la gráfica de la FIG. 35. Los resultados indican que el mutante IDH2 tiene una actividad reductora elevada en comparación con el tipo
- 10 silvestre IDH2, a pesar de que tanto las enzimas IDH2 mutantes como las de tipo silvestre fueron capaces de producir 2HG (2-hidroxiglutarato) a niveles saturantes de reactivos αKG y NADPH.

Ejemplo 11: 2-HG se acumula en AML con mutaciones IDH1/2

15 Pacientes y datos clínicos

La sangre periférica y la médula ósea se obtuvieron de pacientes con AML en el momento del diagnóstico y en la recaída, siguiendo el consentimiento informado aprobado por REB. Las células se separaron mediante centrifugación con ficol hypaque, y se almacenaron a -150 °C en DMSO al 10 %, 40 % de FCS y 50 % de medio alfa-MEM. Los sueros de los pacientes se almacenaron a -80 °C. La citogenética y las pruebas moleculares se realizaron en el laboratorio de diagnóstico de la University Health Network (Toronto, Canadá). A un subgrupo de pacientes (n = 132) se le administró un tratamiento inicial consistente con un régimen de quimioterapia de inducción y consolidación estándar que consistía en daunorubicina y citarabina.

25 Genotipado de IDH1 e IDH2

El ADN se extrajo de células leucémicas y líneas celulares usando el kit Qiagen Puregene (Valencia CA). Para un subconjunto de muestras (n = 96), el ARN se extrajo de células leucémicas usando un kit Qiagen RNeasy, y se transcribió de manera inversa en ADNc para la genotipificación de IDH1 e IDH2. Los genotipos IDH1 e IDH2 se

30 determinaron en el Analytical Genetics Technology Centre en la University Health Network (Toronto, Canadá) usando una plataforma Sequenom MassARRAY™ (Sequenom, San Diego, CA). Los resultados positivos se confirmaron mediante secuenciación directa en un analizador genético ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems, Foster City, CA).

35 Líneas celulares

Líneas celulares de AML (OCI/AML-1, OCI/AML-2, OCI/AML-3, OCI/AML-4, OCI/AML-5, HL-60, MV-4-11, THP-1, K562 y KG1A) y células 5637 se obtuvieron en el laboratorio de Mark Minden (Ontario Cancer Institute, Toronto Canadá). Las células primarias de AML se cultivaron en medio alfa-MEM complementado con 20 % de suero bovino fetal y 10 % de medio acondicionado con células 5637 como se describió anteriormente¹³. Las curvas de crecimiento se generaron haciendo recuento de células viables según se evaluó mediante la exclusión de azul de tripano en un contador de células automatizado Vi-CELL (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

45 Expresión/Purificación de proteínas IDH1 e IDH2

El ADNc de IDH1 humano (ref. ID NM_005896) y el ADNc de IDH2 (ref. ID NM_002168) se adquirieron en OriGene Technologies (Rockville, MD). Para expresión en *E. coli*, la región de codificación se amplificó por PCR usando cebadores diseñados para añadir sitios de restricciones NDEI y XHO1 en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los

fragmentos resultantes para IDH1 (longitud completa) e IDH2 (restos 40-452) se clonaron en el vector pET41a (EMD Biosciences, Madison, WI) para habilitar la expresión de *E. coli* de la proteína etiquetada con His8 C-terminal. La mutagénesis dirigida al sitio se realizó en el plásmido pET41a-IDH1 y pET41a-IDH2 usando el kit de mutagénesis dirigida por el sitio del rayo QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA) para cambiar C394 a T en el ADNc de IDH1, dando como resultado la mutación R132C, y para cambiar G515 a A en el ADNc de IDH2, dando como resultado la mutación R172K. Las proteínas IDH1 de tipo silvestre y mutantes se expresaron y purificaron a partir de *E. coli* Rosetta™ (DE3) según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La sobreexpresión de la proteína IDH2 se realizó mediante la cotransfección de los plásmidos de expresión que codifican los clones IDH2 respectivos y pG-KJE8 que expresan proteínas chaperonas.

Ensayos de actividad de IDH1/2

La actividad enzimática se evaluó siguiendo el cambio en la absorbancia de NADPH a 340 nm a lo largo del tiempo en un espectrofotómetro de flujo parado SFM-400 (BioLogic, Knoxville, TN) en presencia de isocitrato y NADP+ (reacción directa), o α -KG y NADPH (reacción inversa). Todas las reacciones se realizaron en un tampón de reacción enzimática convencional (NaCl 150 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM y 0,03 % (p/v) de albúmina de suero bovino). Para la determinación de parámetros cinéticos, se añadió suficiente enzima para dar una reacción lineal durante 1 a 5 segundos. Las constantes de unión enzimáticas se determinaron usando algoritmos de ajuste de curvas para modelos cinéticos estándar con el paquete de software Sigmaplot (Systat Software, San José, CA). Para la determinación de k_{cat} , la enzima se incubó con 5X K_m de sustrato y cofactor; el consumo de NADPH o NADP se determinó por un cambio en la DO_{340} en el tiempo. En ambos casos un coeficiente de extinción de 6200 M⁻¹ cm⁻¹ se usó para NADPH.

Análisis de 2-HG y metabolitos

Los metabolitos se extrajeron de células cultivadas, células leucémicas primarias y sueros usando metanol acuoso al 80 % (-80 °C) como se describió anteriormente. Para extracción celular, las biopsias congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C, y una alícuota de 2 millones de células se centrifugó a 4 °C. El sedimento se resuspendió en metanol al 80 % a -80 °C. Para extracción de suero, 1 ml de suero se descongeló rápidamente y se mezcló con 4 ml de metanol a 80 °C. Todos los extractos se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C para eliminar el precipitado, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por LC-MS. Los niveles de metabolito (2-HG, α -KG, succinato, fumarato y malato) se determinaron mediante LC de fase inversa emparejada con iones acoplada a EM de triple-cuadropolo en modo negativo usando una monitorización de reacción múltiple, y los picos de elución integrados se compararon con las curvas estándar de metabolitos para la cuantificación absoluta como se describe.

Análisis estadístico

El ensayo exacto de Fisher se usó para probar las diferencias en las variables categóricas entre pacientes con mutaciones IDH1/2 wt y IDH1/2. Se usó ANOVA de una vía seguido por un ensayo t de Student con corrección para comparaciones múltiples para probar las diferencias en la actividad de IDH1 y las concentraciones de metabolitos. Las diferencias con $p < 0,05$ se consideraron significativas.

Resultados

Con el fin de investigar el papel de las mutaciones de IDH1 R132 en AML, se genotiparon células leucémicas obtenidas en la presentación inicial, de una serie de 145 pacientes de AML tratados en el Princess Margaret Hospital con el objetivo de identificar muestras mutantes en nuestro banco de tejido celular viable. Se encontraron mutaciones heterocigotas IDH1 R132 en 11 (8 %) de estos pacientes (Tabla 25). El espectro de mutaciones IDH1 observadas en la AML parece diferir del observado en los tumores del SNC. En el SNC, la mayoría de las mutaciones (80-90 %) son sustituciones IDH1 R132H, mientras que 5, 4 y 2 pacientes con mutaciones IDH1 R132H, R132C, y R132G, respectivamente (Tabla 25), se observaron. En cuatro casos, las células leucémicas también estaban disponibles a partir de muestras tomadas en el momento de la recaída. La mutación IDH1 se retuvo en 4/4 de estas muestras (Tabla 25). Uno de los pacientes que tenía una mutación IDH1 había progresado a AML desde un síndrome mielodisplásico (MDS) anterior. Cuando se analizaron las células de la MDS anterior en este paciente, se encontró que IDH1 era de tipo silvestre. Otros 14 pacientes con MDS fueron genotipados, y se encontró que todos los pacientes eran de tipo silvestre para IDH1, lo que sugiere que las mutaciones IDH1 no son una característica común de esta enfermedad. En muestras de un subconjunto de pacientes mutantes con IDH1 ($n = 8$), se usó ARN transcrito de manera inversa para el genotipado a fin de evaluar la expresión relativa de alelos mutantes y de tipo silvestre. El genotipado Sequenom mostró picos de alelos equilibrados para estas muestras, lo que indica que se expresan tanto los genes de tipo silvestre y mutantes. También se genotiparon diez líneas celulares de AML establecidas (OCI/AML-1, OCI/AML-2, OCI/AML-3, OCI/AML-4, OCI/AML-5, HL-60, MV-4-11, THP-1, K562 y KG1A) y ninguna portaba una mutación IDH1 R132. Tabla 25: Identificación de 13 pacientes con AML que tienen una mutación IDH1 R132 o IDH2 R172*

Tabla 25

ID del Paciente	Mutación	Cambio de aminoácido	Subtipo FAB	Estado de NPM1 y FLT3	Perfil citogenético	Genotipo en la recaída	Nivel de 2-HG (ng/2x10 ⁶ células)
Mutaciones 090108 de IDH1							
	G/A	R132H	M4	na	Normal	na	2090
090356	G/A	R132H	na	na	na	na	1529
0034	C/T	R132C	M5a	Normal	Normal	na	10285
0086	C/G	R132G	M2	Normal	Normal	na	10470
0488	C/T	R132C	M0	Normal	Normal	R132C	13822
8587	G/A	R132H	na	Normal	Normal	na	5742
8665	C/T	R132C	M1	na	Normal	na	7217
8741	G/A	R132H	M4	NPM1	Normal	R132H	6419
9544	C/G	R132G	na	na	Normal	R132G	4962
0174268	G/A	R132H	M1	NPM1	Normal	R132H	8464
090148	C/T	R132C	M1	na	46, xx, i(7) (p10) [20]	na	na
mutaciones 9382 de IDH2							
	G/A	R172K	M0	Normal	Normal	na	19247
0831	G/A	R172K	M1	Normal	Normal	na	15877

* NPM1 denota la nucleofosmina 1, y la tirosina quinasa 3 relacionada con FLT FMS. na indica que algunos datos no estaban disponibles para algunos pacientes.

5 Se estableció un ensayo de detección de metabolitos para medir 2-HG en este conjunto de muestras de AML. Los niveles de 2-HG fueron aproximadamente 50 veces más altos en muestras que albergan una mutación IDH1 R132 (Tabla 25, Figura 36A, Tabla 26). 2-HG también se elevó en los sueros de pacientes con AML mutante IDH1 R132 (Figura 36B). No hubo relación entre la sustitución de aminoácidos específica en el resto 132 de IDH1 y el nivel de 2-HG en este grupo de pacientes.

Tabla 26: Concentraciones de metabolitos en células de AML mutantes IDH1/2 individuales y de tipo silvestre*

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

(continuación)

Muestra	Genotipo de IDH1/2	2-HG (ng/ 2x10 ⁶ células)	α-KG (ng/ 2x10 ⁶ células)	Malate (ng/ 2x10 ⁶ células)	Fumarato (ng/ 2x10 ⁶ células)	Succinato (ng/ 2x10 ⁶ células)
9382	R172K	19247	790	821	766	5481
0831	R172K	15877	350	721	708	5144
157	Tipo silvestre	212	121	484	437	3057
202	Tipo silvestre	121	57	161	136	1443
205	Tipo silvestre	147	39	162	153	1011
209	Tipo silvestre	124	111	167	168	1610
239	Tipo silvestre	112	106	305	361	1436
277	Tipo silvestre	157	61	257	257	2029
291	Tipo silvestre	113	118	124	128	1240
313	Tipo silvestre	116	75	151	181	1541
090158	Tipo silvestre	411	217	658	647	3202
090156	Tipo silvestre	407	500	1276	1275	6091

* IDH1/2 denota isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, 2-HG 2-hidroxi glutarato y α-KG alfa-cetoglutarato.

Las mediciones de metabolitos no estaban disponibles para todos los pacientes.

† no se realizaron mediciones metabólicas debido a la muestra limitada del paciente

‡ indica muestras obtenidas en la recaída.

5

Dos muestras que albergan IDH1 de tipo silvestre también mostraron altos niveles de 2-HG (Tabla 25). La alta concentración de 2-HG provocó la secuenciación del gen IDH2 en estas dos muestras de AML, que estableció la presencia de mutaciones IDH2 R172K en ambas muestras (Tabla 25).

10 La evaluación de las características clínicas de los pacientes con o sin mutaciones IDH1/2 reveló una correlación significativa entre las mutaciones IDH1/2 y el cariotipo normal ($p = 0,05$), pero no hubo otras diferencias entre estos dos grupos (Tabla 27). Notablemente, no hubo diferencias en la respuesta al tratamiento para un subgrupo de pacientes que recibieron un tratamiento consistente ($n = 136$). Estos hallazgos son coherentes con el informe inicial que identifica las mutaciones IDH1 en la AML.

15

Tabla 27: Características de los pacientes mutantes IDH1/2 y de tipo silvestre*

Variable	IDH1/2 Tipo silvestre (N = 132)	IDH1/2 Mutante (N = 13)	Valor P
Edad (años)	58,8 ±16,2	52,6 ±7,0	0,17†
Sexo (% masculino)	53 (70/132)	62 (8/13)	0,77‡
WBC en el diagnóstico (10 ⁹ células/l)	40,7 ±50,6	28,7 ±34,1	0,38†
Respuesta al tratamiento inicial (% remisión completa)	70 (85/122)	62 (8/13)	0,54‡
Perfil citogenético (% normal)	62 (72/117)	92 (11/12)	0,05 ‡
Mutaciones adicionales			
FLT3 (%)	17 (8/47)	0 (0/8)	0,58‡
NPM1 (%)	30 (14/47)	25 (2/8)	1,0‡

* Para valores más-menos, el valor indica la media y ± indica la desviación estándar. IDH1/2 denota isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, WBC recuento de glóbulos blancos, FLT3 tirosina quinasa 3 relacionada con FMS, y nucleofosmina 1 de NPM1.

† El valor P se calculó usando el ensayo t de Student.

‡ El valor P se calculó usando el ensayo exacto de Fisher.

Se cultivaron paneles de células de AML de pacientes de tipo silvestre y mutantes IDH1 *in vitro*. No hubo diferencia en las tasas de crecimiento o la viabilidad de las células mutantes IDH1 R132 y de tipo silvestre, con ambos grupos mostrando una gran variabilidad en su capacidad para proliferar en el cultivo, como es característico de las células de AML primarias (Figura 36C). No hubo relación entre los niveles de 2-HG en las células mutantes IDH1 R132 y su tasa de crecimiento o viabilidad en el cultivo. Después de 14 días en cultivo, las células AML mutantes retuvieron sus mutaciones IDH1 R132 (11/11), y continuaron acumulando altos niveles de 2-HG (Figura 36A), confirmando además que las mutaciones IDH1 R132 conducen a la producción y acumulación de 2-HG en las células de AML.

Para investigar el efecto de las mutaciones IDH1/2 en la concentración de metabolitos celulares proximales a la reacción IDH, α -KG, succinato, se midieron los niveles de malato y fumarato en células de AML con mutaciones IDH1/2 y en un conjunto de células de AML de tipo silvestre emparejadas para el subtipo de AML y el perfil citogenético. No se encontró que ninguno de los metabolitos estuviera muy alterado en los mutantes IDH1 en comparación con las células de tipo silvestre IDH1 (Figura 27, Tabla complementaria 26). El nivel medio de α -KG no se alteró en las células de AML mutantes IDH1/2, sugiriendo que la mutación no disminuye la concentración de este metabolito como se ha planteado anteriormente como hipótesis. Para confirmar que la mutación R132C de IDH1 y la mutación R172K de IDH2 confieren una nueva actividad enzimática que produce 2-HG, las enzimas mutantes recombinantes se analizaron para determinar la reducción dependiente de NADPH de α -KG. Cuando las muestras se analizaron mediante LC-MS al finalizar el ensayo enzimático, 2-HG se identificó como el producto final para las enzimas mutantes IDH1 R132C e IDH2 R172K (Figura 38). No se detectó isocitrato por LC-MS, indicando que 2-HG es el único producto de esta reacción (Figura 38). Esta observación se mantuvo vigente incluso cuando la reacción reductora se realizó en un tampón que contenía NaHCO_3 saturado con CO_2 .

Una gran proporción de pacientes mutantes con IDH1 en AML tienen una mutación IDH1 R132C (Tabla 25). Para caracterizar bioquímicamente el mutante IDH1 R132C, se evaluaron las propiedades enzimáticas de la proteína R132C recombinante *in vitro*. Los análisis cinéticos mostraron que la sustitución de R132C deteriora gravemente la descarboxilación oxidativa de isocitrato a α -KG, con una disminución significativa en k_{cat} , aunque la afinidad por el cofactor NADP^+ permanece esencialmente sin cambios (Tabla 28).

Sin embargo, a diferencia de la enzima mutante R132H descrita anteriormente la mutación R132C conduce a una pérdida dramática de afinidad por el isocitrato (K_M), y una caída de la eficacia del metabolismo de isocitrato neto (k_{cat}/K_M) de más de seis órdenes de magnitud (Tabla 28). Esto sugiere una diferencia potencial de la regulación a nivel de sustrato de la actividad enzimática en el contexto de AML. Mientras que la sustitución de cisteína en R132 desactiva la conversión canónica de isocitrato a α -KG, la enzima mutante IDH1 R132C adquiere la capacidad de catalizar la reducción de α -KG a 2-HG de una manera dependiente de NADPH (Figura 39). Esta reacción reductora del mutante IDH1 R132C es altamente eficaz (k_{cat}/K_M) en comparación con la enzima de tipo silvestre, debido al considerable aumento de la afinidad de unión de los sustratos tanto de NADPH como de α -KG (K_M) (Tabla 28).

Tabla 28: Parámetros cinéticos de la enzima mutante IDH1 R132C

Oxidante ($\rightarrow \text{NADPH}$)	WT	R132C
K_{M,NADP^+} (mM) M,	49	21
isocitrato (mM) K_{M,MgCl_2}	57	$8,7 \times 10^4$ $4,5 \times 10^2$
(mM)	29	61
$K_i, \alpha \text{ KG}$ (mM)	$6,1 \times 10^2$	$7,1 \times 10^2$
k_{cat} (s^{-1})	$1,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^3$
$k_{\text{cat}}/K_{M,\text{isoc}}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$2,3 \times 10^9$	
Reductor ($\rightarrow \text{NADP}^+$)	WT	R132C
$K_{M,\text{NADPH}}$ (μM)	n/a*	0,3
$K_{i,\alpha \text{ KG}}$ (μM)	n/a	295
k_{cat} (s^{-1})	~ 7 (est.)	$5,5 \times 10^2$
* n/a indica que no hay actividad medible		

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar un sujeto por la presencia o susceptibilidad a un cáncer, comprendiendo el método analizar dicho sujeto para niveles elevados de 2-hidroxiglutarato (2HG); en donde los niveles elevados de 2HG en el
5 sujeto indican que el sujeto tiene, o es susceptible de tener, un cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por una mutación de la proteína IDH-1 o IDH-2 que tiene neoactividad 2HG, en donde dicha neoactividad 2HG es la capacidad de convertir alfa cetoglutarato en 2HG.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el cáncer se caracteriza por (i) una proteína IDH-1 que tiene una
10 mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro y Leu en el resto de aminoácido 132 de la proteína; o (ii) una proteína IDH-2 que tiene una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en una Lys, Gly, Met, Trp, Thr, y Ser en el resto de aminoácido 172 de la proteína.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en un tumor
15 astrocítico, un tumor oligodendrogial, un tumor oligoastrocítico, un astrocitoma anaplásico, fibrosarcoma, paraganglioma, cáncer de próstata, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, y un glioma.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el cancer es AML.
5. El método de la reivindicación 1, en donde una muestra de tejido o fluida corporal del sujeto se analiza para
20 determinar el nivel de 2HG elevado.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra es una muestra de sangre.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de 2HG en la muestra se compara con un nivel de referencia
25 de una célula no enferma.
8. El método de la reivindicación 5, en donde el nivel de 2HG en la muestra se mide por LC-MS.
9. El método de la reivindicación 3, en donde el cancer es glioma.
10. El método de la reivindicación 1, en donde los niveles de 2HG en el sujeto se determinan por espectroscopía.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la muestra se analiza adicionalmente para
35 detectar una proteína IDH1 mutante en donde la mutación se selecciona entre el grupo que consiste en His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro y Leu, en el resto de aminoácido 132 de la proteína y dicha proteína mutante tiene neoactividad 2HG.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la muestra se analiza adicionalmente para
40 detectar una proteína IDH2 mutante en donde la mutación se selecciona entre el grupo que consiste en Lys, Gly, Met, Trp, Thr, y Ser en el resto de aminoácido 172 de la proteína y dicha proteína mutante tiene neoactividad 2HG.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la muestra se analiza adicionalmente
45 mediante secuenciación de ácido nucleico para la presencia de un ácido nucleico que codifica una proteína IDH1 mutante que tiene una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en His, Ser, Cys, Gly, Val, Pro y Leu, en el resto de aminoácido 132 de la proteína y dicha proteína mutante tiene neoactividad 2HG.
14. El método de la reivindicación 13, en donde el ácido nucleico contiene una mutación seleccionada entre el grupo
50 que consiste en C394A, C394G, C394T, G395C, G395T y G395A.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la muestra se analiza adicionalmente
55 mediante secuenciación de ácidos nucleicos para la presencia de un ácido nucleico que codifica una proteína mutante IDH2 que tiene una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en Lys, Gly, Met, Trp, Thr, y Ser en el resto de aminoácido 172 de la proteína y dicha proteína mutante tiene neoactividad 2HG.
16. El método de la reivindicación 9, en donde la presencia o nivel de 2HG se analiza por espectroscopía de
resonancia magnética (MRS).
17. El método de la reivindicación 16, en donde la presencia o nivel de 2 HG se indica mediante una señal a
60 aproximadamente 2,5 ppm.

	(55)	55	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	164
IDH1 (CDS)	(1)	ATGTCCAAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGGTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTTCCCTACGTGGAATT											
pET41aIDH1	(55)	ATGTCCAAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGGTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTTCCCTACGTGGAATT											
Consenso	(55)	ATGTCCAAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGGTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTTCCCTACGTGGAATT											
	(163)	163	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	272
IDH1 (CDS)	(109)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCGTGATGCCAACGACCAAGTCACCAAGGATGCTGCAGAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
pET41aIDH1	(163)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCGTGATGCCAACGACCAAGTCACCAAGGATGCTGCAGAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
Consenso	(163)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCGTGATGCCAACGACCAAGTCACCAAGGATGCTGCAGAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
	(271)	271	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380
IDH1 (CDS)	(217)	TGTGCCACTATCACTCCTGATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAATCACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
pET41aIDH1	(271)	TGTGCCACTATCACTCCTGATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAATCACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
Consenso	(271)	TGTGCCACTATCACTCCTGATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAATCACCAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
	(379)	379	390	400	410	420	430	440	450	460	470	488	
IDH1 (CDS)	(325)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAATGATTTTGT											
pET41aIDH1	(379)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAATGATTTTGT											
Consenso	(379)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGTGGATGGGTAAAACCTATCATCATAGGTCGTGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAATGATTTTGT											
	(487)	487	500	510	520	530	540	550	560	570	580	596	
IDH1 (CDS)	(433)	GTTGTCTCTGGGCTGGAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAAATTTGAAGAGGTGGTGGTGTGCCATGGG											
pET41aIDH1	(487)	GTTGTCTCTGGGCTGGAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAAATTTGAAGAGGTGGTGGTGTGCCATGGG											
Consenso	(487)	GTTGTCTCTGGGCTGGAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAAATTTGAAGAGGTGGTGGTGTGCCATGGG											
	(595)	595	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	704
IDH1 (CDS)	(541)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCCTTTGTATCTGAGCACCACCAACATATTCTGAA											
pET41aIDH1	(595)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCCTTTGTATCTGAGCACCACCAACATATTCTGAA											
Consenso	(595)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCCTTTGTATCTGAGCACCACCAACATATTCTGAA											
	(703)	703	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	812
IDH1 (CDS)	(649)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTAAAGACATCTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
pET41aIDH1	(703)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTAAAGACATCTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
Consenso	(703)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTAAAGACATCTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
	(811)	811	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920
IDH1 (CDS)	(757)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTACATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGACGTGCGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
pET41aIDH1	(811)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTACATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGACGTGCGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
Consenso	(811)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTACATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGACGTGCGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
	(919)	919	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1028	
IDH1 (CDS)	(865)	GGCATGATGACCAAGCGTGTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAACCCGTCACACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
pET41aIDH1	(919)	GGCATGATGACCAAGCGTGTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAACCCGTCACACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
Consenso	(919)	GGCATGATGACCAAGCGTGTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAACCCGTCACACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
	(1027)	1027	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1136	
IDH1 (CDS)	(973)	ACGTCCACCAATCCCATTTGCTTCCATTTTGCCTGGACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCTTCTTTGCAAAATGCTTTGGAAGA											
pET41aIDH1	(1027)	ACGTCCACCAATCCCATTTGCTTCCATTTTGCCTGGACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCTTCTTTGCAAAATGCTTTGGAAGA											
Consenso	(1027)	ACGTCCACCAATCCCATTTGCTTCCATTTTGCCTGGACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCTTCTTTGCAAAATGCTTTGGAAGA											
	(1135)	1135	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1244
IDH1 (CDS)	(1081)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTTGAGTT											
pET41aIDH1	(1135)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTTGAGTT											
Consenso	(1135)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTTGAGTT											
	(1242)	1242	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1351
IDH1 (CDS)	(1188)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAACCTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAAACTTTAA-----											
pET41aIDH1	(1242)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAACCTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAAACTTTCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCACCAATGATTAATACCTAGGCTG											
Consenso	(1242)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAACCTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAAACTTT A											

Fig. 1

	(55)	55	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	164
IDH1 (CDS)	(1)	ATGTCACAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGCTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTCCTTACGTGGAATT											
pET41aIDH1	(55)	ATGTCACAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGCTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTCCTTACGTGGAATT											
Consenso	(55)	ATGTCACAAAAATCAGTGGCGGTTCTGTGCTAGAGATGCAAGGAGATGAAATGACACGAATCATTTGGGAATTGATTAAAGAGAAATCATTTCCTTACGTGGAATT											
	(163)	163	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	272
IDH1 (CDS)	(109)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCTGTATGCCACCAACGACCAAGTACCAAGGATGCTGCAGAAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
pET41aIDH1	(163)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCTGTATGCCACCAACGACCAAGTACCAAGGATGCTGCAGAAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
Consenso	(163)	TTGGATCTACATAGCTATGATTTAGGCATAGAGAATCTGTATGCCACCAACGACCAAGTACCAAGGATGCTGCAGAAGCTATAAAGAGCAATAATGTTGGCGTCAAATG											
	(271)	271	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380
IDH1 (CDS)	(217)	TGTGCCACTATCACTCCTGTATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAAATACCAAAATGGCACCATACGAAATATCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
pET41aIDH1	(271)	TGTGCCACTATCACTCCTGTATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAAATACCAAAATGGCACCATACGAAATATCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
Consenso	(271)	TGTGCCACTATCACTCCTGTATGAGAAGAGGGTTGAGGAGTTCAAGTTGAAACAAATGTGGAAATACCAAAATGGCACCATACGAAATATCTGGGTGGCAGCGTCTTCAG											
	(379)	379	390	400	410	420	430	440	450	460	470	488	
IDH1 (CDS)	(325)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGATGGATGGGTAAACCTATCATCATAGCTTCGTCATGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAACTGATTTTGT											
pET41aIDH1	(379)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGATGGATGGGTAAACCTATCATCATAGCTTCGTCATGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAACTGATTTTGT											
Consenso	(379)	AGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGATGGATGGGTAAACCTATCATCATAGCTTCGTCATGCTTATGGGGATCAATACAGAGCAACTGATTTTGT											
	(487)	487	500	510	520	530	540	550	560	570	580	596	
IDH1 (CDS)	(433)	GTTGTTCTCTGGGCGCTGAAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAACTTTGAAGAAGTGGTGGTGTGCCATGGG											
pET41aIDH1	(487)	GTTGTTCTCTGGGCGCTGAAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAACTTTGAAGAAGTGGTGGTGTGCCATGGG											
Consenso	(487)	GTTGTTCTCTGGGCGCTGAAAAAGTAGAGATAACCTACACACCAAGTGACGGAACCCAAAAGGTGACATACCTGGTACATAACTTTGAAGAAGTGGTGGTGTGCCATGGG											
	(595)	595	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	704
IDH1 (CDS)	(541)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGCACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCTTTTGTATCTGAGCACCACCAAACTATCTCTGAA											
pET41aIDH1	(595)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGCACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCTTTTGTATCTGAGCACCACCAAACTATCTCTGAA											
Consenso	(595)	GGGATGTATAATCAAGATAAGTCAATTGAAGATTTTGCACACAGTTCCTTCCAAATGGCTCTGTCTAAGGGTTGGCTTTTGTATCTGAGCACCACCAAACTATCTCTGAA											
	(703)	703	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	812
IDH1 (CDS)	(649)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTTAAAGACATCTTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
pET41aIDH1	(703)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTTAAAGACATCTTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
Consenso	(703)	AAGAAATATGATGGGCGTTTTTAAAGACATCTTTTCAGGAGATATATGACAAGCAGTACAGTCCAGTTTGAAGCTCAAAAGATCTGGTATGAGCATAGGCTCATCGACGA											
	(811)	811	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920
IDH1 (CDS)	(757)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTCATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGCAGTCGGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
pET41aIDH1	(811)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTCATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGCAGTCGGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
Consenso	(811)	GACATGGTGGCCCAAGCTATGAAATCAGAGGGAGGCTTCATCTGGGCTGTAAAACTATGATGGTGACGTGCAGTCGGACTCTGTGGCCCAAGGGTATGGCTCTCTCGG											
	(919)	919	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1028	
IDH1 (CDS)	(865)	GGCATGATGACACGCTGCTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAAACCCGCTACTACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
pET41aIDH1	(919)	GGCATGATGACACGCTGCTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAAACCCGCTACTACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
Consenso	(919)	GGCATGATGACACGCTGCTGGTTTGTCCAGATGGCAAGACAGTAGAAGCAGAGGCTGCCACGGGACTGTAAACCCGCTACTACCGCATGTACAGAAAGGACAGGAGAC											
	(1027)	1027	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1136	
IDH1 (CDS)	(973)	ACGTCCACCAATCCCAATTGCTTCCATTTTTCCTGGACACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCCTTCTTGCATATGCTTTGGAAGA											
pET41aIDH1	(1027)	ACGTCCACCAATCCCAATTGCTTCCATTTTTCCTGGACACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCCTTCTTGCATATGCTTTGGAAGA											
Consenso	(1027)	ACGTCCACCAATCCCAATTGCTTCCATTTTTCCTGGACACAGAGGGTTAGCCACAGAGCAAAAGCTTGATAACAATAAAGAGCTTGCCCTTCTTGCATATGCTTTGGAAGA											
	(1135)	1135	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1244
IDH1 (CDS)	(1081)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTGAGTT											
pET41aIDH1	(1135)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTGAGTT											
Consenso	(1135)	GAAGTCTCTATTGAGACAATTGAGGCTGGCTTCATGACCAAGGACTTGGCTGCTTGCAATTAAGGTTTACCAATGTGCAACGTTCTGACTACTTGAATACATTGAGTT											
	(1242)	1242	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1351
IDH1 (CDS)	(1188)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAATTTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAACTTTAA-----											
pET41aIDH1	(1242)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAATTTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAACTTTAA-----											
Consenso	(1242)	GTTTCATGGATAAACTTGGAGAAAATTTGAAGATCAAACTAGCTCAGGCCAACTTTAA-----											

la mutación G395A da Arg132 > His
la mutación G395A da Arg132 > Ser

Fig. 2

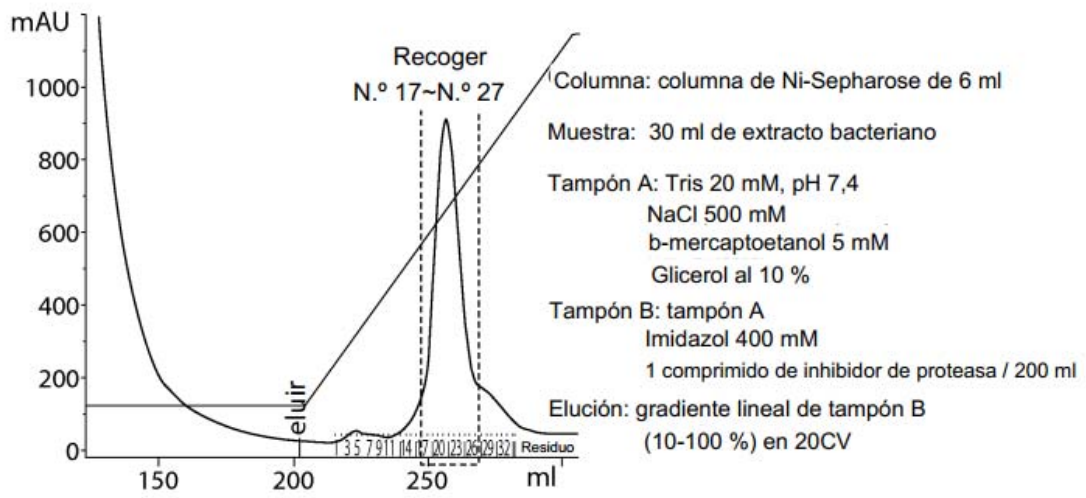


Fig. 3

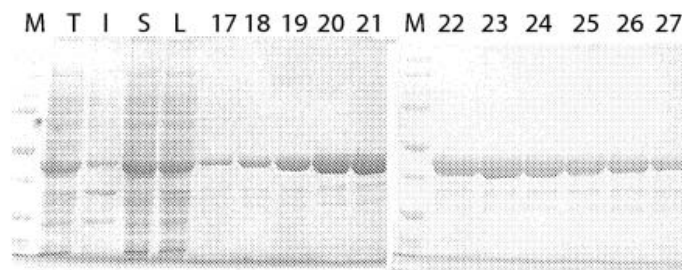


Fig. 4

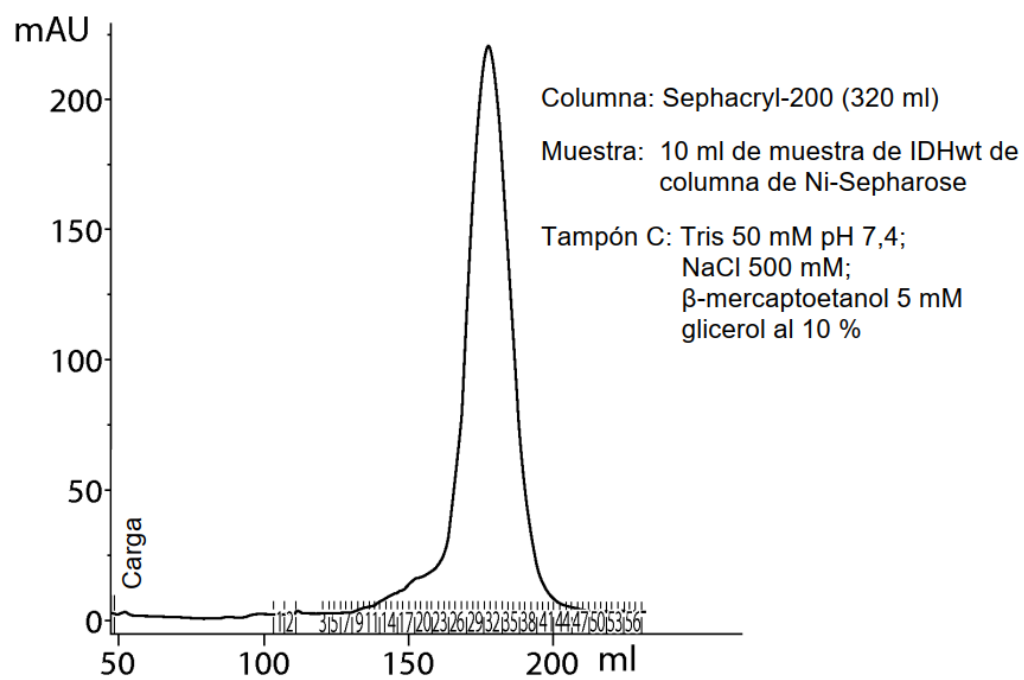


Fig. 5A

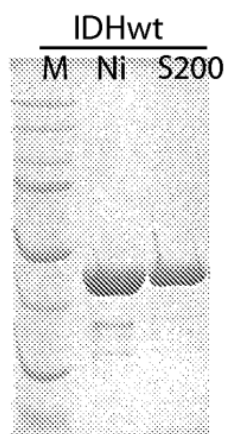


Fig. 5B

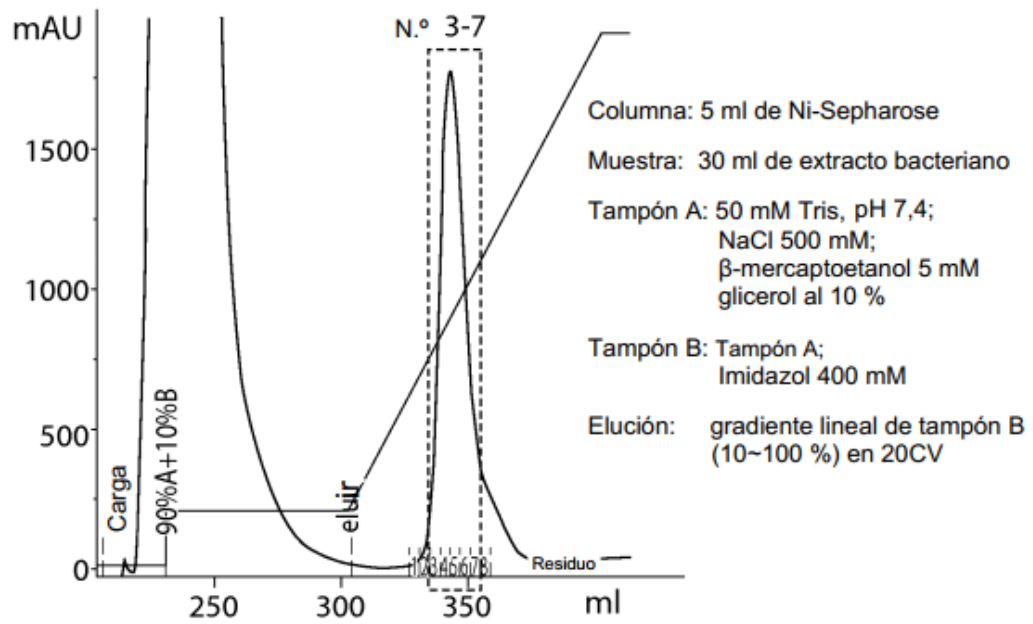


Fig. 6

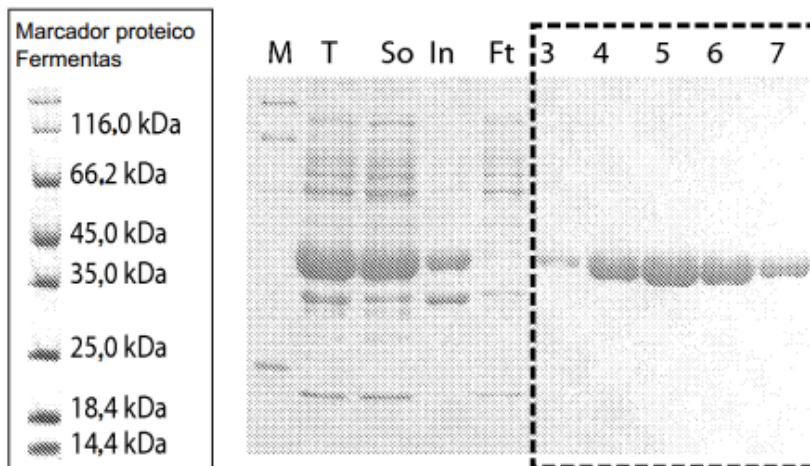


Fig. 7

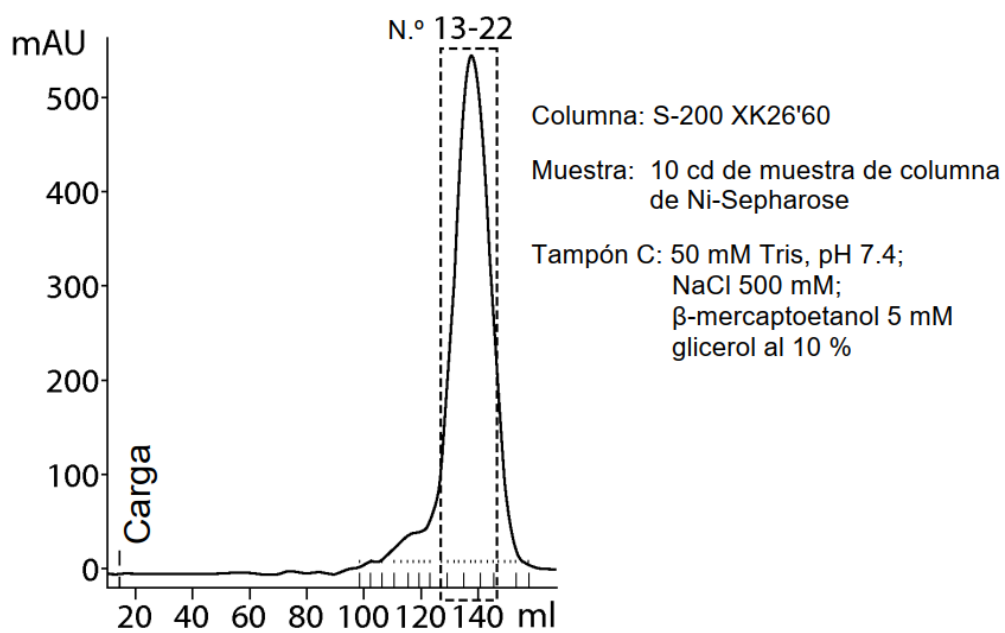


Fig. 8A

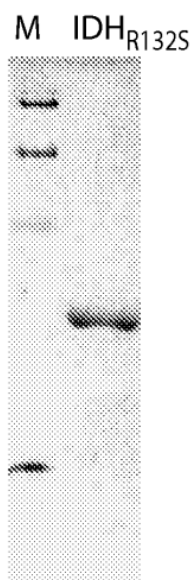


Fig. 8B

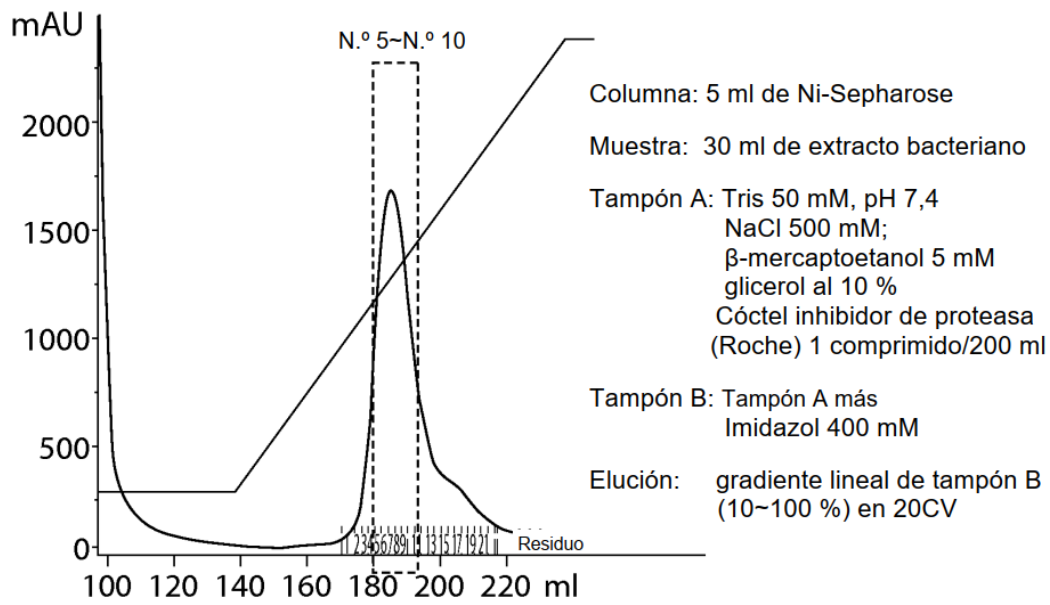


Fig. 9

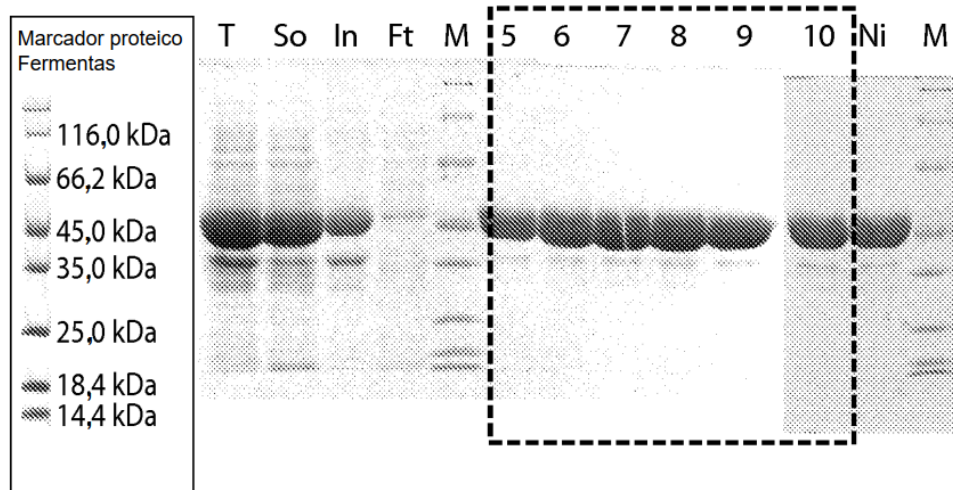


Fig. 10

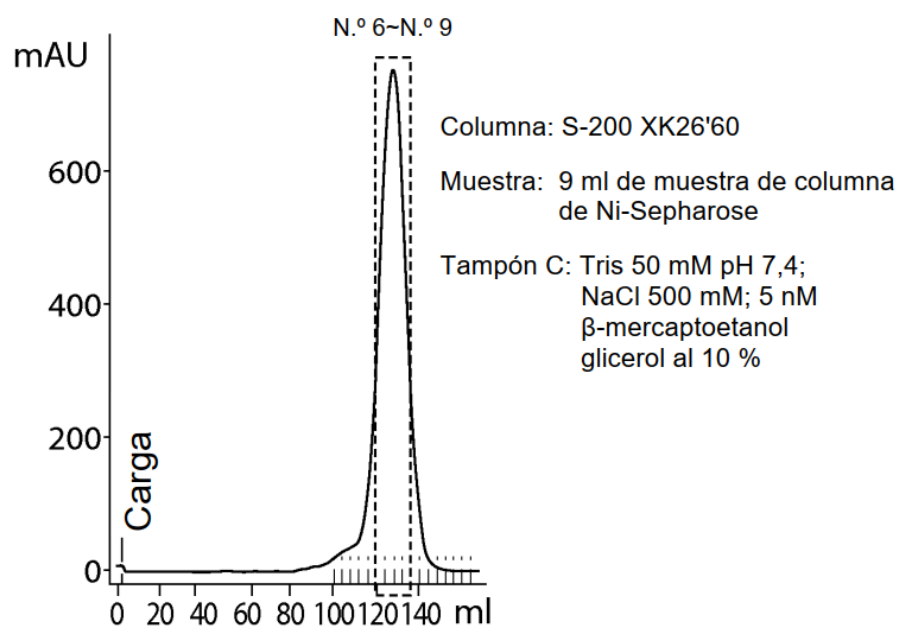


Fig. 11A

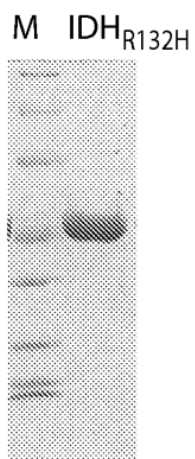


Fig. 11B

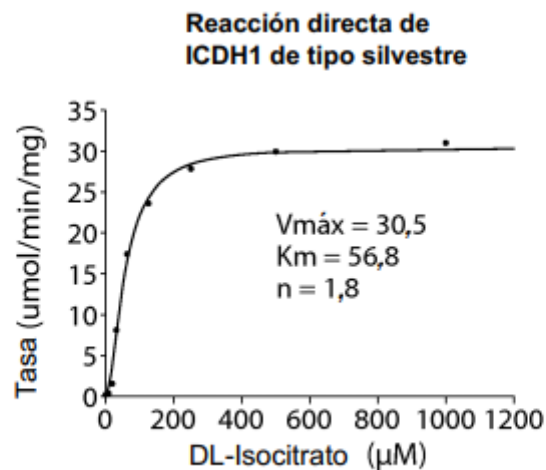


Fig. 12A

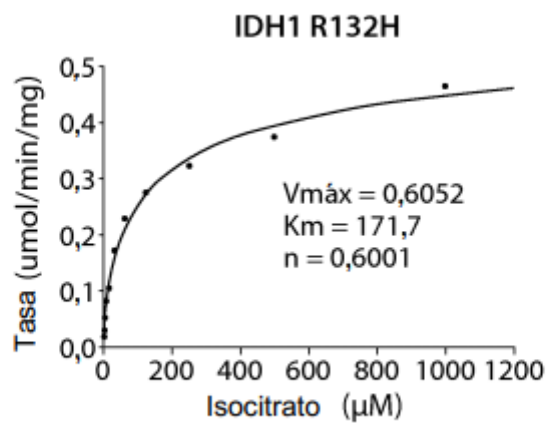


Fig. 12B

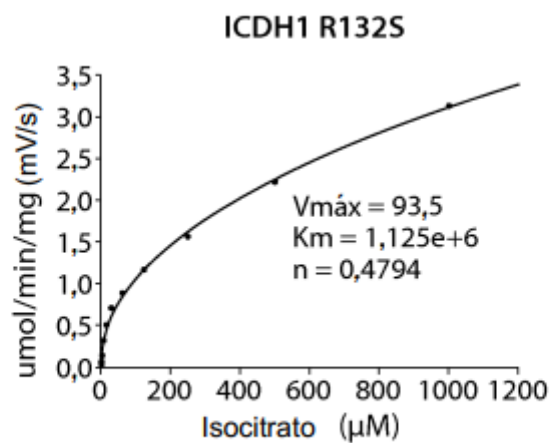


Fig. 12C

Inhibición de α -KG de ICDH1 wt

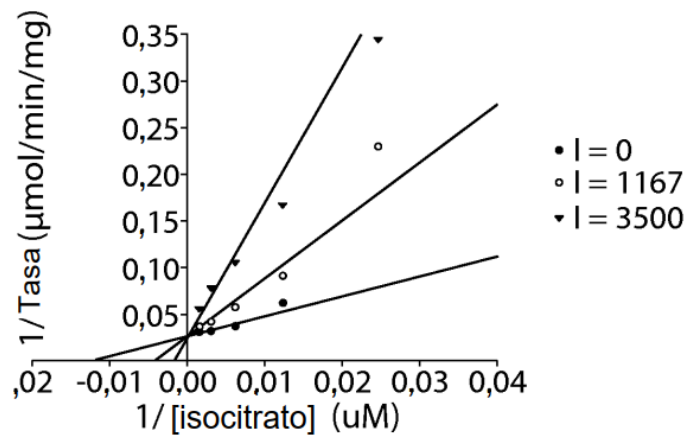


Fig. 13A

Inhibición de α -KG de ICDH1 R132H

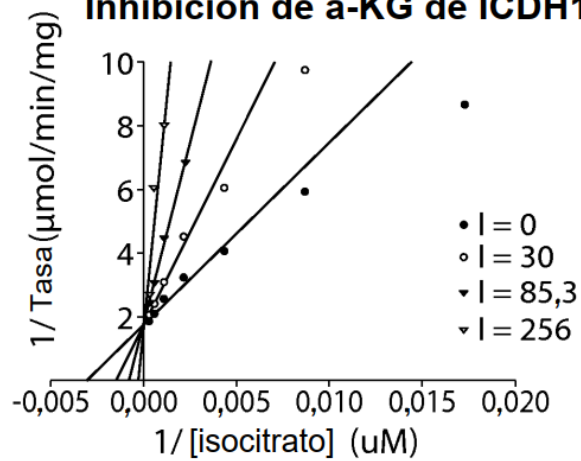


Fig. 13B

Inhibición de α -KG de ICDH1 R132S

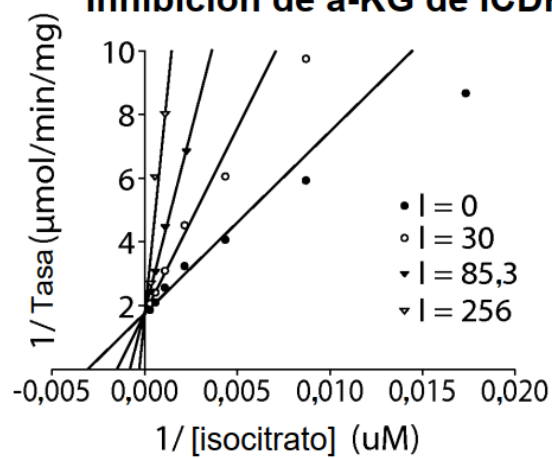


Fig. 13C

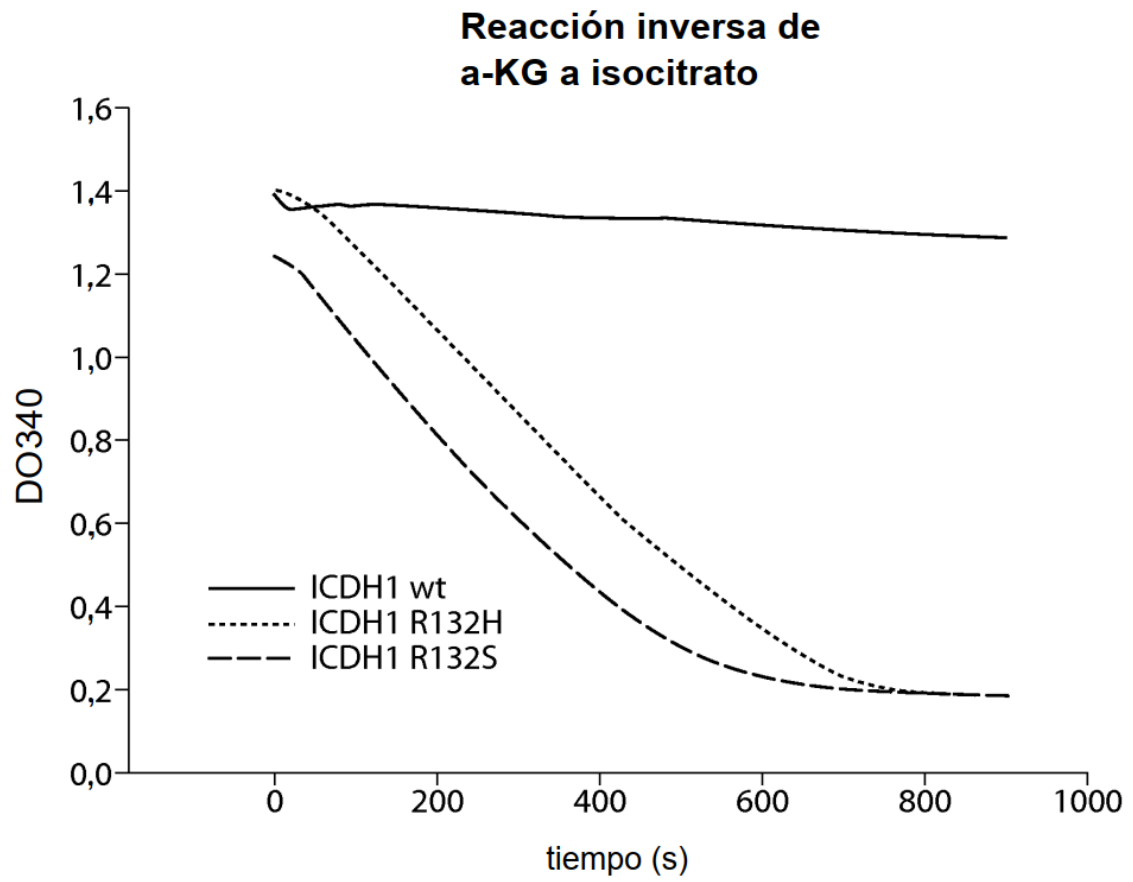


Fig. 14

**Reacción inversa
de ICDH R132H**

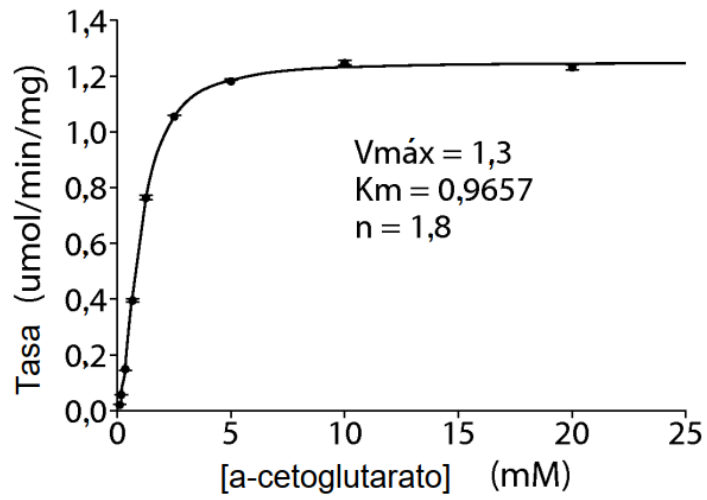


Fig. 15A

ICDH R132S

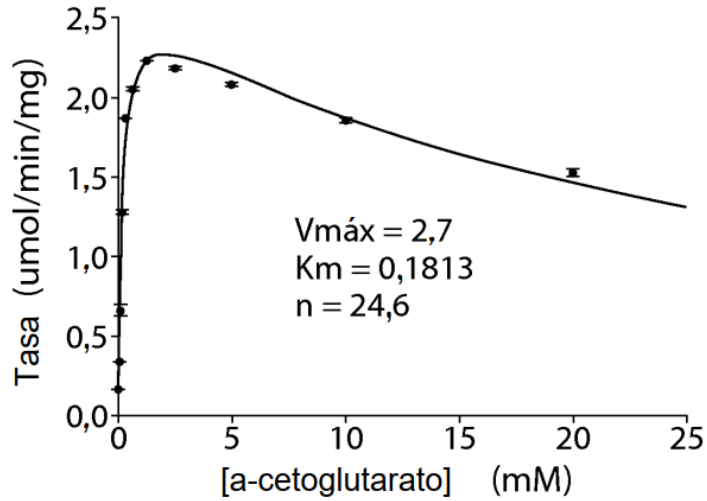


Fig. 15B

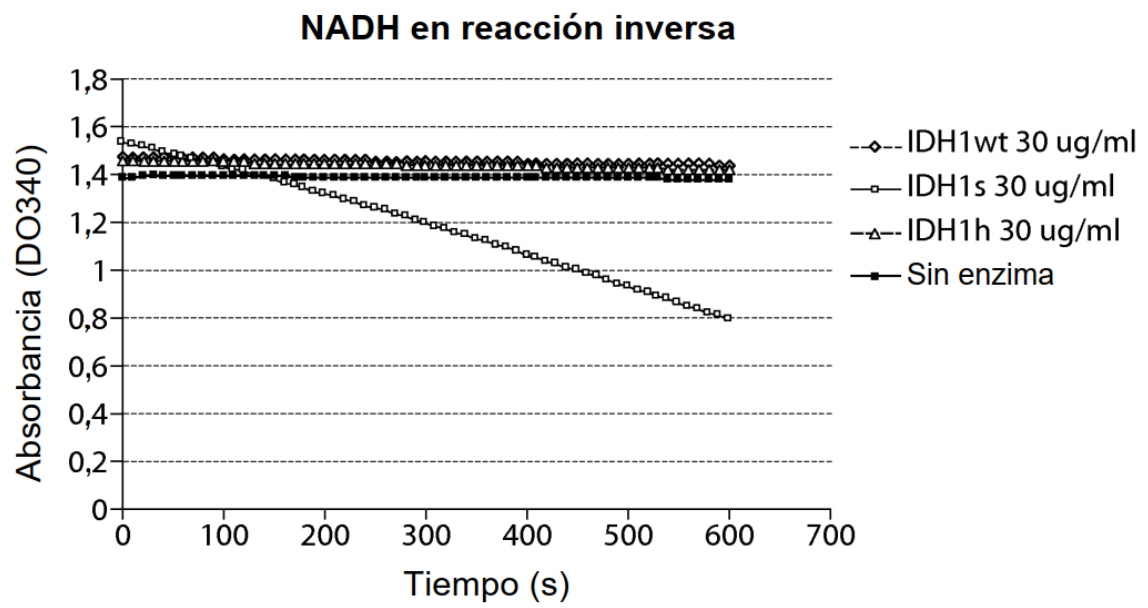


Fig. 16

Inhibición con Oxalomalato de ICDH1 wt

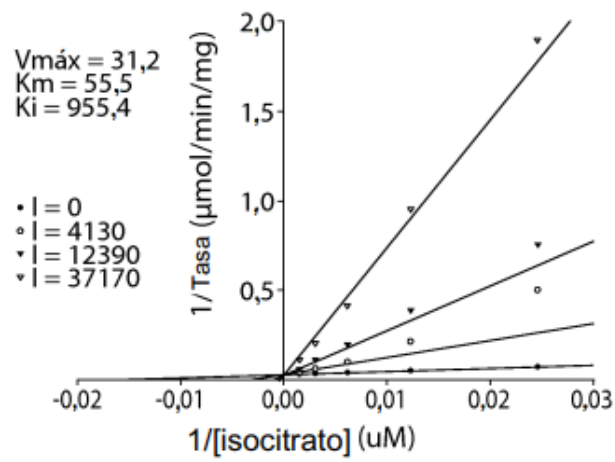


Fig. 17A

Inhibición con Oxalomalato de ICDH R132H

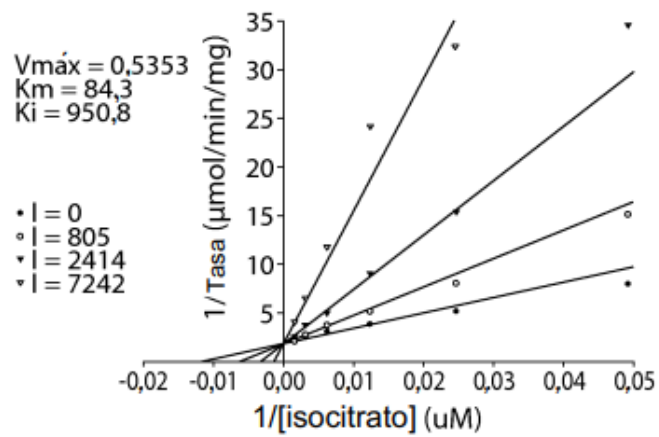


Fig. 17B

Inhibición de Oxalomalato de ICDH R132S

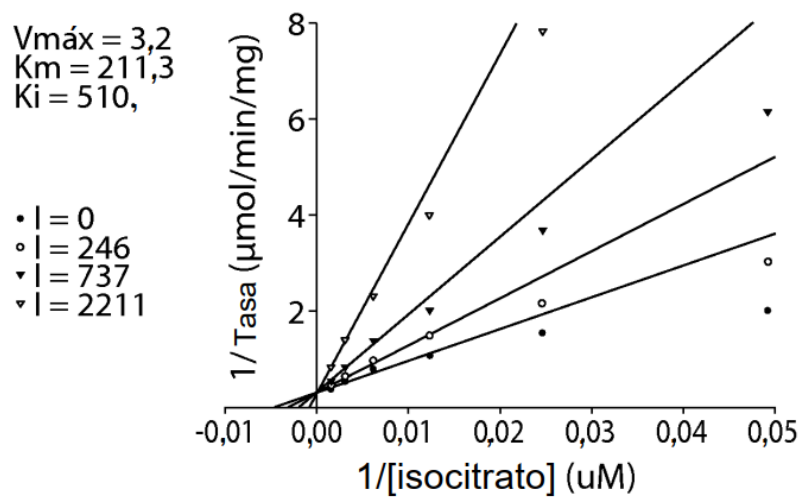
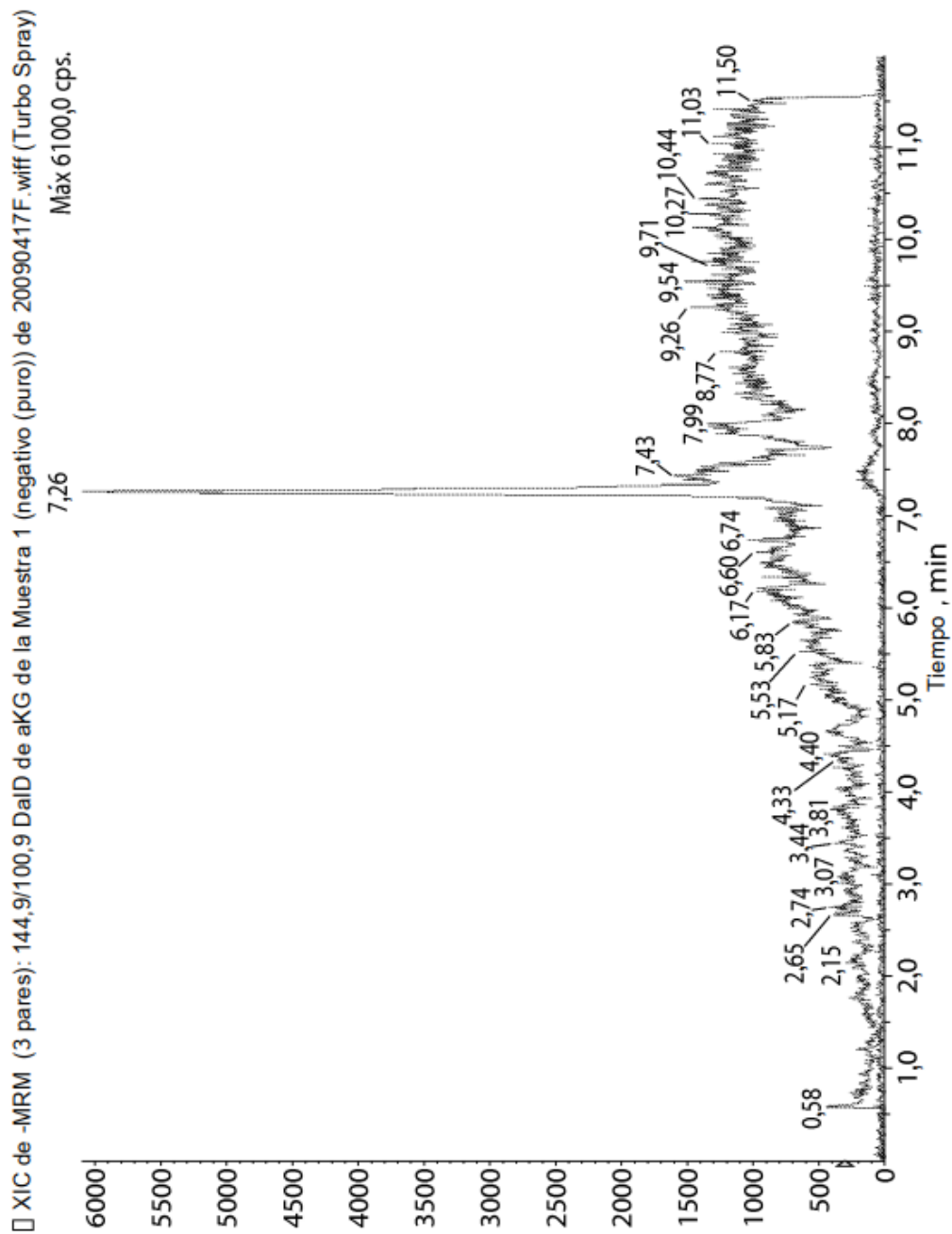
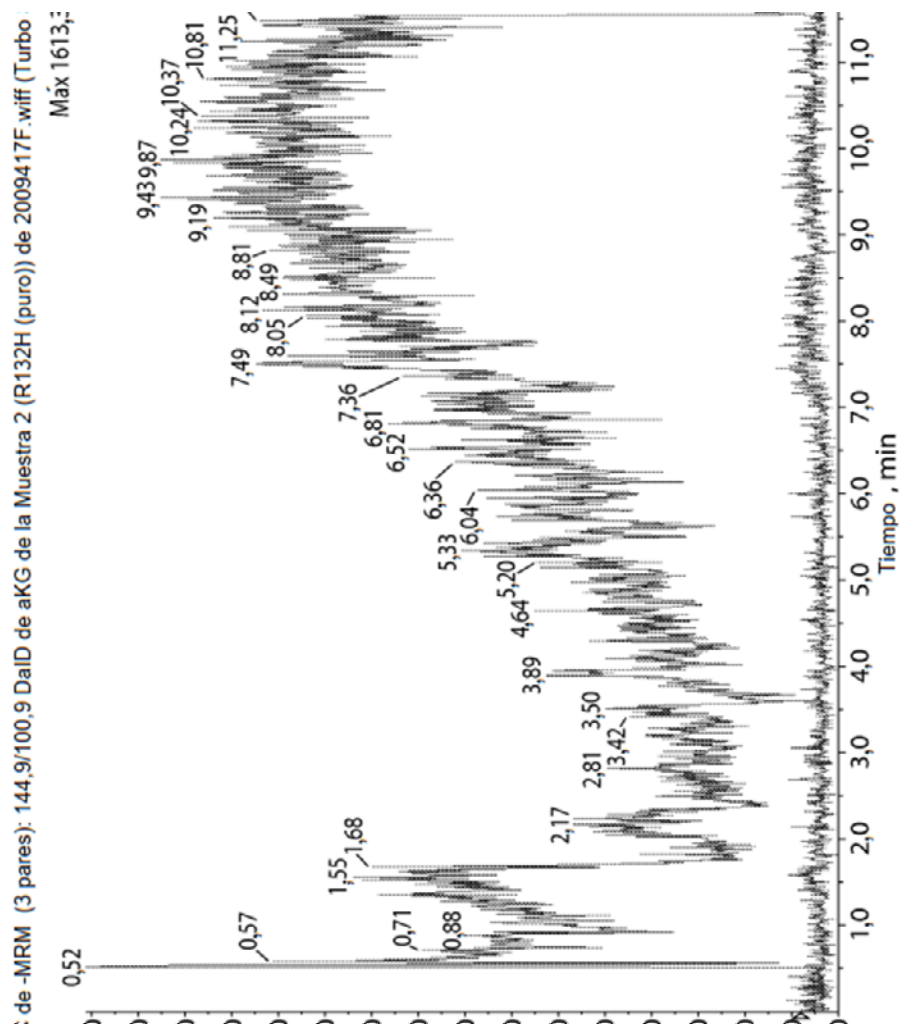


Fig. 17C



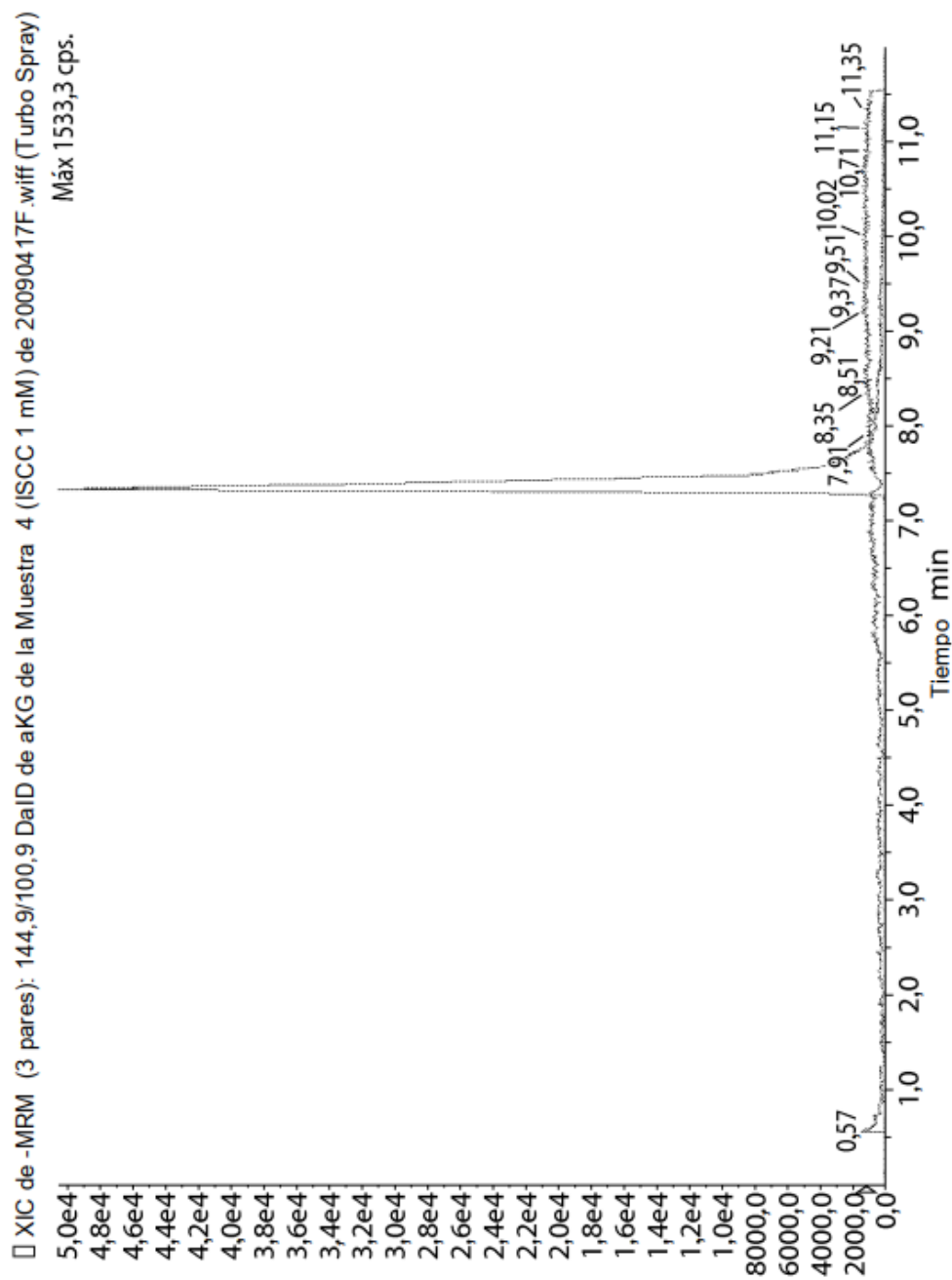
Análisis de LC-MS/MS de la reacción de control. La presencia de a-KG se indica con el pico a 7,26 minutos (azul) aunque no se observa isocitrato (rojo).

Fig. 18A



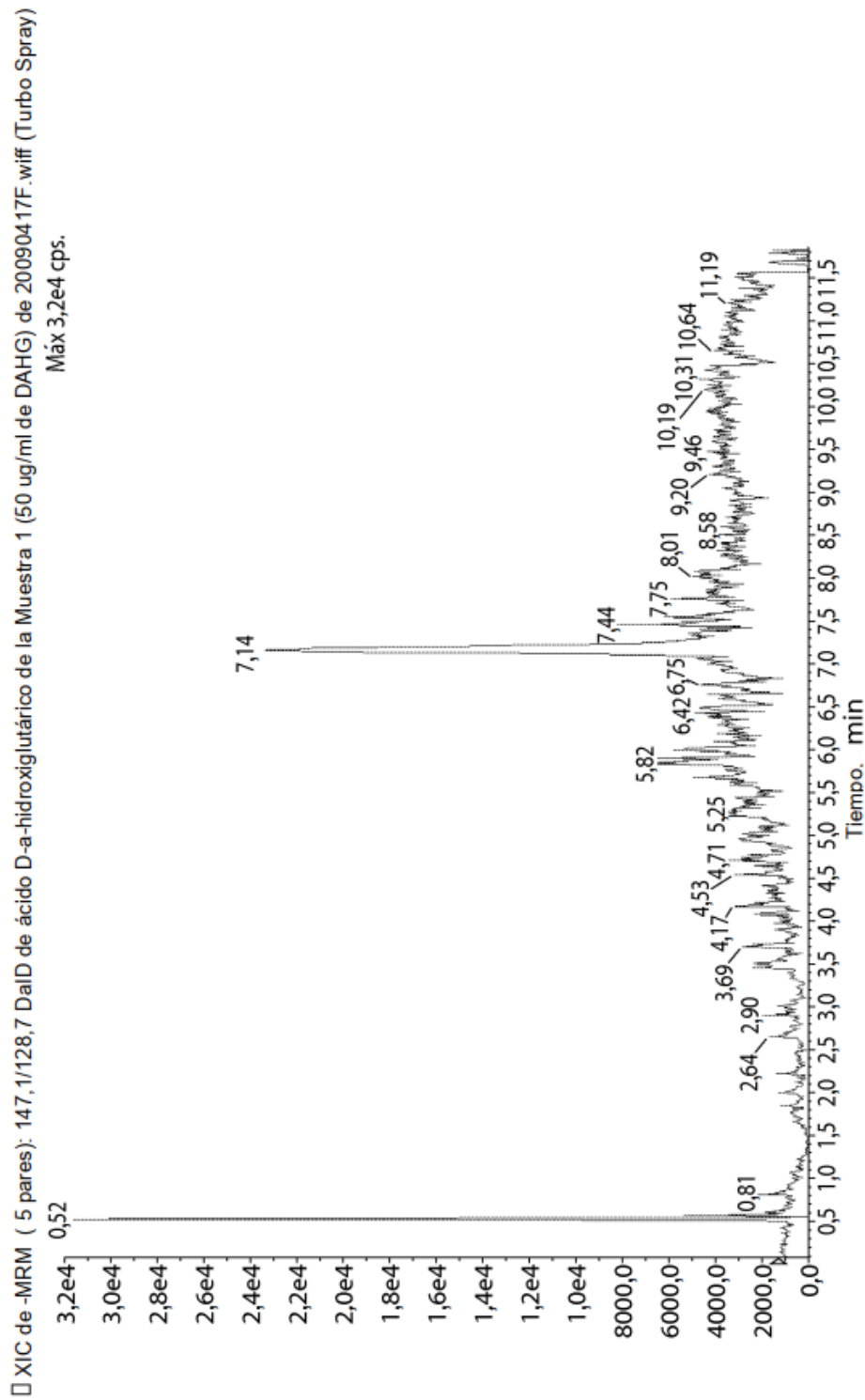
nálisis de LC-MS/MS de la reacción que contienen enzima. No se observa isocitrato (rojo), y a-KG se ha consumido completamente (azul).

Fig. 18B



Análisis de LC-MS/MS de la reacción de control con adiciones. El instrumento de LC-MS/MS tal como se configuró puede detectar fácilmente la supuesta concentración final de isocitrato. Cuando la reacción que contiene R132H terminado se añade a una concentración final de isocitrato 1 mM éste se observó fácilmente (rojo); el consumo básicamente completo de a-KG se confirmó (azul).

Fig. 18C



Análisis de LC-MS/MS de alfa-hidroxiglutarato. El instrumento se optimizó para la detección de 2- hidroxiglutarato y la transición de 147,1/128,7 MRM se identificó como un pico retenido a 7,14 minutos. El pico a 0,52 minutos es un artefacto del instrumento causado por el desplazamiento de una válvula de desvío en línea.

Fig. 19

□ XIC de -MRM (5 pares): 147,1/128,7 DaID de ácido D-a-hidroxi-glutámico de la Muestra 2 (16Apr09 Negativo) de 2009422B.wiff (Turbo Spray)

Máx 8820,0 cps

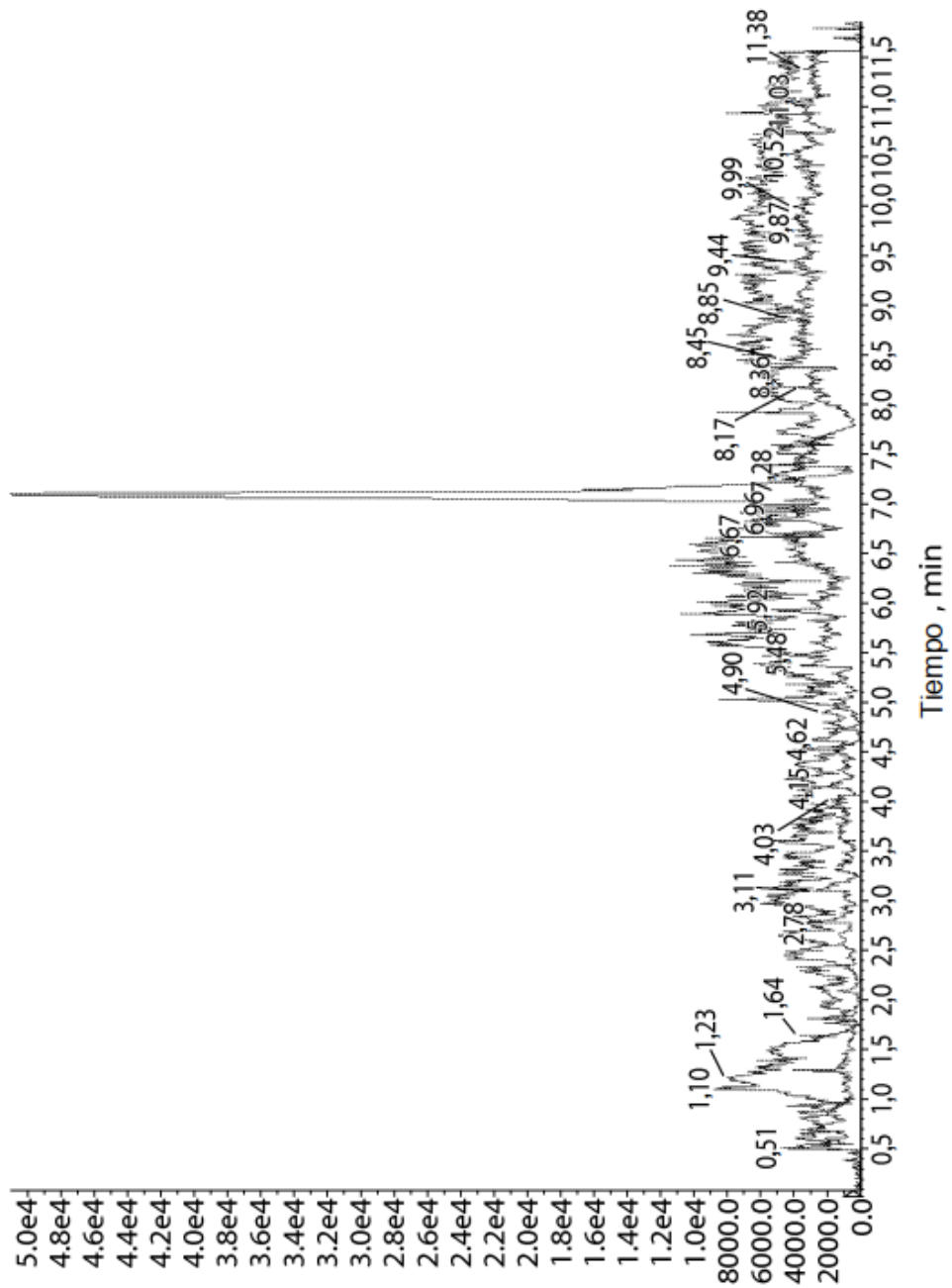


Fig. 20

```

1 mskkisggs v emqgdemtr iiwelikekl ifpyveldlh sydlgienrd atndqvtkda
61 aeaikkhnvg vkcatitpde krveefklkq mwkspngtir nilggtvfre aiickniprl
121 vsgwvkpiii grhaygdqyr atdfvvpqpg kveitytpsd gtqkvtylvh nfeegggvam
181 gmynqdk sie dfahssfqma lskgwplyls tkntilkkyd grfkdifqei ydkqyksqfe
241 aqkiwyehrl iddmvaqamk seggfiwack nydgdvqsds vaqgygslgm mtsvlvcpg
301 ktveaeaahg tvtrhymyq kggetstnpi asifawtrgl ahrakldnnk elaffanale
361 evsietieag fmkdlaaci kglpnvqrsd ylntfefmdk lgenlkikla qakl

```

Fig. 21

```

1  atgtccaaaa aaatcagtgg cggttctgtg gtagagatgc aaggagatga aatgacacga
61 atcatttggg aattgattaa agagaaactc atttttccct acgtggaatt ggatctacat
121 agctatgatt taggcataga gaatcgtgat gccaccaacg accaagtcac caaggatgct
181 gcagaagcta taaagaagca taatgttggc gtcaaatgtg ccactatcac tcctgatgag
241 aagaggggtg aggagttcaa gttgaaacaa atgtggaaat caccaaatgg caccatacga
301 aatattctgg gtggcacggc cttcagagaa gccattatct gcaaaaatat ccccccggctt
361 gtgagtggat gggtaaaacc tatcatcata ggtcgtcatg cttatgggga tcaatacaga
421 gcaactgatt ttgttgttcc tgggcctgga aaagtagaga taacctacac accaagtgc
481 ggaacccaaa aggtgacata cctggtacat aactttgaag aagggtggtg tgttgccatg
541 gggatgtata atcaagataa gtcaattgaa gatattgcac acagttcctt ccaaattggct
601 ctgtctaagg gttggccttt gtatctgagc accaaaaaca ctattctgaa gaaatatgat
661 gggcgtttta aagacatctt tcaggagata tatgacaagc agtacaagtc ccagtttgaa
721 gctcaaaaga tctggtatga gcataggctc atcgacgaca tgggtggcca agctatgaaa
781 tcagagggag gcttcattctg ggcctgtaaa aactatgatg gtgacgtgca gtcggactct
841 gtggcccaag ggtatggctc tctcggcatt atgaccagcg tgctggtttg tccagatggc
901 aagacagtag aagcagaggc tgcccacggg actgtaaccc gtcactaccg catgtaccag
961 aaaggacagg agacgtccac caatcccatt gcttccattt ttgcctggac cagagggtta
1021 gccacagag caaagcttga taacaataaa gagcttgctt tctttgcaaa tgctttggaa
1081 gaagtctcta ttgagacaat tgaggctggc ttcattgacca aggacttggc tgcttgcat
1141 aaaggtttac ccaatgtgca acgttctgac tacttgaata catttgagtt catggataaa
1201 cttggagaaa acttgaagat caaactagct caggccaaac ttttaa

```

Fig. 21A

```

1  cctgtggtcc  cgggtttctg  cagagtctac  ttcagaagcg  gaggcactgg  gagtccggtt
61  tgggattgcc  aggctgtggt  tgtgagtctg  agcttgtgag  cggctgtggc  gcccgaactc
121  ttcgccagca  tatcatcccg  gcaggcgata  aactacattc  agttgagtct  gcaagactgg
181  gaggaactgg  ggtgataaga  aatctattca  ctgtcaaggt  ttattgaagt  caaaatgtcc
241  aaaaaaatca  gtggcgggtt  tgtggtagag  atgcaaggag  atgaaatgac  acgaatcatt
301  tgggaattga  ttaaagagaa  actcattttt  ccctacgtgg  aattggatct  acatagctat
361  gatttaggca  tagagaatcg  tgatgccacc  aacgaccaag  tcaccaagga  tgctgcagaa
421  gctataaaga  agcataatgt  tggcgtcaaa  tgtgccacta  tcaactcctga  tgagaagagg
481  gttgaggagt  tcaagttgaa  acaaatgtgg  aaatcaccaa  atggcaccat  acgaaatatt
541  ctgggtggca  cggctctcag  agaagccatt  atctgcaaaa  atatcccccg  gcttgtgagt
601  ggatgggtaa  aacctatcat  cataggtcgt  catgcttatg  gggatcaata  cagagcaact
661  gattttgttg  ttcctggggc  tggaaaagta  gagataacct  acacaccaag  tgacggaacc
721  caaaaggtga  catacctggt  acataacttt  gaagaaggtg  gtgggtgtgc  catggggatg
781  tataatcaag  ataagtcaat  tgaagatttt  gcacacagtt  ccttccaaat  ggctctgtct
841  aagggttggc  ctttgtatct  gagcaccaaa  aacactattc  tgaagaaata  tgatgggctg
901  tttaaagaca  tctttcagga  gatatatgac  aagcagtaca  agtcccagtt  tgaagctcaa
961  aagatctggt  atgagcatag  gctcatcgac  gacatggtgg  cccaagctat  gaaatcagag
1021  ggaggcttca  tctgggcctg  taaaaactat  gatggtgacg  tgcagtcgga  ctctgtggcc
1081  caagggtatg  gctctctcgg  catgatgacc  agcgtgctgg  tttgtccaga  tggcaagaca
1141  gtagaagcag  aggctgcca  cgggactgta  acccgctact  accgcatgta  ccagaaagga
1201  caggagacgt  ccaccaatcc  cattgcttcc  atttttgcct  ggaccagagg  gttagccac
1261  agagcaaagc  ttgataacaa  taaagagctt  gccttctttg  caaatgcttt  ggaagaagtc
1321  tctattgaga  caattgaggc  tggcttcatg  accaaggact  tggctgcttg  cattaaggt
1381  ttaccaatg  tgcaacgttc  tgactacttg  aatacatttg  agttcatgga  taaacttggg
1441  gaaaacttga  agatcaaact  agctcaggcc  aaactttaag  ttcatacctg  agctaagaag
1501  gataattgtc  ttttggtaac  taggtctaca  ggtttacatt  tttctgtgtt  aactcaagg
1561  ataaaggcaa  aatcaatttt  gtaatttgtt  tagaagccag  agtttatctt  ttctataagt
1621  ttacagcctt  tttcttata  atacagttat  tgccaccttt  gtgaacatgg  caagggactt
1681  ttttacaatt  tttattttat  tttctagtac  cagcctagga  attcgggttag  tactcatttg
1741  tattcactgt  cactttttct  catgttctaa  ttataaatga  ccaaaatcaa  gattgctcaa
1801  aagggtaaat  gatagccaca  gtattgctcc  ctaaaatatg  cataaagtag  aaattcactg
1861  ccttcccctc  ctgtccatga  ccttggggc  agggaagttc  tgggtgcata  gatatcccgt
1921  tttgtgaggt  agagctgtgc  attaaacttg  cacatgactg  gaacgaagta  tgagtgaac
1981  tcaaatgtgt  tgaagatact  gcagtcattt  ttgtaaagac  cttgctgaat  gtttccaata
2041  gactaaatac  tgtttaggcc  gcaggagagt  ttggaatccg  gaataaatac  tacctggagg
2101  tttgtcctct  ccatttttct  ctttctcctc  ctggcctggc  ctgaatatta  tactactcta
2161  aatagcatat  ttcattccaag  tgcaataatg  taagctgaat  cttttttgga  cttctgctgg
2221  cctgttttat  ttcttttata  taaatgtgat  ttctcagaaa  ttgatattaa  acactatctt
2281  atcttctcct  gaactgttga  ttttaattaa  aattaagtgc  taattacca  aaaaaaaaa

```

Fig. 21B

MAGYLRVVRSLCRASGSRPAWAPAALTAPTSQEQPRRHYADKRIKVAKPV
VEMDGDEMTRI IWQFIKEKLILPHVDIQLKYFDLGLPNRDQTDQVTIDS
ALATQKYSVAVKCATITPDEARVEEFKLKKMWKSPNGTIRNILGGTVFRE
PIICKNIPRLVPGWTKPITIGRHAHGDQYKATDFVADRAGTFKMVFTPKD
GSGVKEWEVYNFPAGGVGMGMYNNTDESI SGFAHSCFQYAIQKKWPLYMST
KNTILKAYDGRFKDIFQEIFDKHYKTDFDKNKIWYEHRLIDDMVAQVLKS
SGGFVWACKNYDGDVQSDILAQGFGLMTSVLVCPDGKTIEAEAAHGT
VTRHYREHQKGRPTSTNPIASIFAWTRGLEHRGKLDGNQDLIRFAQMLEK
VCVETVESGAMTKDLAGCIHGLSNVKLNEHFLNTTDFLDTIKSNLDRALG
RQ

Fig. 22

```

1  atggccgggt  acctgcgggt  cgtgcgctcg  ctctgcagag  cctcaggctc  gcggccggcc
61  tgggcgccgg  cgccctgac  agccccacc  tcgcaagagc  agccgcggcg  ccactatgcc
121  gacaaaagga  tcaaggtggc  gaagcccggt  gtggagatgg  atggtgatga  gatgaccggt
181  attatctggc  agttcatcaa  ggagaagctc  atcctgcccc  acgtggacat  ccagctaaag
241  tattttgacc  tcgggctccc  aaaccgtgac  cagactgatg  accaggtcac  cattgactct
301  gcactggcca  cccagaagta  cagtgtggct  gtcaagtgtg  ccaccatcac  ccctgatgag
361  gcccggtgtg  aagagttcaa  gctgaagaag  atgtggaaaa  gtccaatgg  aactatccgg
421  aacatcctgg  gggggactgt  cttccgggag  cccatcatct  gcaaaaacat  cccacgccta
481  gtccctggct  ggaccaagcc  catcaccatt  ggcaggcacg  cccatggcga  ccagtacaag
541  gccacagact  ttgtggcaga  ccgggcgggc  actttcaaaa  tgggtcttcac  cccaaaagat
601  ggcagtgggt  tcaaggagtg  ggaagtgtac  aacttccccg  caggcggcgt  gggcatgggc
661  atgtacaaca  ccgacgagtc  catctcaggt  tttgcgcaca  gctgcttcca  gtatgccatc
721  cagaagaaat  ggccgctgta  catgagcacc  aagaacacca  tactgaaagc  ctacgatggg
781  cgtttcaagg  acatcttcca  ggagatcttt  gacaagcact  ataagaccga  cttcgacaag
841  aataagatct  ggtatgagca  ccggctcatt  gatgacatgg  tggctcaggt  cctcaagtct
901  tcgggtggct  ttgtgtgggc  ctgcaagaac  tatgacggag  atgtgcagtc  agacatcctg
961  gcccagggt  ttggctccct  tggcctgatg  acgtccgtcc  tgggtctgcc  tgatgggaag
1021  acgattgagg  ctgaggccgc  tcatgggacc  gtcacccgcc  actatcggga  gcaccagaag
1081  ggccggccca  ccagcaccaa  ccccatcgcc  agcatctttg  cctggacacg  tggcctggag
1141  caccggggga  agctggatgg  gaaccaagac  ctcacaggt  ttgcccagat  gctggagaag
1201  gtgtgcgtgg  agacggtgga  gagtggagcc  atgaccaagg  acctggcggg  ctgcattcac
1261  ggcctcagca  atgtgaagct  gaacgagcac  ttcctgaaca  ccacggactt  cctcgacacc
1321  atcaagagca  acctggacag  agccctgggc  aggcagtag

```

Fig. 22A

```

1 ccagcgtag cccgcggcca ggcagccggg aggagcggcg cgcgctcgga cctctcccgc
61 cctgctcggt cgctctccag cttgggatgg cgggctacct gcgggtcggt cgctcgctct
121 gcagagcctc aggtcgcggt ccggcctggg cgcgggcggc cctgacagcc cccacctcgc
181 aagagcagcc gcggcgccac tatgccgaca aaaggatcaa ggtggcgaag ccggtggtgg
241 agatggatgg tgatgagatg acccgtagta tctggcagtt catcaaggag aagctcatcc
301 tgccccacgt ggacatccag ctaaagtatt ttgacctcgg gctcccaaac cgtgaccaga
361 ctgatgacca ggtcaccatt gactctgcac tggccacca gaagtacagt gtggctgtca
421 agtgtgccac catcaccctt gatgagggcc gtgtggaaga gttcaagctg aagaagatgt
481 ggaaaagtcc caatggaact atccggaaca tcctgggggg gactgtcttc cgggagccca
541 tcatctgcaa aaacatccca cgcctagtcc ctggctggac caagcccatc accattggca
601 ggcagcccca tggcgaccag tacaaggcca cagactttgt ggcagaccgg gccggcactt
661 tcaaaatggt cttcacccca aaagatggca gtggtgtcaa ggagtgggaa gtgtacaact
721 tccccgcagg cggcgtgggc atgggcatgt acaacaccga cgagtccatc tcagggtttg
781 cgcacagctg cttccagtat gccatccaga cgccttgggc gctgtacatg agcaccaaga
841 acaccatact gaaagcctac gatgggcgtt tcaaggacat cttccaggag atctttgaca
901 agcactataa gaccgacttc gacaagaata agatctggta tgagcaccgg ctcattgatg
961 acatggtggc tcaggctctc aagtcttcgg gtggctttgt gtgggcctgc aagaactatg
1021 acggagatgt gcagtacagc atcctggccc agggctttgg ctcccttggt ctgatgacgt
1081 ccgtcctggt ctgccctgat gggaagacga ttgaggctga ggccgctcat gggaccgtca
1141 cccgccacta tcgggagcac cagaagggcc ggcccaccag caccaacccc atcgccagca
1201 tctttgcctg gacacgtggc ctggagcacc gggggaagct ggatgggaac caagacctca
1261 tcagggtttg ccagatgctg gagaagggtg gcgtggagac ggtggagagt ggagccatga
1321 ccaaggacct ggcgggctgc attcacggcc tcagcaatgt gaagctgaac gagcacttcc
1381 tgaacaccac ggacttcctc gacaccatca agagcaacct ggacagagcc ctgggcaggc
1441 agtaggggga ggcgccaccc atggctgcag tggagggggc agggctgagc cggcgggtcc
1501 tcctgagcgc ggcagagggg gagcctcaca gcccctctct ggaggccttt ctaggggatg
1561 tttttttata agccagatgt ttttaaaagc atatgtgtgt ttcccctcat ggtgacgtga
1621 ggcaggagca gtgcgtttta cctcagccag tcagtatgtt ttgcatactg taatttatat
1681 tgcccttgga acacatggtg ccatatttag ctactaaaaa gctcttcaca aaaaaaaaaa

```

Fig. 22B

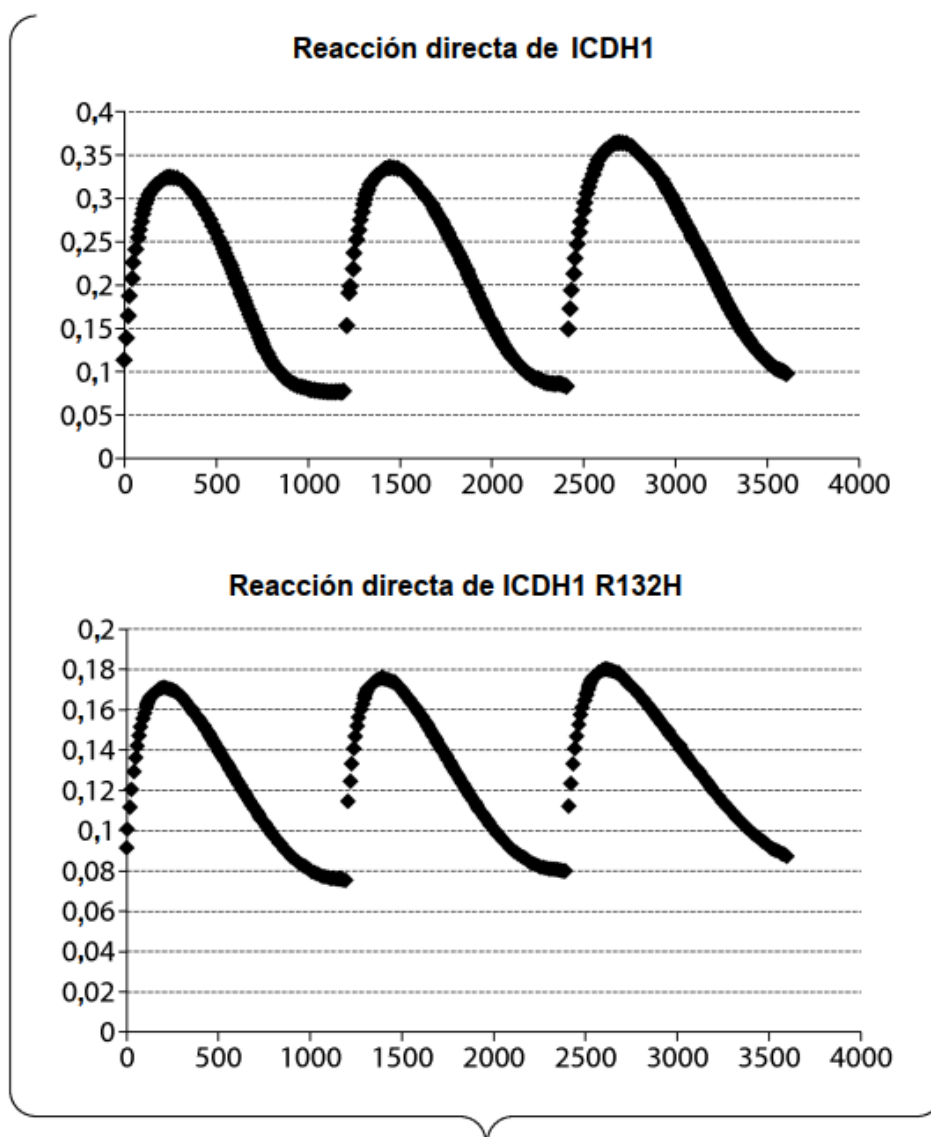


Fig. 23

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-2HG
de la muestra 1 (874-DHAG) de 2009617K...

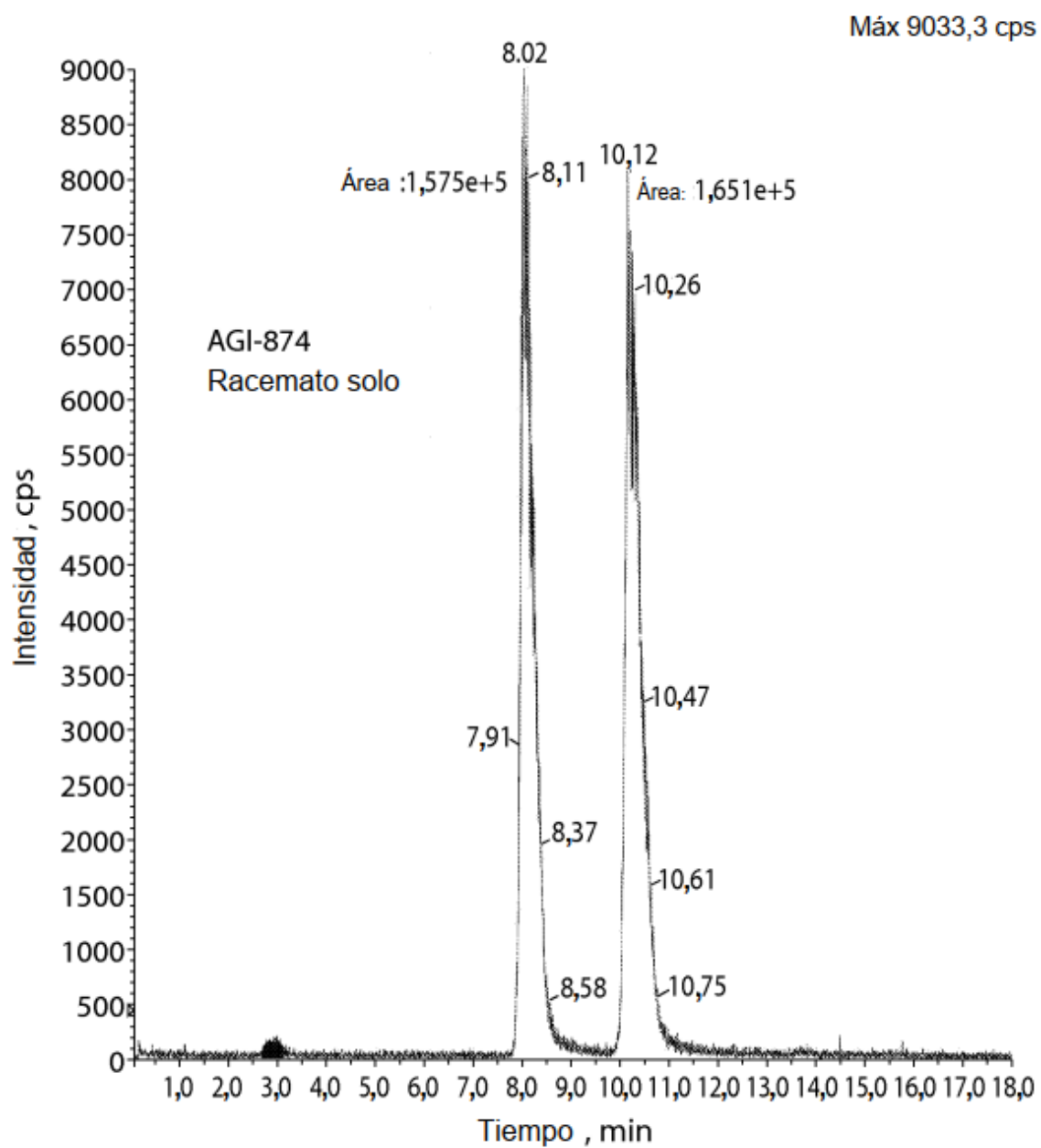


Fig. 24A

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-2HG
de la muestra 2 de 200906...

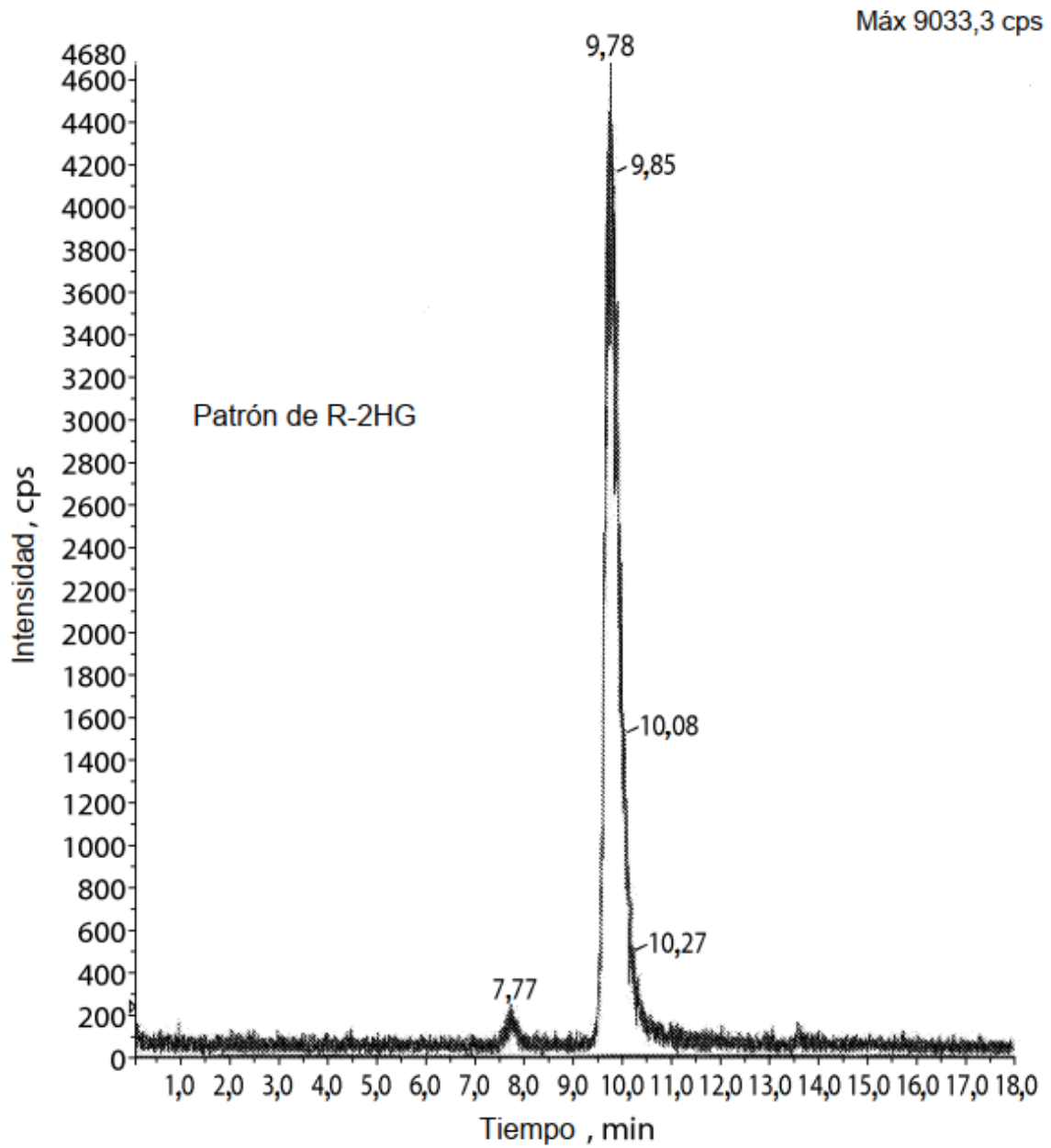


Fig. 24B

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-2HG de la muestra 3 de 20090618...

Sin detección del pico si el número de puntos supera 1040 Máx 3890,0 cps

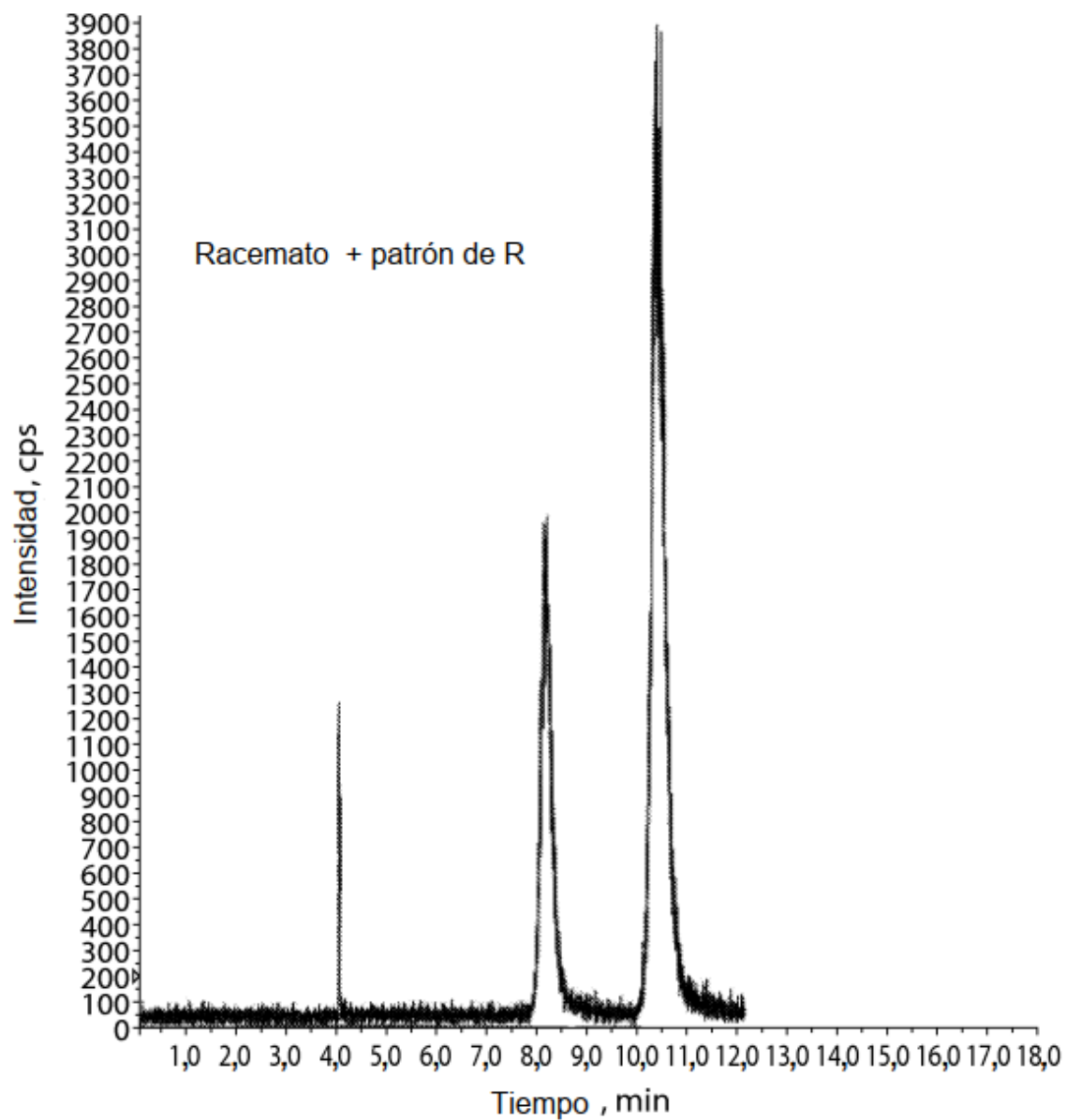


Fig. 24C

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-2HG de la muestra 1 de (enzima derivatizada Rxn 1-...

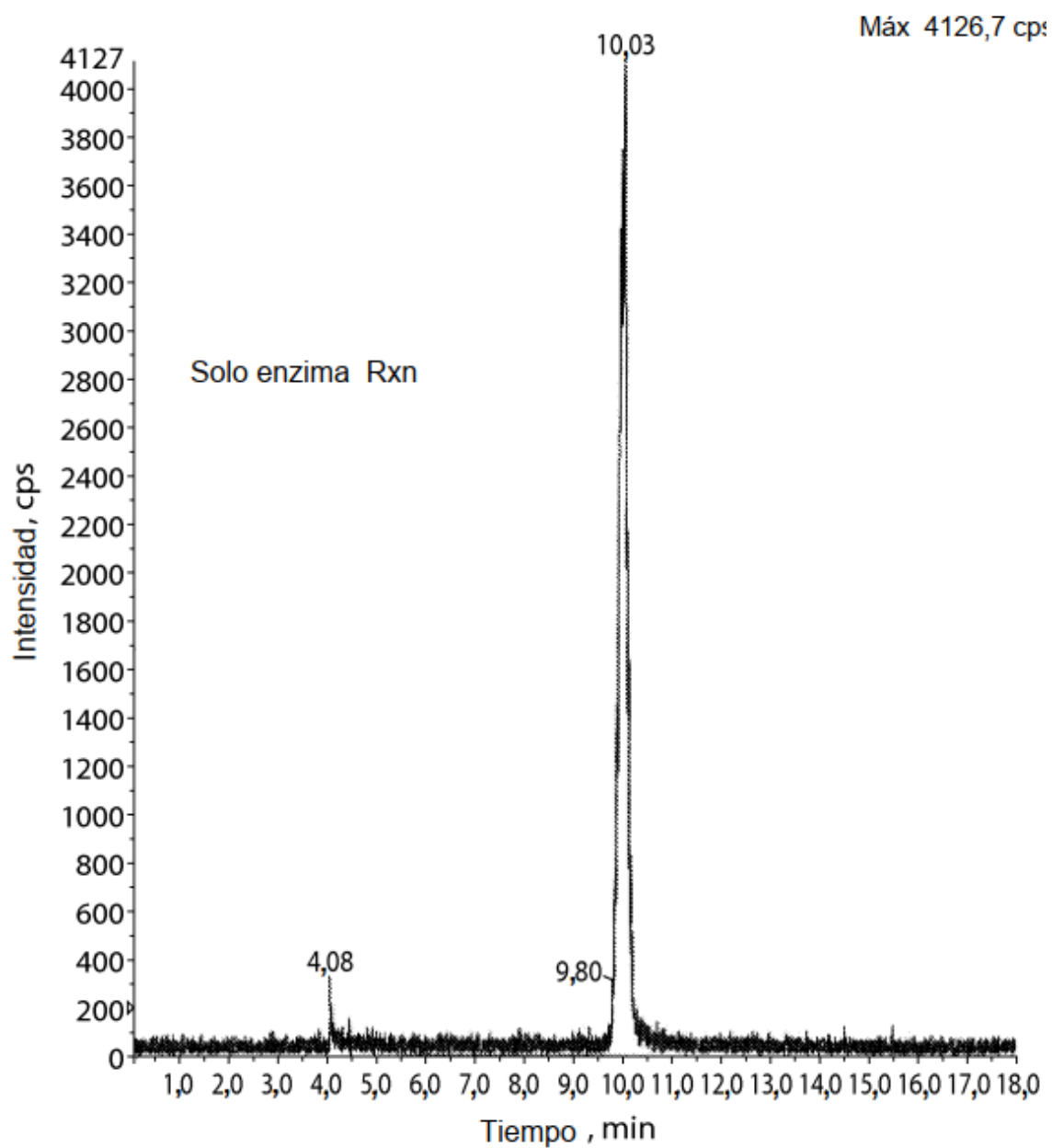


Fig. 24D

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-2HG de la muestra 2 de 20090618...

Sin detección del pico si el número de puntos supera 1040

Máx 4726,7 cps

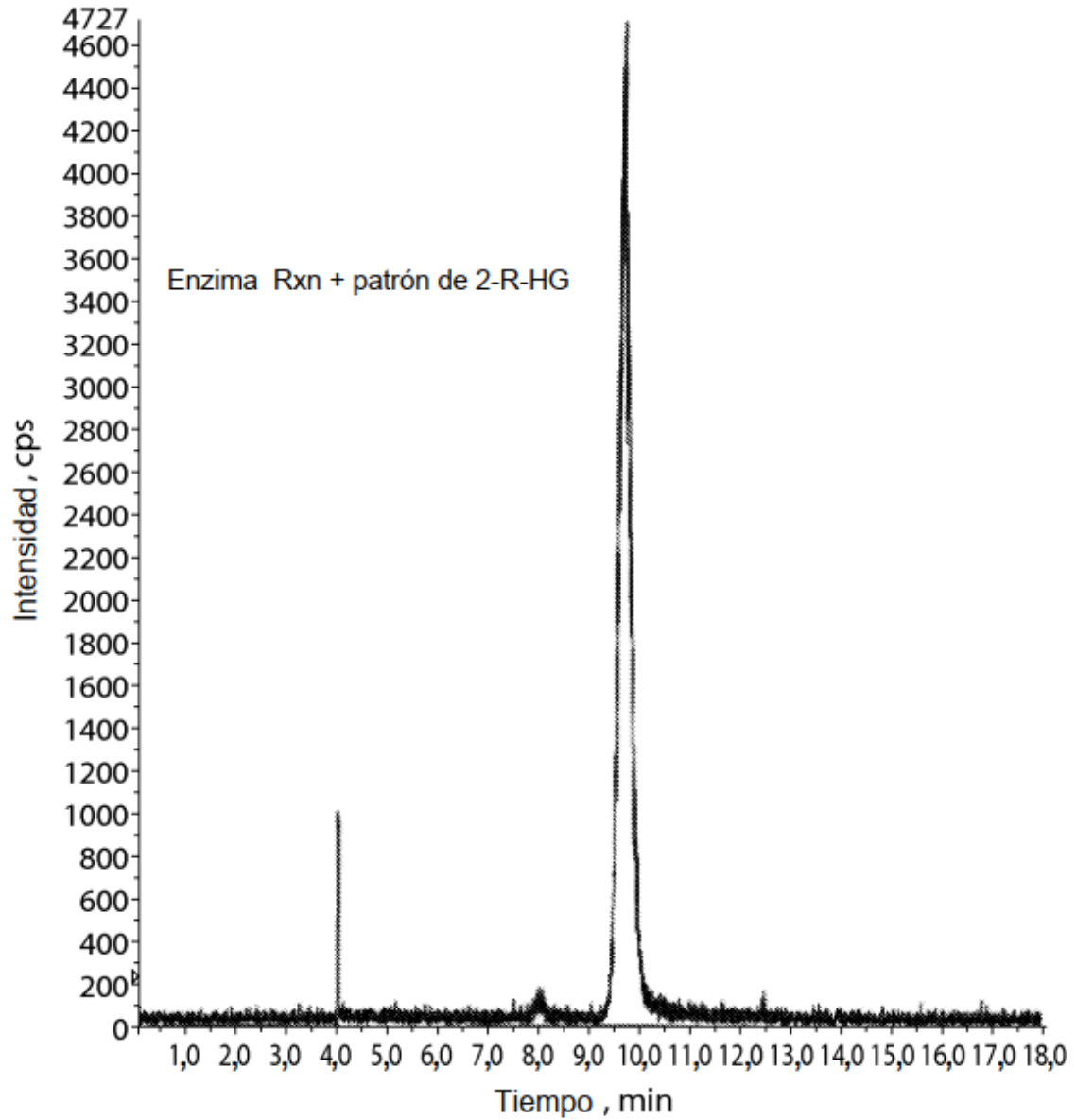


Fig. 24E

□ XIC de -MRM (1 par): 362,9/146,6 Da ID: DATAN-
2HG de la muestra 5 de 200906188...

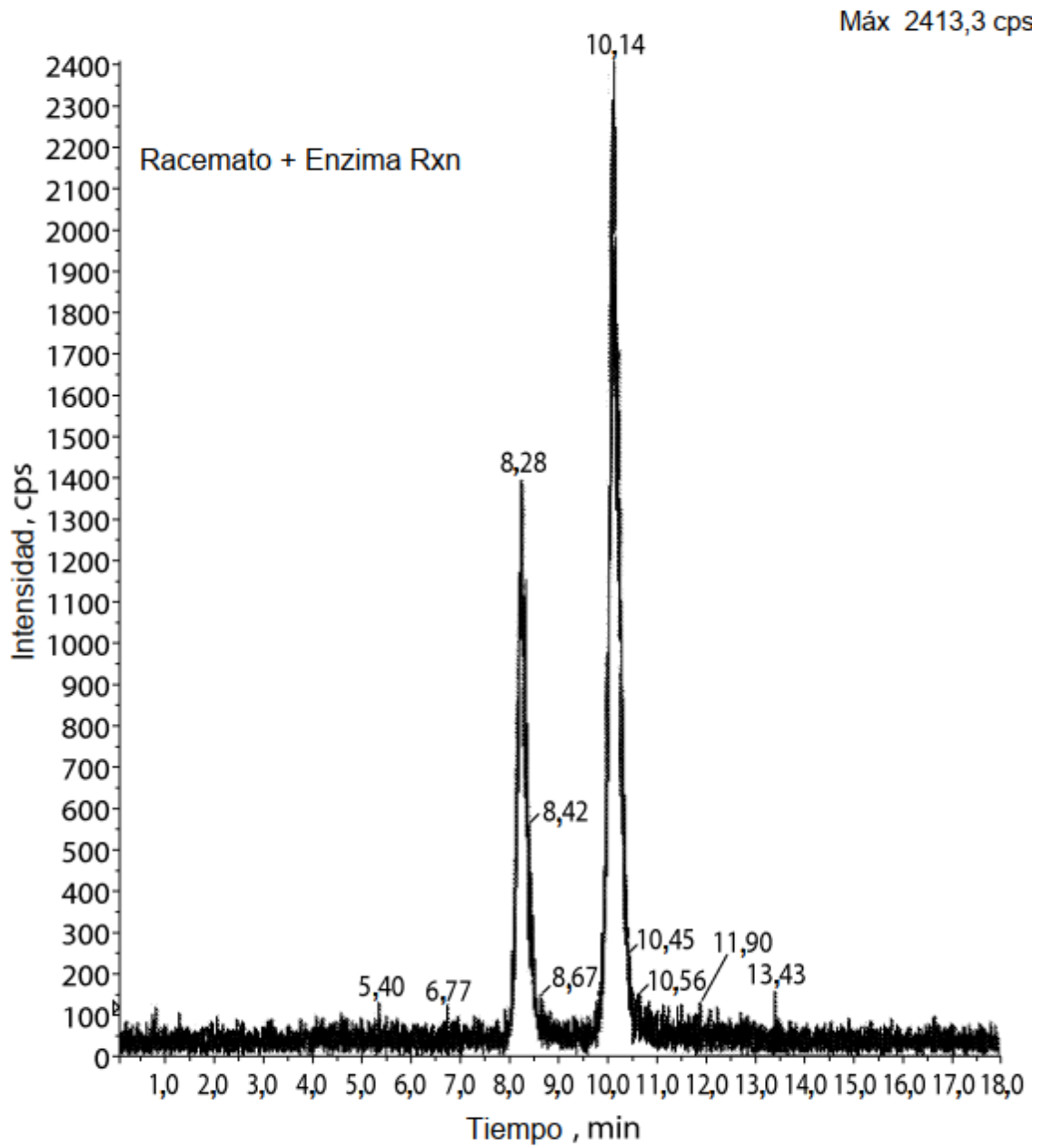


Fig. 24F

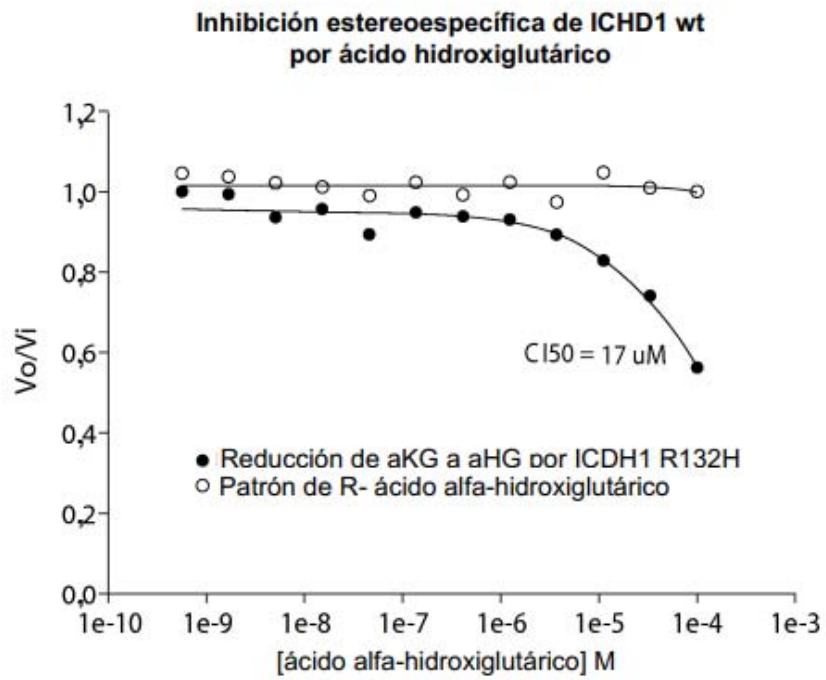


Fig. 25

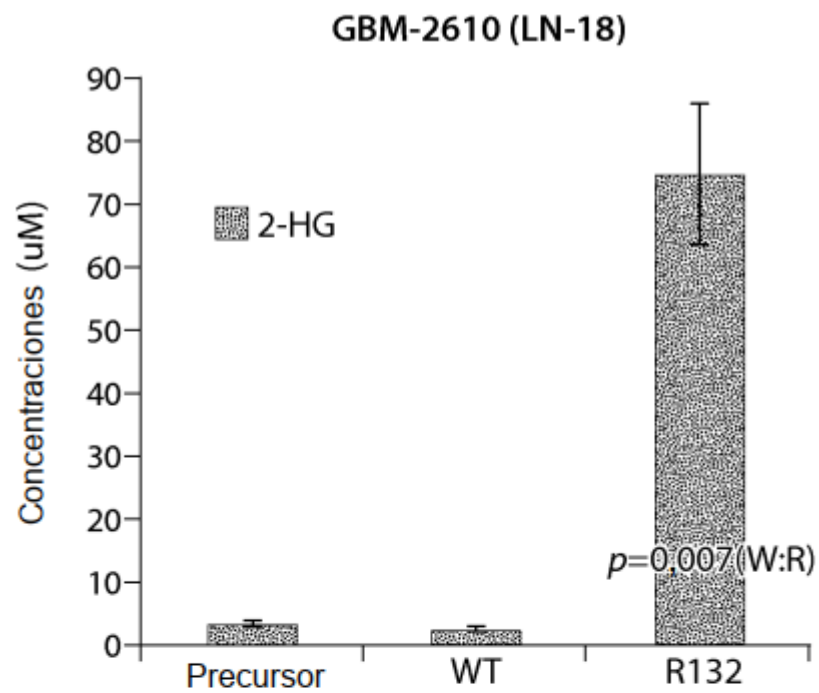


Fig. 26A

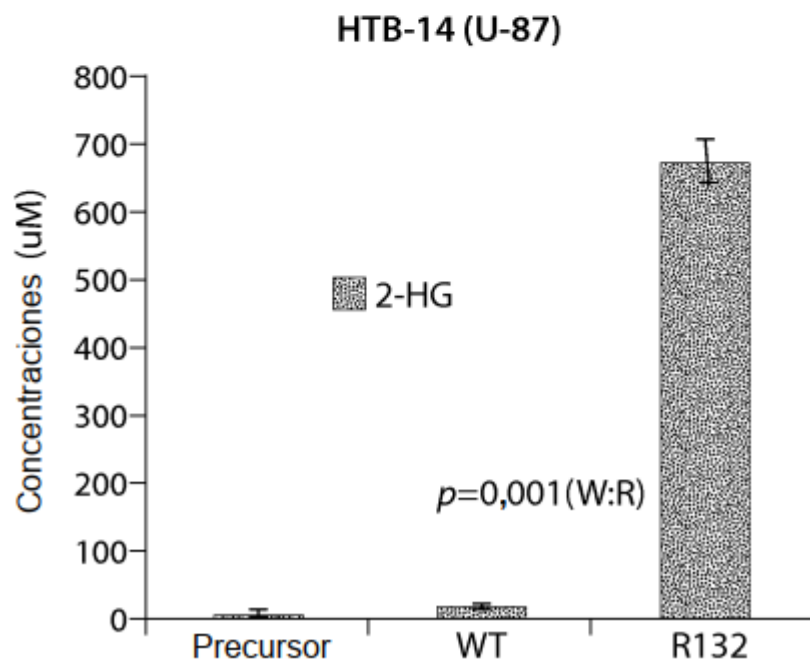


Fig. 26B

gcataatgagctctatatgccatcactgcagttgtaggtataaactatccat ttgtctgaaaaactttgcttc
 taattttctcttcaagCTATGATTAGGCATAGAGAAATCGTGATGCCACCAACGACCAAGTCACCAAGGAT
 GCTGCAGAAAGCTATAAAGAGCATAAATGTGGCGTCAAAATGTGCCACTATCACTCCTGATGAGAAAGAGGGTTG
 AGGAGTCAAGTTGAAACAAATGTGGAATCACCAAAATGGCACCATACGAAATATTCTGGGTGGCJGTCTTCA
 GAGAGCCATTATCTGCAAAAATATCCCCGGCTTGTGAGTGGTAAACCTATCATCATAGGTC**G**TCA
 TGCTTATGGGGATCAAgtaagtcatgttggaataatgtgatttgcatgbtggcccagaaatttccaacttg
 tatgtgtttattcttatcttttggtatctacacccattaaagcaaggta

Fig. 27

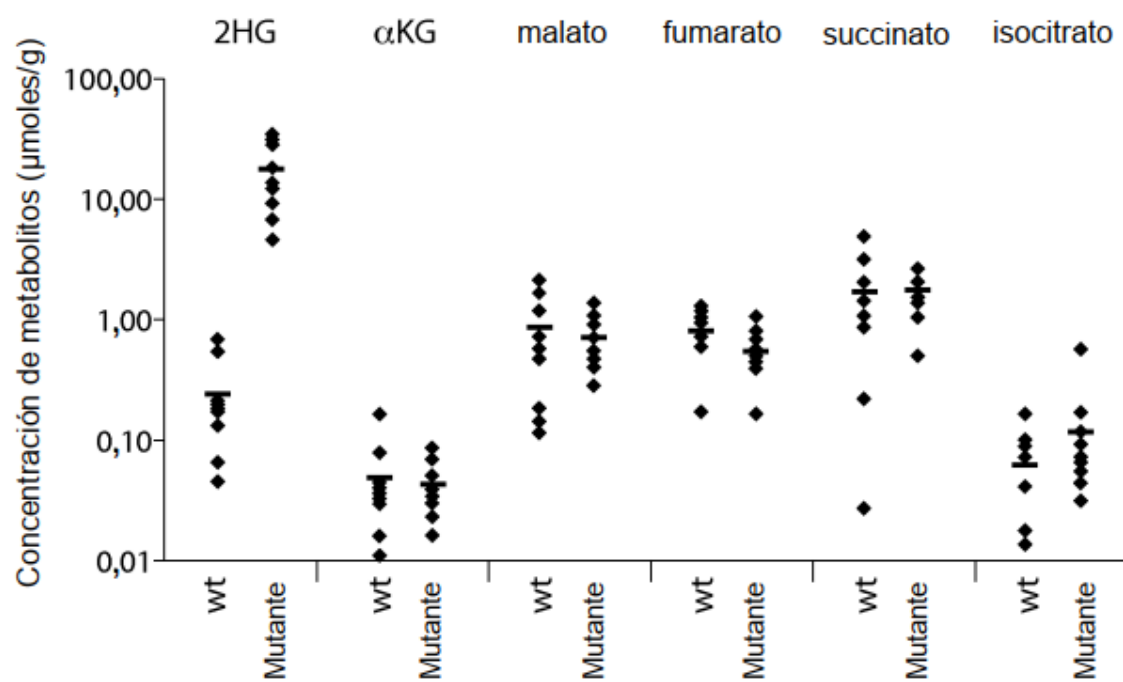


Fig. 28

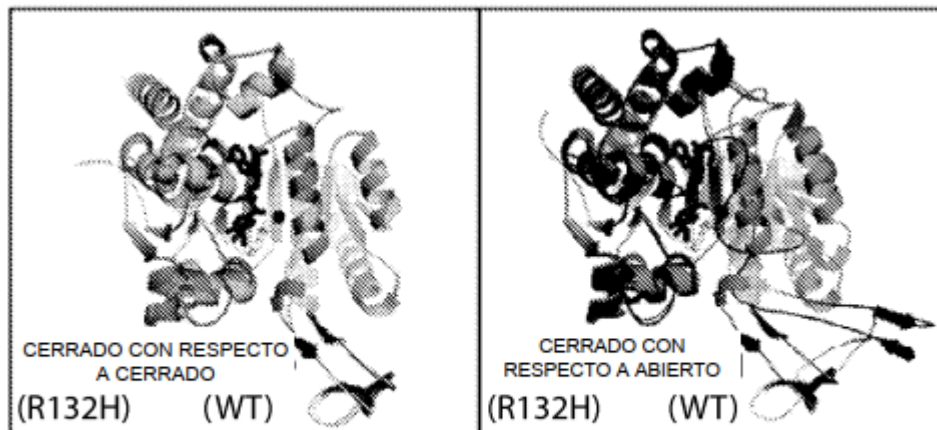


Fig. 29A

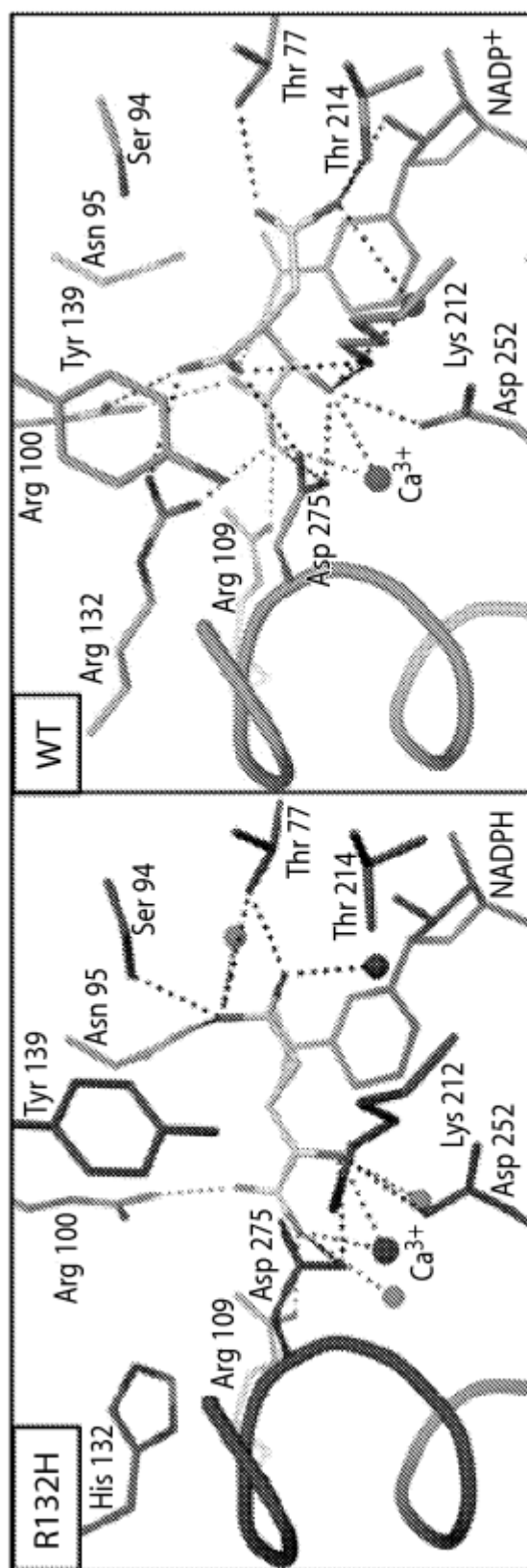


Fig. 29B

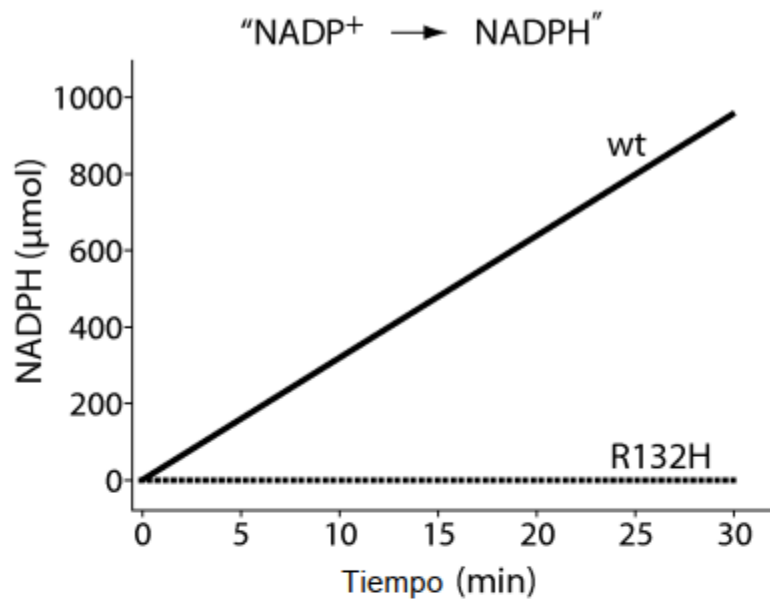


Fig. 30A

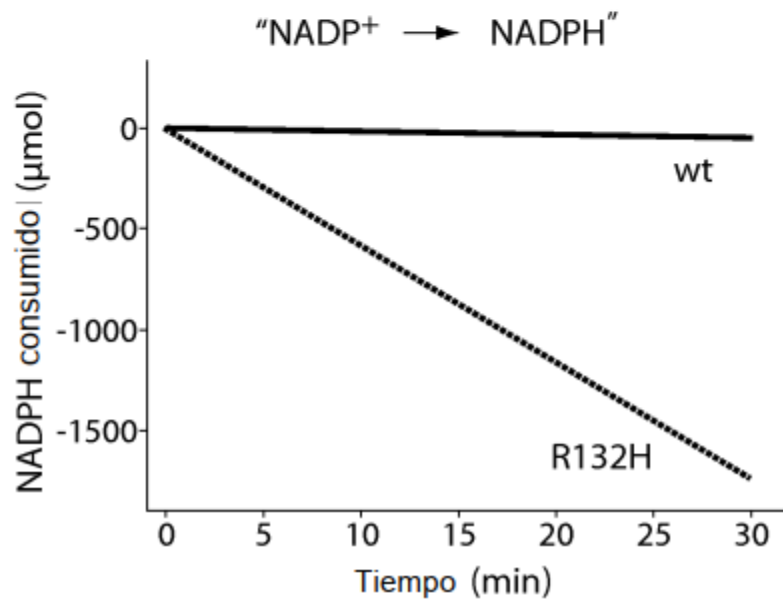


Fig. 30B

Oxidativo ($\geq$ NADPH)	WT	R132H	Reductor ($\geq$ NADP+)	WT	R132H
$K_{M,NADP^+}$ (μ M)	49	84	$K_{M,NADPH}$ (μ M)	n/a*	0,44
$K_{M, \text{isoditrato}}$ (μ M)	65	370	$K_{M, \alpha KG}$ (μ M)	n/a	965
$K_{M, MgCl_2}$ (μ M)	29	10085	k_{cat} (s^{-1})	n/a	$1,0 \times 10^3$
$K_{i, \alpha KG}$ (μ M)	1871	24	*n/a = sin actividad enzimática medible		
k_{cat} (s^{-1})	$4,4 \times 10^5$	37,5			

Fig. 30C

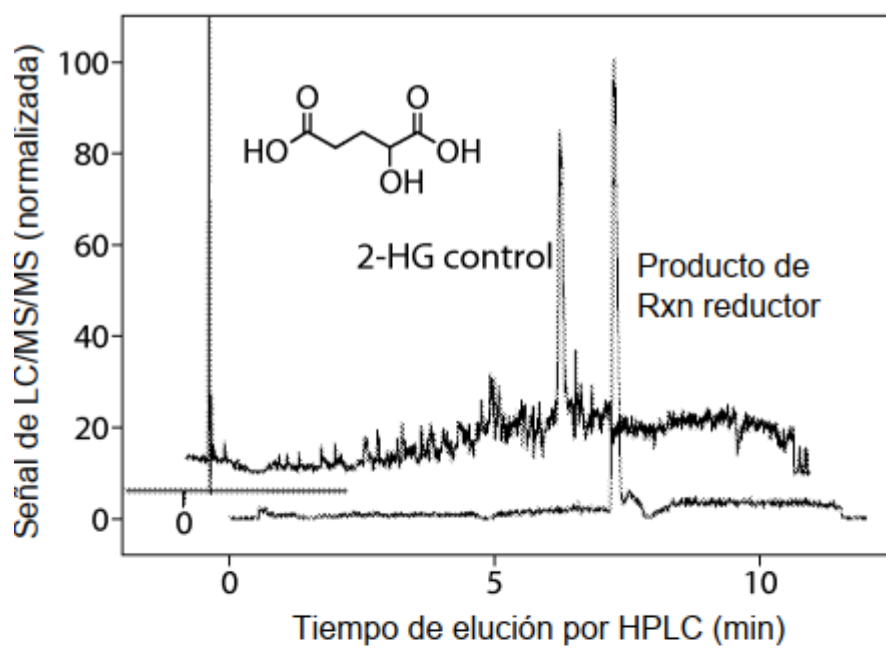


Fig. 31A

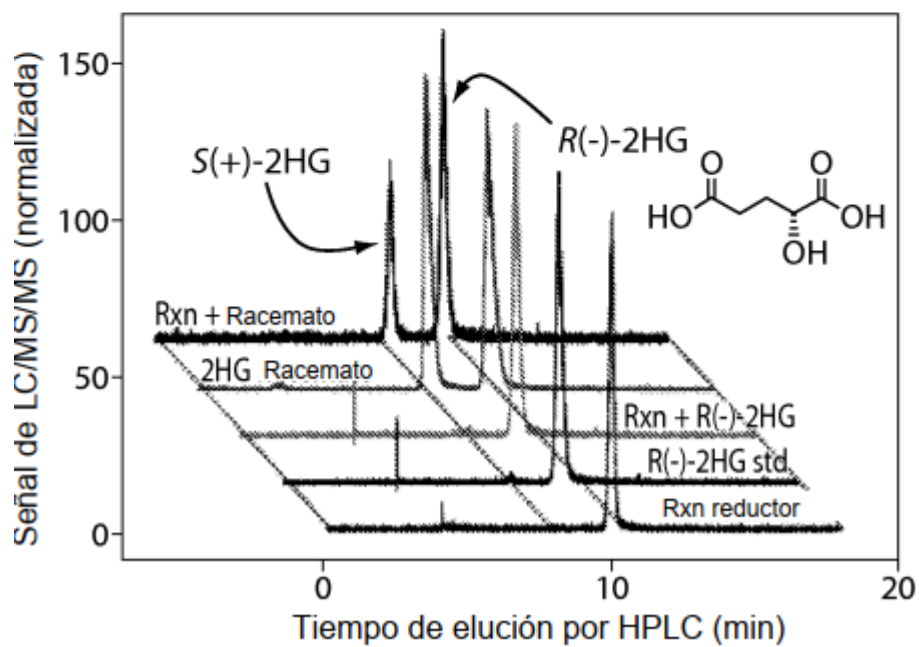


Fig. 31B

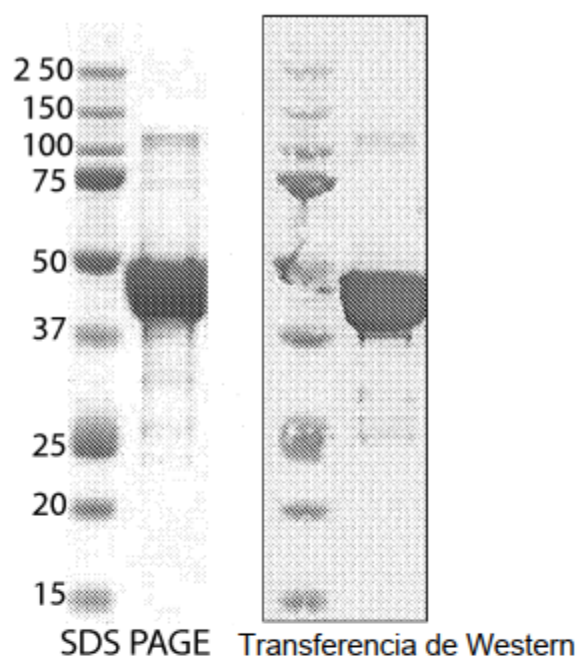


Fig. 32A

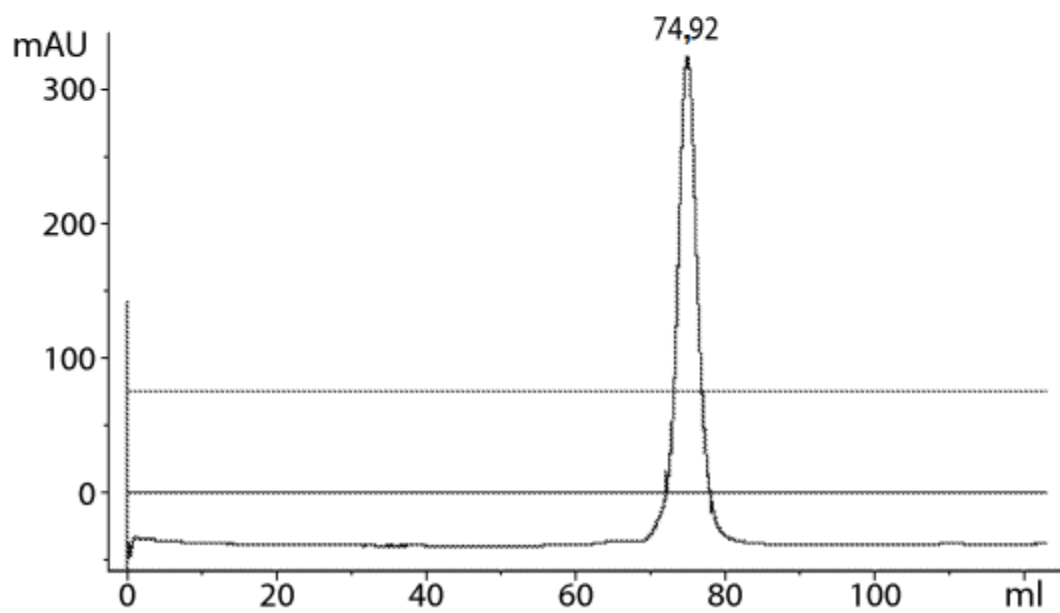


Fig. 32B

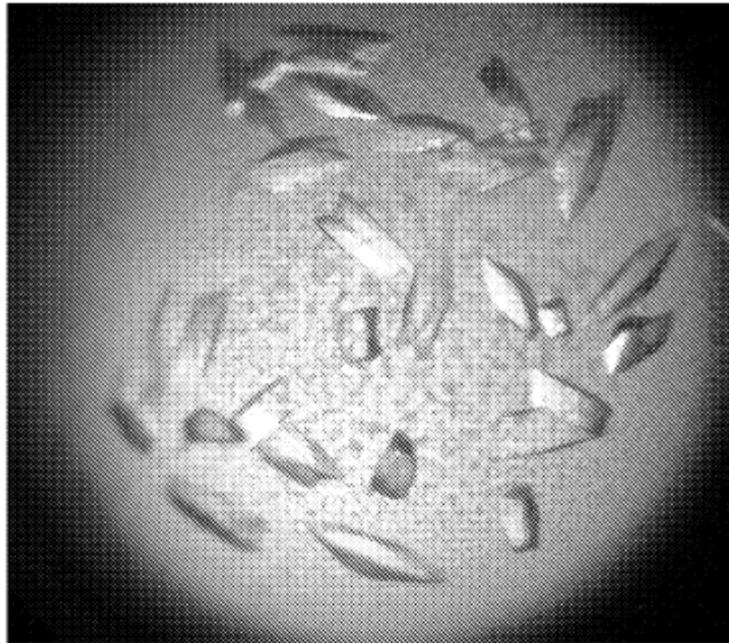


Fig. 33

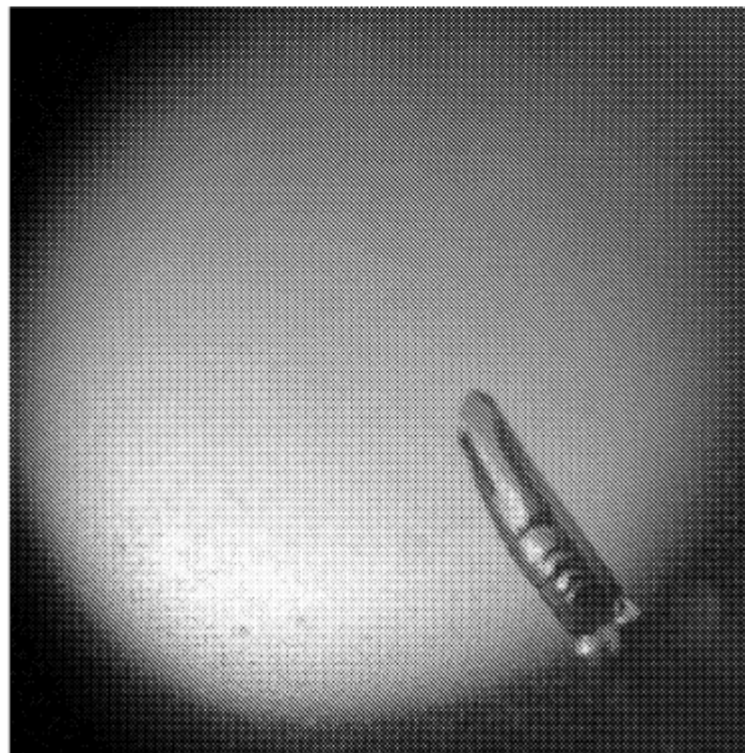
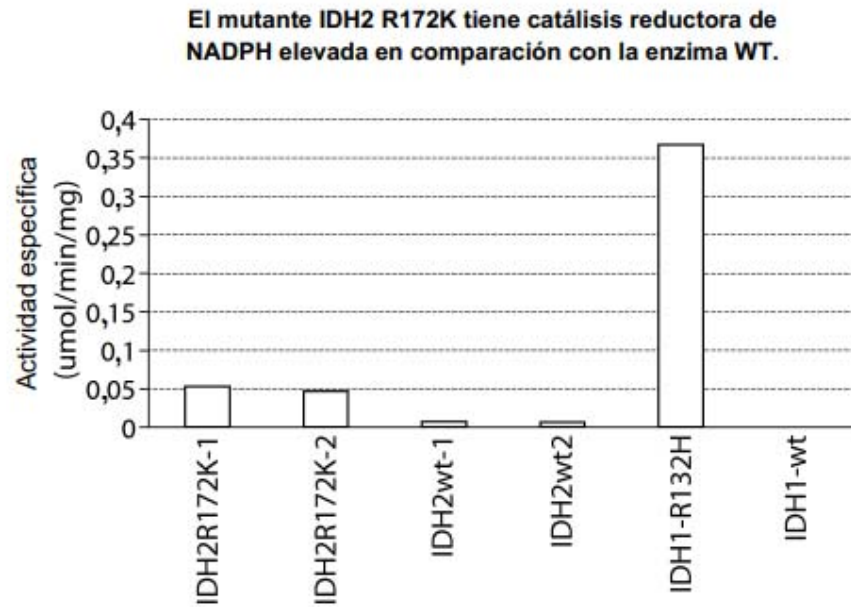


Fig. 34



Comparación de la reducción de NADPH entre las enzimas IDH2-R172K, IDH2-wt, IDH1-R132H, e IDH1-wt. Las concentraciones finales de reactivo para cada reacción fueron las siguientes: Tris 20 mM 7,5, NaCl 150 mM, MnCl₂ 2 mM, glicerol al 10 %, BSA al 0,03 %, enzima variada (1 -120 ug/ml), NADPH 1 mM, aKG 5 mM.

Fig. 35

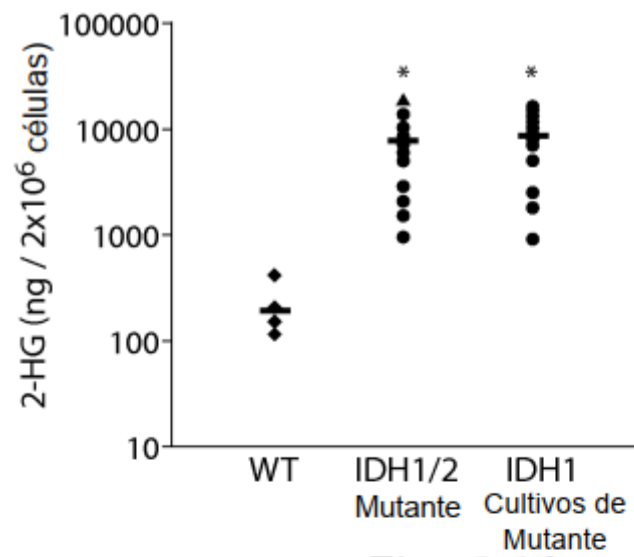


Fig. 36A

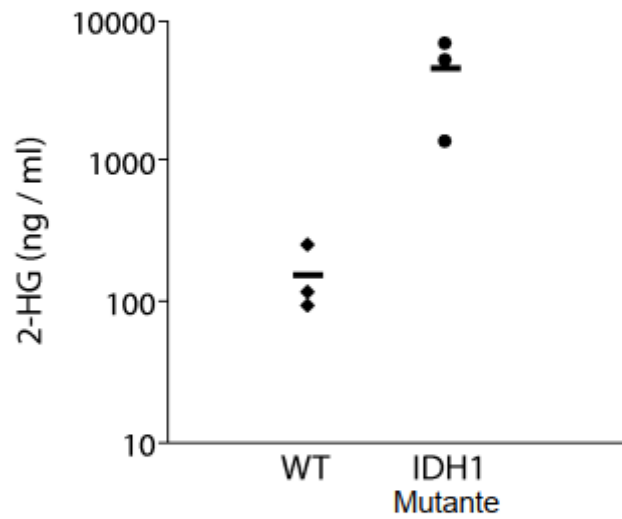


Fig. 36B

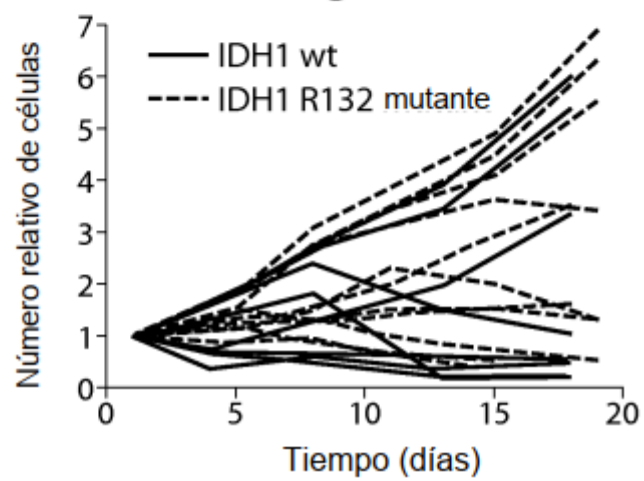
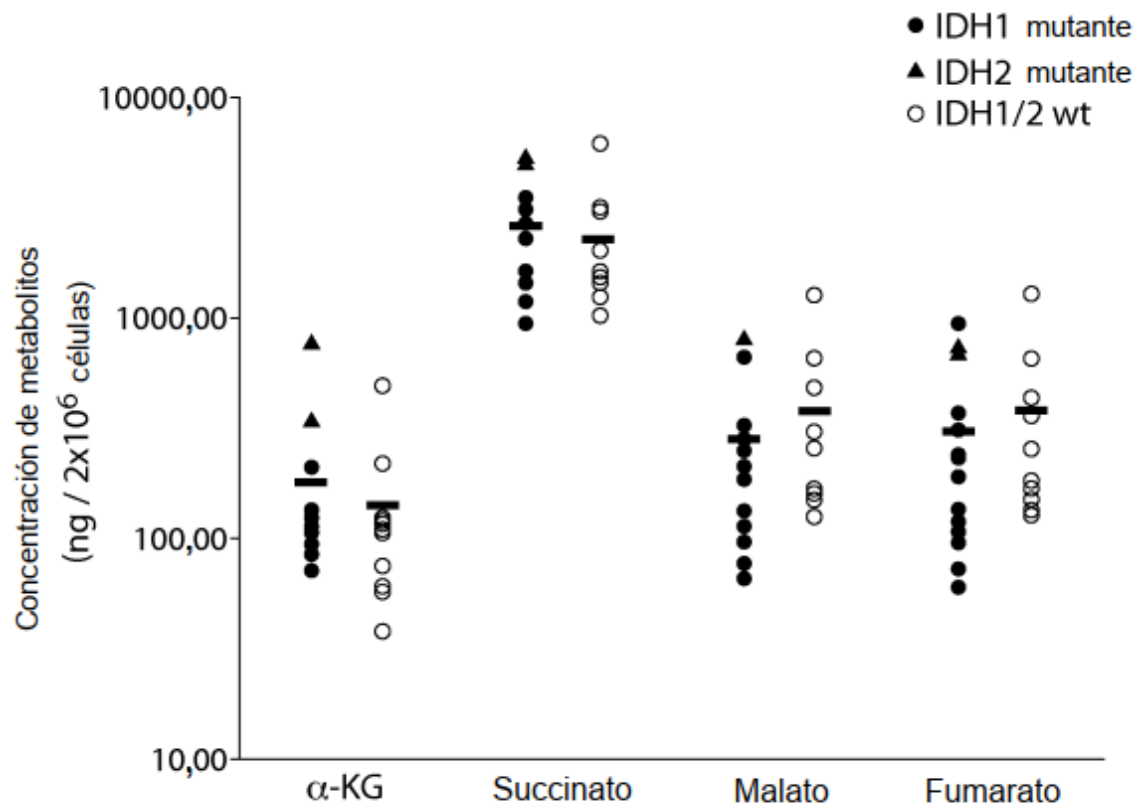


Fig. 36C



Las células AML mutantes de IDH1/2 no presentan niveles alterados de metabolitos de carbono centrales

Fig. 37

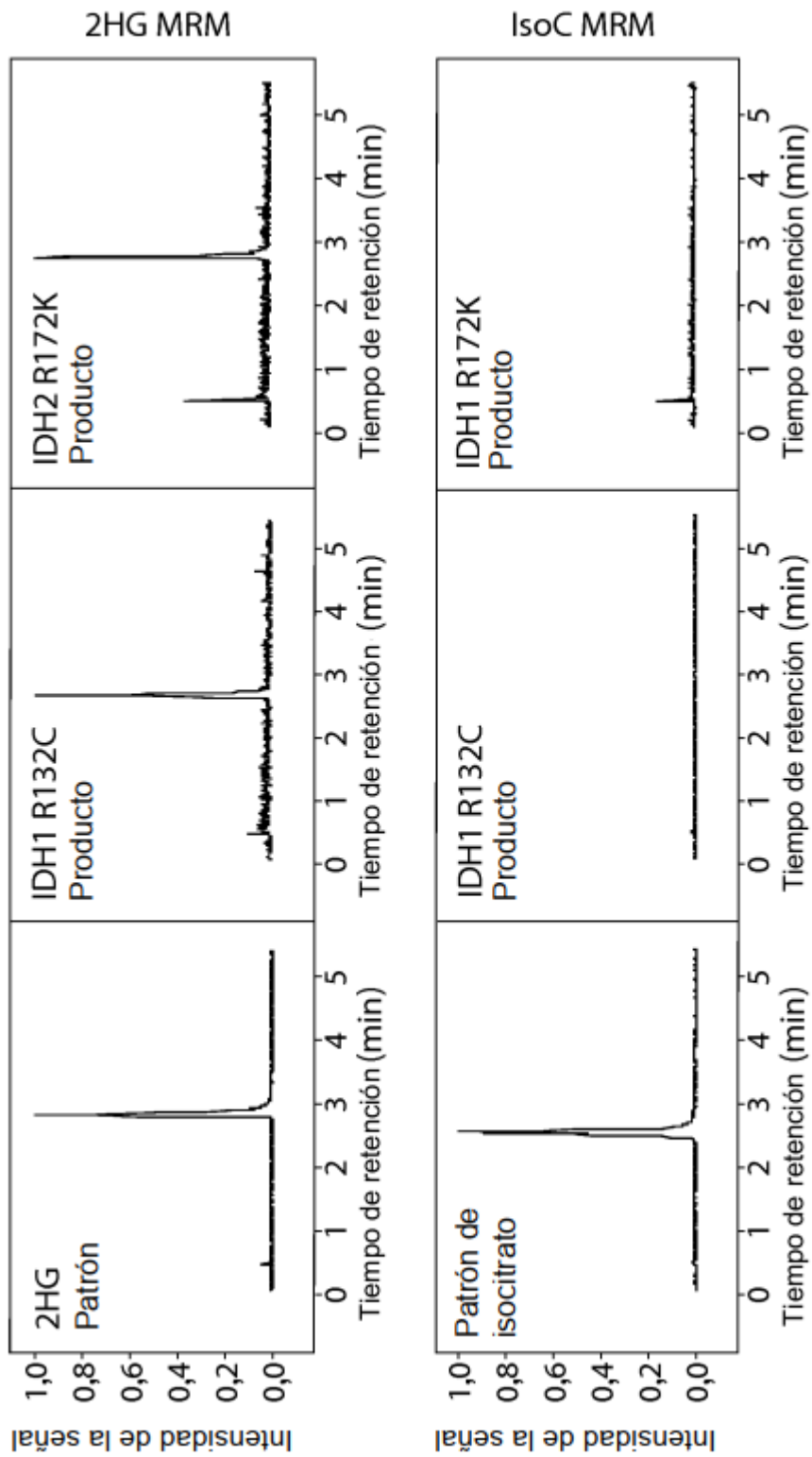


Fig. 38

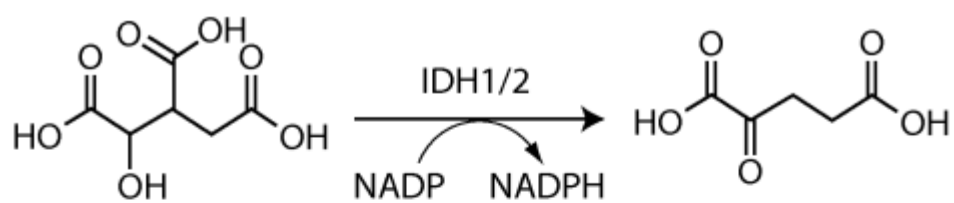


Fig. 39A

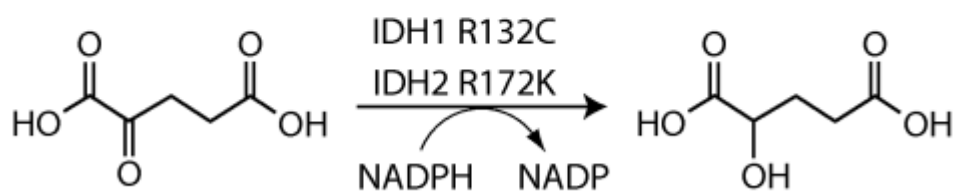


Fig. 39B