(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 396 762**

(51) Int. Cl.:

***A61K 31/397*** (2006.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2005** **E 05852783 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012** **EP 1830838**

(54) Título: **Composiciones y métodos para tratar enfermedades neoplásicas**

(30) Prioridad:

**03.12.2004 US 633161 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**26.02.2013**

(73) Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (50.0%)**
**450 Brookline Avenue**
**Boston, MA 02215, US y**
**NEREUS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**ANDERSON, KENNETH C.;**
**CHAUHAN, DHARMINDER y**
**PALLADINO, MICHAEL A.**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 396 762 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

Composiciones y métodos para tratar enfermedades neoplásicas

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a los campos de la química y la medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades neoplásicas, tales como cáncer.

Descripción de la Técnica Relacionada

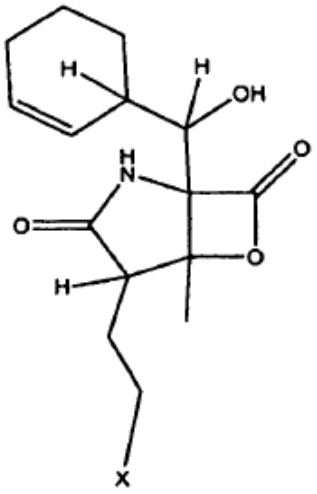
El cáncer es una causa principal de muerte en los Estados Unidos. A pesar de los esfuerzos significativos para encontrar nuevas estrategias para tratar el cáncer, las opciones principales de tratamiento siguen siendo la cirugía, quimioterapia y terapia con radiación, bien solas o en combinación. La cirugía y la terapia con radiación, sin embargo, son útiles generalmente sólo para tipos de cáncer bastante definidos, y tienen un uso limitado para tratar a los pacientes con enfermedad diseminada. La quimioterapia es el método que es útil generalmente para tratar a los pacientes con cáncer metastásico o cánceres difusos tales como leucemias. Aunque la quimioterapia puede proporcionar un beneficio terapéutico, frecuentemente no resulta en la curación de la enfermedad debido a que las células cancerosas del paciente se vuelven resistentes al agente quimioterapéutico.

Por lo tanto, existe una necesidad de quimioterapéuticos adicionales para tratar el cáncer. Se está haciendo un esfuerzo continuo por investigadores individuales, el ámbito académico y empresas para identificar nuevos agentes quimioterapéuticos y anti-microbianos potencialmente útiles.

El desarrollo exitoso de la terapia con Bortezomib/PS-341 para el tratamiento de mieloma múltiple (MM) recidivante/refractario ha establecido la inhibición del proteasoma como una estrategia terapéutica eficaz. El análogo del ácido borónico dipeptídico Bortezomib es un inhibidor del proteasoma potente, altamente selectivo y reversible que está dirigido al complejo del proteasoma 26S e inhibe su función. El proteasoma 26S es una proteasa multicatalítica dependiente de adenosina trifosfato (ATP) que media la degradación de proteínas intracelular. La degradación proteasomal de proteínas mal plegadas o dañadas se realiza por el reconocimiento de proteínas poliubiquitinadas por la subunidad reguladora 19S de la proteasa 26S y la hidrólisis posterior en polipéptidos pequeños. El Bortezomib inhibe principalmente la actividad del proteasoma quimiotríptica, sin alterar la tríptica o semejante a caspasa. Además de inhibir NF-κB, el Bortezomib tiene efectos pleyotrópicos en la biología del MM por estar dirigido a: 1) proteínas reguladoras del ciclo celular; 2) ruta UPR mediante la modulación de la actividad transcripcional del factor de diferenciación de células plasmáticas la proteína-1 de unión a la caja X (XBP-1); 3) apoptosis mediada por p53/MDM2; 4) mecanismos de reparación del ADN; 5) rutas de respuesta al estrés clásicas mediante cascadas de muerte celular tanto intrínsecas (mediadas por caspasa-9) como extrínsecas (mediadas por caspasa-8). Específicamente, el Bortezomib activa JNK, que desencadena la señalización apoptótica mitocondrial: liberación de citocromo-c (cyto-c) y segundo activador mitocondrial de caspasas (Smac) de la mitocondria al citosol, seguido de la activación de caspasa-9 y caspasa-3. Sin embargo, la resistencia tanto intrínseca como adquirida ya se ha observado y no existen terapias para superar la resistencia al Bortezomib actualmente. US 200410138196 describe métodos para tratar un trastorno proliferativo celular con salinosporamidas opcionalmente en combinación con un agente anti-neoplásico adicional.

Resumen de la Invención

Un aspecto de la presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, es un método para tratar una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad neoplásica un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste:



(I)

en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo y en el que la enfermedad neoplásica es resistente a bortezomib, dexametasona o talidomida.

Otro aspecto de la presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, es un método para tratar una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad neoplásica un compuesto de fórmula (I) o una sal o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo, en combinación con bortezomib.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo y bortezomib.

Otro aspecto de la presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, es un método para tratar una enfermedad neoplásica, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad neoplásica una combinación sinérgica de bortezomib con un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.

Descripción Breve de los Dibujos

La FIGURA 1 ilustra la inhibición de actividades de proteasoma semejantes a quimiotripsina, semejantes a caspasa y semejantes a tripsina en proteasoma 20S derivado de eritrocitos humanos por NPI-0052.

La FIGURA 2 ilustra la actividad semejante a quimiotripsina *in vivo* de NPI-0052 en ratones.

La FIGURA 3 representa la autorradiografía obtenida después de tratar células de mieloma múltiple (MM) MM.1S con NPI-0052 (7 nM) e incubar los extractos de proteínas con AdaY($^{125}$I)Ahx$_3$L$_3$VS a 37$^0$C.

La FIGURA 4 representa las inmunotransferencias obtenidas después de tratar células MM.1S con NPI-0052 e incubar con Dansilo-Ahx3L3VS.

La FIGURA 5A ilustra la viabilidad celular de varias líneas celulares de mieloma múltiple tratadas con las dosis indicadas de NPI-0052 durante 24h.

La FIGURA 5B ilustra los ensayos de fragmentación de ADN de apoptosis después del tratamiento con NPI-0052 de células de MM obtenidas de pacientes.

La FIGURA 6 ilustra los ensayos de fragmentación de ADN de apoptosis después del tratamiento con NPI-0052 de células estromales de médula ósea obtenidas de pacientes.

La FIGURA 7 ilustra el ensayo MTT de la viabilidad de células MM.1S después de tratamiento con NPI-0052 o Dex en presencia o ausencia de IL-6 o IGF-I.

La FIGURA 8 ilustra el efecto de NPI-0052 en la migración inducida por VEGF de células MM.1S.

La FIGURA 9 ilustra el efecto de NPI-0052 en la viabilidad de células MM.1S que sobreexpresan Bcl2.

Las FIGURAS 10A y 10B representan el efecto de NPI-0052 en el crecimiento tumoral cuando se administra oralmente a ratones.

La FIGURA 10C ilustra el efecto de NPI-0052 en la supervivencia cuando se administra oralmente a ratones.

La FIGURA 10D ilustra el efecto de NPI-0052 en el peso corporal cuando se administra oralmente a ratones.

La FIGURA 10E ilustra secciones de tejido de sitios de inoculación de ratones tratados con NPI-0052 y tratados con control.

La FIGURA 10F compara el efecto de NPI-0052 y Bortezomib en el crecimiento tumoral cuando se administran i.v. a ratones.

La FIGURA 10G compara el efecto de NPI-0052 y Bortezomib en la supervivencia cuando se administran i.v. a ratones.

La FIGURA 11A ilustra el efecto de NPI-0052 en el potencial de membrana mitocondrial en células MM.1S incubadas con CMXRos.

La FIGURA 11B ilustra el efecto de NPI-0052 en la generación de superóxido en células MM.1S teñidas con el agente de tinción permeable en membranas dihidroetidio (HE).

La FIGURA 11C representa las inmunotransferencias de fracciones de proteínas mitocondriales y citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052.

La FIGURA 11D representa las inmunotransferencias de proteínas citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052 y analizadas con Abs anti-caspasa-9.

La FIGURA 11E representa las inmunotransferencias de proteínas citosólicas obtenidas de células MM.1S tratadas con NPI-0052 y analizadas con Abs anti-caspasa-8.

La FIGURA 11F representa las inmunotransferencias de células de MM, MM.1S o MM.1R tratadas con NPI-0052 y evaluadas para apoptosis con ensayos de escisión tanto de PARP como de caspasa-3.

La FIGURA 12A ilustra la viabilidad de células MM.1S después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib en presencia o ausencia de inhibidor de caspasa-3, caspasa-8 o caspasa-9.

La FIGURA 12B ilustra la viabilidad de células MM.1S para células transfectadas con vector solo, DN-caspasa-8 y DN-caspasa-9 después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

La FIGURA 12C representa las inmunotransferencias de extractos citosólicos de células MM.1S transfectadas con DN-caspasa-8 y DN-caspasa-9 tratadas con dexametasona o MoAb anti-Fas.

La FIGURA 12D ilustra la viabilidad de células MM.1S para células transfectadas con vector o DN-FADD después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

La FIGURA 12E representa las inmunotransferencias de extractos de proteínas mitocondriales de células de MM, MM.1S tratadas con la concentración indicada de NPI-0052 o Bortezomib y analizadas con Abs anti-Bax o anti-Hsp60.

La FIGURA 12F ilustra la viabilidad celular de células fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) con Bax de tipo salvaje o delecionado (inactivado) tratadas con las concentraciones indicadas de NPI-0052 o Bortezomib.

La FIGURA 13 ilustra la viabilidad de linfocitos normales de cinco donantes sanos tratados con las concentraciones indicadas de NPI-0052 o Bortezomib.

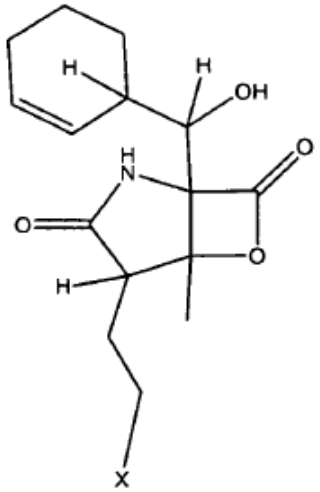
La FIGURA 14A ilustra la viabilidad de células MM.1S para células transfectadas con vector solo o Bcl-2 después de tratamiento con NPI-0052 o Bortezomib.

La FIGURA 14B representa las inmunotransferencias de extractos citosólicos de células MM.1S transfectadas con vector o Bcl-2 tratadas con NPI-0052 o Bortezomib.

La FIGURA 15 ilustra la viabilidad celular de células de MM, MM.1S y MM.1R tratadas con la concentración indicada de NPI-0052, Bortezomib o NPI-0052 + Bortezomib.

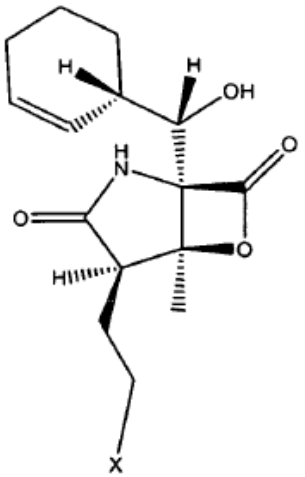
Descripción Detallada de la Realización Preferida

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (I) para uso como se describe en la presente memoria:



**(I)**

en el que X puede ser flúor, cloro, bromo o yodo. En una realización, X es cloro. En una realización, el compuesto de fórmula (I) tiene la estereoquímica según la fórmula (II):



**(II)**

El compuesto de fórmula (II) en el que X=Cl también se refiere en la presente memoria como NPI-0052. Los compuestos según las fórmulas (I) o (II) pueden obtenerse de la fermentación de Salinospora, un actinomicete marino gram-positivo.

También se describen en la presente memoria profármacos, metabolitos, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria.

Un “profármaco” se refiere a un agente que se convierte en el fármaco parental *in vivo*. Los profármacos son útiles frecuentemente porque, en algunas situaciones, pueden ser más fáciles de administrar que el fármaco parental. Pueden, por ejemplo, ser biodisponibles por administración oral mientras que el parental no lo es. El profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas respecto al fármaco parental. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto que se administra como un éster (el “profármaco”) para facilitar la transmisión a través de una membrana celular en el que la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que entonces se hidroliza metabólicamente en el ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula en donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Un ejemplo adicional de un profármaco podría ser un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido en el que el péptido se metaboliza para revelar el resto activo. Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de derivados profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en *Design of Prodrugs*, (ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985).

El término “éster profármaco” se refiere a derivados de los compuestos descritos en la presente memoria formados por la adición de cualesquiera de varios grupos que forman ésteres que se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas. Los ejemplos de grupos éster profármacos incluyen pivoiloximetilo, acetoximetilo, ftalidilo, indanilo y metoximetilo,

así como otros de dichos grupos conocidos en la técnica, incluyendo un grupo (5-R-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo. Otros ejemplos de grupos éster profármaco pueden encontrarse, por ejemplo, en T. Higuchi y V. Stella, en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); y "Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application", editado por E.B. Roche, Pergamon Press: Nueva York, 14-21 (1987) (que proporcionan ejemplos de ésteres útiles como profármacos para compuestos que contienen grupos carboxilo).

Los metabolitos de los compuestos descritos en la presente memoria incluyen especies activas que se producen después de la introducción de los compuestos en el medio biológico.

Cuando los compuestos descritos en la presente memoria tienen al menos un centro quiral, pueden existir como un racemato o como enantiómeros. Debe indicarse que todos estos isómeros y mezclas de éstos están incluidos en el alcance de la presente invención. Además, algunas de las formas cristalinas para los compuestos descritos en la presente memoria pueden existir como polimorfos. Dichos polimorfos están incluidos en una realización de la presente invención. Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes. Dichos solvatos están incluidos en una realización de la presente invención.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto que no causa irritación significativa a un organismo al que se administra y no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto. En algunas realizaciones, la sal es una sal de adición de ácido del compuesto. Las sales farmacéuticas pueden obtenerse haciendo reaccionar un compuesto con ácidos inorgánicos tales como ácido halhídrico (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y semejantes. Las sales farmacéuticas también pueden obtenerse haciendo reaccionar un compuesto con un ácido orgánico tal como ácidos carboxílicos o sulfónicos alifáticos o aromáticos, por ejemplo, ácido acético, succínico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, nicotínico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico o naftalenosulfónico. Las sales farmacéuticas también pueden obtenerse haciendo reaccionar un compuesto con una base para formar una sal tal como una sal de amonio, una sal de metal alcalino, tal como una sal de sodio o potasio, una sal de metal alcalinotérreo, tal como una sal de calcio o de magnesio, una sal de bases orgánicas tal como diciclohexilamina, N-metil-D-glucamina, tris(hidroximetil)metilamina, alquilamina $C_1$-$C_7$, ciclohexilamina, trietanolamina, etilendiamina y sales como aminoácidos tales como arginina, lisina y semejantes.

Si la fabricación de las formulaciones farmacéuticas implica el mezclado íntimo de los excipientes farmacéuticos y el ingrediente activo en su forma de sal, puede ser deseable usar excipientes farmacéuticos que no son básicos, es decir, excipientes bien ácidos o neutros.

En varias realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse solos, en combinación con otros compuestos descritos en la presente memoria, o en combinación con uno o más agentes adicionales activos en las áreas terapéuticas descritas en la presente memoria.

El término "átomo de halógeno", tal y como se usa en la presente memoria, significa uno cualquiera de los átomos radioestables de la columna 7 de la Tabla Periódica de los Elementos, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo, siendo preferidos flúor y cloro.

El término "éster" se refiere a un resto químico con fórmula $-(R)_n$-COOR', en el que R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalicíclico (unido a través de un carbono del anillo) y en el que n es 0 ó 1.

Una "amida" es un resto químico con fórmula $-(R)_n$-C(O)NHR' o $-(R)_n$-NHC(O)R', en el que R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo (unido a través de un carbono del anillo) y heteroalicíclico (unido a través de un carbono del anillo) y en el que n es 0 ó 1. Una amida puede ser una molécula de aminoácido o de péptido unida a una molécula de la presente invención, formando de esta manera un profármaco.

Cualquier cadena lateral amina, hidroxi o carboxilo en los compuestos de la presente invención puede esterificarse o amidificarse. Los procedimientos y grupos específicos que se pueden usar para conseguir este objetivo son conocidos para los expertos en la técnica y pueden encontrarse fácilmente en fuentes de referencia tales como Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1999.

Los términos "purificado", "sustancialmente purificado" y "aislado" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a compuestos descritos en la presente memoria que carecen de de otros compuestos distintos con los que los compuestos de la invención están asociados normalmente en su estado natural, de manera que los compuestos de la invención comprenden al menos 0,5%, 1%, 5%, 10% ó 20% y lo más preferiblemente al menos 50% ó 75% de la masa, en peso, de una muestra dada.

Métodos de Uso

Como se demuestra por los ejemplos presentados en la presente memoria, el compuesto de fórmula (I) inhibe las actividades de proteasoma semejantes a quimiotripsina, semejantes a tripsina y semejantes a caspasa. Por el contrario, se ha mostrado que el Bortezomib inhibe sólo la actividad del proteasoma semejante a quimiotripsina. *Véase* Goldberg, A.L. y Rock, K. (2002) *Nat Med* **8**, 338-40 y Adams, J. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**, 349-60. Además se demuestra que los compuestos de formula (I) tienen un mecanismo de acción diferente que el bortezomib. Además, el compuesto de fórmula (I) induce la apoptosis en varias líneas celulares de mieloma múltiple incluyendo, pero no limitadas a, MM.1S sensible a Dexametasona, MM.1R resistente a Dexametasona, RPMI-8226, OPM2, U266 y Dox-40 resistente a Doxorrubicina. El compuesto de fórmula I también indujo la apoptosis en líneas celulares obtenidas de pacientes con mieloma múltiple humano que habían recaído después de múltiples terapias anteriores con Dexametasona, Bortezomib y talidomida. Así, el compuesto de fórmula (I) es eficaz frente a células de MM que son resistentes a otros agentes quimioterapéuticos, incluyendo Dexametasona, Doxorrubicina, Bortezomib/PS-341 y talidomida.

De acuerdo con esto, en la presente memoria se describe un método para tratar una enfermedad neoplásica que es susceptible a resistencia seleccionada de bortezomib, dexametasona o talidomida que comprende administrar a un paciente, tal como un ser humano, un compuesto de fórmula (I) o una sal o éster profármaco farmacéuticamente aceptable de éste. Por “resistencia al menos a un agente quimioterapéutico” se quiere decir que la administración del agente quimioterapéutico al paciente no resulta en una mejora significativa de los síntomas de la enfermedad neoplásica. Cuando la enfermedad neoplásica se caracteriza por un tumor, “resistencia al menos a un agente quimioterapéutico” significa que la administración del agente quimioterapéutico no resulta en una inhibición apreciable del crecimiento del tumor o reducción del tamaño del tumor. “Resistencia al menos a un agente quimioterapéutico” también puede significar que cuando el agente se expone a células tumorales resistentes, no se induce una apoptosis apreciable. Por “susceptible a” resistencia al menos a un agente quimioterapéutico, se quiere decir que la enfermedad neoplásica es resistente en ese momento al menos al agente quimioterapéutico o que desarrollará resistencia después de la administración repetida del agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de la presente memoria también demuestran que los compuestos de fórmula (I) cuando se combinan con bortezomib desencadenan una apoptosis sinérgica en células de MM. Así, un compuesto de fórmula (I) puede administrarse en combinación con Bortezomib/PS-341 para conseguir la apoptosis usando dosis más bajas de cada agente que si los agentes se administraran separadamente, reduciendo así la toxicidad de los agentes. Sorprendentemente, estos resultados demuestran que puede obtenerse un resultado sinérgico mediante la administración de dos inhibidores de proteasoma diferentes. Por “sinérgico”, se quiere decir que la combinación de dos o más agentes rinde un índice de combinación (CI) < 1,0. También se ha demostrado que la combinación del compuesto de fórmula (I) con agentes inhibidores no de proteasoma proporciona un efecto aditivo. Por “aditivo”, se quiere decir que la combinación de dos o más agentes rinde un CI aproximadamente igual a uno. El CI puede determinarse, por ejemplo, por el método de Chou-Talalay según la ecuación siguiente: “CI = (D)1/Dx)1 + (D)2/(Dx)2 + (D)1(D)2/(Dx)1(Dx)2”, en la que (D)1 y (D)2 son las dosis del fármaco 1 y fármaco 2 que tienen efecto x cuando se usan en combinación; y (Dx)1 y (Dx)2 son las dosis del fármaco 1 y fármaco 2 que tienen el mismo efecto x cuando se usan solos.

En la presente memoria se describe un método para tratar una enfermedad neoplásica que comprende administrar dos o más inhibidores de proteasoma en combinación sinérgica. Los ejemplos no limitativos de clases de inhibidores de proteasoma que pueden combinarse incluyen inhibidores de proteasoma péptido boronato, inhibidores de proteasoma péptido aldehído e inhibidores de proteasoma no péptido. Un ejemplo no limitativo de un inhibidor de proteasoma péptido boronato es bortezomib. Un ejemplo no limitativo de un inhibidor de proteasoma péptido aldehído es MG-132. Los ejemplos no limitativos de inhibidores de proteasoma no péptidos incluyen omuralida y el compuesto de fórmula (I). En una realización de la presente descripción, al menos uno de los inhibidores de proteasoma es un compuesto de fórmula (I) o bortezomib. Por administración en “combinación”, se quiere decir que los dos o más agentes pueden encontrarse en la corriente sanguínea del paciente al mismo tiempo, independientemente de cuándo o cómo se administren realmente. En una realización de la presente descripción, los agentes se administran simultáneamente. En una realización así, la administración en combinación se consigue combinando los agentes en una forma de dosificación única. En otra realización, los agentes se administran secuencialmente. En una realización, los agentes se administran a través de la misma ruta, tal como oralmente. En otra realización, los agentes se administran a través de diferentes rutas, tal como administrándose uno oralmente y administrándose el otro i.v. En una realización ventajosa, las farmacocinéticas de los dos o más agentes son sustancialmente las mismas.

En la presente memoria se describe un método para tratar una enfermedad neoplásica que comprende administrar un compuesto de fórmula (I) en combinación con otro agente quimioterapéutico. En una realización de la presente descripción, el otro agente quimioterapéutico es dexametasona, doxorrubicina o talidomida. En un aspecto de la presente invención, el otro agente quimioterapéutico es bortezomib. En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que combina un compuesto de fórmula (I) con bortezomib.

En algunas realizaciones, la enfermedad neoplásica tratada por cualquiera de los métodos anteriores puede ser un cáncer seleccionado de cáncer de mama, sarcoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer ureteral, cáncer de vejiga,

cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer de cerebro o del sistema nervioso central (SNC). En una realización, la enfermedad neoplásica es un mieloma múltiple.

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende agentes activos de superficie fisiológicamente aceptable, vehículos, diluyentes, excipientes, agentes de suavización, agentes de suspensión, sustancias formadoras de película y auxiliares de recubrimiento o una combinación de éstos; y un compuesto o combinación descrita en la presente memoria. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990). En la composición farmacéutica pueden proporcionarse conservantes, estabilizadores, agentes de tinción, edulcorantes, fragancias, agentes saporíferos y semejantes. Por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico pueden añadirse como conservantes. Además, pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión. En varias realizaciones, pueden usarse alcoholes, ésteres, alcoholes alifáticos sulfatados, y semejantes como agentes activos de superficie; sacarosa, glucosa, lactosa, almidón, celulosa cristalizada, manitol, silicato anhidro ligero, aluminato de magnesio, metasilicato de aluminato de magnesio, silicato de aluminio sintético, carbonato de calcio, carbonato ácido de sodio, hidrógeno fosfato de calcio, carboximetil celulosa de calcio, y semejantes pueden usarse como excipientes; pueden usarse estearato de magnesio, talco, aceite endurecido y semejantes como agentes de suavización; pueden usarse aceite de coco, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, de soja como agentes de suspensión o lubricantes; puede usarse ftalato acetato de celulosa como un derivado de un carbohidrato tal como celulosa o azúcar o puede usarse copolímero de metilacetato-metacrilato como un derivado de polivinilo como agentes de suspensión; y pueden usarse plastificantes como éster de ftalatos y semejantes como agentes de suspensión.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto o combinación de compuestos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como diluyentes o vehículos. La composición farmacéutica facilita la administración del compuesto a un organismo. En la técnica existen múltiples técnicas de administración de un compuesto incluyendo, pero no limitadas a, administración oral, por inyección, por aerosol, parenteral y tópica. Las composiciones farmacéuticas también pueden obtenerse haciendo reaccionar compuestos con ácidos inorgánicos u orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, acido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y semejantes.

El término "vehículo" define un compuesto químico que facilita la incorporación de un compuesto en células o tejidos. Por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) es un vehículo utilizado comúnmente ya que facilita la captación de muchos compuestos orgánicos en las células o tejidos de un organismo.

El término "diluyente" define compuestos químicos diluidos en agua que disolverán el compuesto de interés así como estabilizarán la forma biológicamente activa del compuesto. Las sales disueltas en disoluciones tamponadas se utilizan como diluyentes en la técnica. Una disolución tamponada usada comúnmente es disolución salina tamponada con fosfato porque mimetiza las condiciones de sal de la sangre humana. Como las sales tamponadas pueden controlar el pH de una disolución a concentraciones bajas, un diluyente tamponado raramente modifica la actividad biológica de un compuesto.

El término "fisiológicamente aceptable" define un vehículo o diluyente que no suprime la actividad biológica y propiedades del compuesto.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden administrarse a un paciente humano *per se*, o en composiciones farmacéuticas cuando se mezclan con vehículos o excipientes adecuados. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, 18ª edición, 1990.

Las rutas adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, tópica o intestinal; administración parenteral, incluyendo inyecciones intramuscular, subcutánea, intravenosa, intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Los compuestos también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, incluyendo inyecciones de liberación lenta, bombas osmóticas, píldoras, parches transdérmicos (incluyendo electrotransporte) y semejantes, para administración a intervalos prolongada y/o programada a una velocidad predeterminada.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse de una manera que es conocida en sí misma, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulado, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o formación de comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención pueden formularse así de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que

facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida. Cualquiera de las técnicas, vehículos y excipientes muy conocidos pueden usarse como adecuados y como se entiende en la técnica; por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, anteriormente.

Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de inyección o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, hidrocloruro de cisteína y semejantes. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes tamponadores de pH y semejantes. Los tampones fisiológicamente compatibles incluyen, pero no están limitados a, disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. Si se desea, pueden utilizarse preparaciones potenciadoras de la absorción (por ejemplo, liposomas).

Para la administración transmucosal, en la formulación pueden usarse penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua, incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones de inyección oleaginosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, u otros aceites orgánicos tales como aceites de soja, pomelo o almendra, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores con múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensión de sólidos, suspensiones y semejantes, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal de éstos tal como alginato de sodio. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilen glicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse agentes de tinción o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo. Para este propósito, pueden usarse disoluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilen glicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse agentes de tinción o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas con ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas con ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilen glicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

Para la administración bucal, las composiciones puede tener la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención se administran convenientemente en la forma de una presentación de pulverizador en aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

En la presente memoria se describen además varias composiciones farmacéuticas muy conocidas en la técnica farmacéutica para usos que incluyen administración intraocular, intranasal e intraauricular. Los penetrantes adecuados para estos usos se conocen generalmente en la técnica. Las composiciones farmacéuticas para administración intraocular incluyen disoluciones oftálmicas acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, tal como gotas oculares o en goma gellan (Shedden et al., *Clin. Ther.*, 23(3): 440-50 (2001)) o hidrogeles (Mayer et al., *Ophthalmologica*, 210(2): 101-3 (1996)); pomadas oftálmicas; suspensiones oftálmicas, tales como microparticulados, partículas poliméricas pequeñas que contienen fármaco que están suspendidas en un medio vehicular líquido (Joshi, A., *J. Ocul. Pharmacol.*, 10(1): 29-45 (1994)), formulaciones solubles en lípidos (Alm et al., *Prog. Clin. Biol. Res.*, 312: 447-58 (1989)) y microesferas (Mordenti, *Toxicol. Sci.*, 52(1): 101-6 (1999)); e insertos oculares. Dichas formulaciones farmacéuticas adecuadas se formulan lo más frecuentemente y preferiblemente para ser estériles, isotónicas y tamponadas para estabilidad y confort. Las composiciones farmacéuticas para administración intranasal también puede incluir gotas y pulverizadores preparados frecuentemente para estimular en muchos aspectos las secreciones nasales para asegurar el mantenimiento de la acción ciliar normal. Como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) y muy conocido para los expertos en la técnica, las formulaciones adecuadas son lo más frecuentemente y preferiblemente isotónicas, ligeramente tamponadas para mantener un pH de 5,5 a 6,5 y lo más frecuentemente y preferiblemente incluyen conservantes antimicrobianos y estabilizadores de fármaco apropiados. Las formulaciones farmacéuticas para administración intraauricular incluyen suspensiones y pomadas para aplicación tópica en el oído. Los disolventes comunes para dichas formulaciones auriculares incluyen glicerina y agua.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de actuación prolongada pueden administrarse por implante (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Para los compuestos hidrofóbicos, un vehículo farmacéutico adecuado puede ser un sistema de codisolventes que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. Un sistema de codisolventes común usado es el sistema de codisolventes VPD, que es una disolución de 3% p/v alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar Polisorbato 80™ y 65% p/v polietilen glicol 300, preparado hasta el volumen adecuado en etanol absoluto. Naturalmente, las proporciones de un sistema de codisolventes puede variarse considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes puede variarse: por ejemplo, pueden usarse otros tensioactivos no polares con baja toxicidad en lugar de POLISORBATO 80™; el tamaño de la fracción de polietilen glicol puede variarse; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar el polietilen glicol, por ejemplo, polivinil pirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.

Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración para los compuestos farmacéuticos hidrofóbicos. Los liposomas y emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos o transportadores para la administración de fármacos hidrofóbicos. Determinados disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido también pueden emplearse, aunque habitualmente con el coste de una mayor toxicidad. Además, los compuestos pueden administrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el agente terapéutico. Varios materiales de liberación sostenida se han establecido y son muy conocidos para los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden liberar, dependiendo de su naturaleza química, los compuestos durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de las proteínas.

Los agentes que se pretende administrar intracelularmente pueden administrarse usando técnicas muy conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos agentes pueden encapsularse en liposomas. Todas las moléculas presentes en una disolución acuosa en el momento de la formación de liposomas se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales están protegidos frente al microentorno externo y, debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se administran eficazmente en el citoplasma celular. El liposoma puede recubrirse con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas estarán dirigidos a y serán

captados selectivamente por el órgano deseado. Alternativamente, pueden administrarse directamente intracelularmente moléculas orgánicas hidrofóbicas pequeñas.

Pueden incorporarse agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales en las composiciones farmacéuticas. Alternativamente o adicionalmente, las composiciones farmacéuticas pueden combinarse con otras composiciones que contienen otros agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Métodos de Administración

Los compuestos o composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier medio adecuado. Los ejemplos no limitativos de métodos de administración incluyen, entre otros, (a) administración a través de rutas orales, administración que incluye la administración en cápsula, comprimido, gránulo, pulverizador, jarabe u otras de dichas formas; (b) administración a través de rutas no orales, tales como rectal, vaginal, intraureteral, intraocular, intranasal o intraauricular, administración que incluye la administración como una suspensión acuosa, una preparación oleaginosa o semejantes o como un goteo, pulverización, supositorio, bálsamo, pomada o semejantes; (c) administración mediante inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraorbital, intracapsular, intraespinal, intraesternal, o semejantes, incluyendo administración por bomba de infusión; (d) administración local tal como por inyección directamente en el área renal o cardiaca, por ejemplo, por implante de liberación lenta; así como (e) administración tópica; según consideren apropiado los expertos en la técnica para poner el compuesto de la invención en contacto con tejido vivo.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su propósito pretendido. La cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos descritos en la presente memoria requerida como una dosis dependerá de la ruta de administración, el tipo de animal, incluyendo el ser humano, que se está tratando, y las características físicas del animal específico en consideración. La dosis puede personalizarse para conseguir un efecto deseado, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica médica. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de compuesto eficaz para prevenir, mitigar o mejorar los síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Como será evidente para un experto en la técnica, la dosificación útil *in vivo* que se va a administrar y el modo particular de administración variará dependiendo de la edad, peso y especie de mamífero tratada, los compuestos particulares empleados, y el uso específico para el que se emplean estos compuestos. La determinación de los niveles de dosificación eficaces, esto es los niveles de dosificación necesarios para conseguir el resultado deseado, puede conseguirla un experto en la técnica usando métodos farmacológicos rutinarios. Típicamente, las aplicaciones clínicas humanas de productos comienzan a niveles de dosificación bajos, incrementándose el nivel de dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Alternativamente, pueden usarse estudios *in vitro* aceptables para establecer dosis y rutas de administración útiles de las composiciones identificadas por los presentes métodos usando métodos farmacológicos establecidos.

En estudios con animales no humanos, las aplicaciones de productos potenciales comienzan a niveles de dosificación más altos, disminuyéndose la dosificación hasta que el efecto deseado ya no se consigue o desaparecen los efectos secundarios adversos. La dosificación puede variar ampliamente, dependiendo de los efectos deseados y la indicación terapéutica. Típicamente, las dosificaciones pueden ser entre aproximadamente 10 microgramos/kg y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 100 microgramos/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Alternativamente, las dosificaciones pueden basarse y calcularse tomando como base el área superficial del paciente, como entienden los expertos en la técnica.

La formulación, la ruta de administración y la dosificación exactas para las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden elegirse por el médico individual a la vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al*. 1975, en “The Pharmacological Basis of Therapeutics”. Típicamente, el intervalo de la dosis de la composición administrada al paciente puede ser de aproximadamente 0,5 a 1.000 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede ser una única o una serie de dos o más proporcionadas en el curso de uno o más días, según necesite el paciente. En los casos en los que las dosificaciones humanas para los compuestos se han establecido para al menos alguna afección, la presente invención usará esas mismas dosificaciones, o dosificaciones que son entre aproximadamente 0,1% y 500%, más preferiblemente entre aproximadamente 25% y 250% de la dosificación humana establecida. Cuando no se ha establecido una dosificación humana, como será el caso para compuestos farmacéuticos recién descubiertos, una dosificación humana adecuada puede inferirse de los valores de $DE_{50}$ o $DI_{50}$, u otros valores apropiados derivados de estudios *in vitro* o *in vivo*, según se cualifica por estudios de toxicidad y eficacia en animales.

Debe indicarse que el médico responsable conocerá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la administración debido a toxicidad o disfunciones orgánicas. A la inversa, el médico responsable también sabrá cómo ajustar el tratamiento a niveles mayores si la respuesta clínica no fuera adecuada (toxicidad excluida). La magnitud de una

dosis administrada en la gestión del trastorno de interés variará con la gravedad de la afección que se va a tratar y con la ruta de administración. La gravedad de la afección puede evaluarse, por ejemplo, en parte, por métodos de evaluación de pronóstico estándar. Además, la dosis y quizá la frecuencia de la dosis, también variará según la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. Un programa comparable con el discutido anteriormente puede usarse en la medicina veterinaria.

Aunque la dosificación exacta se determinará individualmente para cada fármaco, en la mayor parte de los casos, pueden hacerse algunas generalizaciones respecto a la dosificación. El régimen de dosificación diario para un paciente humano adulto puede ser, por ejemplo, una dosis oral de entre 0,1 mg y 2.000 mg de cada ingrediente activo, preferiblemente entre 1 mg y 500 mg, por ejemplo, 5 a 200 mg. En otras realizaciones, se usa una dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular de cada ingrediente activo de entre 0,01 mg y 100 mg, preferiblemente entre 0,1 mg y 60 mg, por ejemplo, 1 a 40 mg. En casos de administración de una sal farmacéuticamente aceptable, las dosificaciones pueden calcularse como la base libre. En algunas realizaciones, la composición se administra 1 a 4 veces al día. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden administrarse por infusión intravenosa continua, preferiblemente a una dosis de cada ingrediente activo de hasta 1.000 mg al día. Como entenderán los expertos en la técnica, en determinadas situaciones puede ser necesario administrar los compuestos descritos en la presente memoria en cantidades que superan, o incluso que superan en gran medida, el intervalo de dosificación preferido indicado anteriormente con el fin de tratar eficazmente y agresivamente enfermedades o infecciones particularmente agresivas. En algunas realizaciones, los compuestos se administrarán durante un periodo de terapia continua, por ejemplo, durante una semana o más, o durante meses o años.

La cantidad e intervalo de la dosificación puede ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que son suficientes para mantener los efectos moduladores, o concentración mínima eficaz (MEC). La MEC variará para cada compuesto pero puede estimarse a partir de los datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Sin embargo, pueden usarse ensayos de HPLC o bioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas.

Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor MEC. Las composiciones deben administrarse usando un régimen que mantenga niveles plasmáticos por encima de la MEC durante el 10-90% del tiempo, preferiblemente entre 30-90% y lo más preferiblemente entre 50-90%.

En los casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática.

La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, del peso del sujeto, de la gravedad de la aflicción, de la manera de administración y del criterio del médico que receta.

Los compuestos descritos en la presente memoria pueden evaluarse para eficacia y toxicidad usando métodos conocidos. Por ejemplo, la toxicología de un compuesto particular, o de un subconjunto de los compuestos, que comparten determinados restos químicos, puede establecerse determinando la toxicidad *in vitro* frente a una línea celular, tal como una línea celular de mamíferos, y preferiblemente humana. Los resultados de dichos estudios son frecuentemente predictivos de la toxicidad en animales, tales como mamíferos, o más específicamente, seres humanos, Alternativamente, la toxicidad de los compuestos particulares en un modelo animal, tal como ratones, ratas, conejos o monos, puede determinarse usando métodos conocidos. La eficacia de un compuesto particular puede establecerse usando varios métodos reconocidos, tales como métodos *in vitro*, modelos animales, o ensayos clínicos humanos. Existen modelos *in vitro* reconocidos para casi cada clase de afección, incluyendo pero no limitado a cáncer, enfermedad cardiovascular y varias disfunciones inmunes. De manera similar, pueden usarse modelos animales aceptables para establecer la eficacia de compuestos químicos para tratar dichas afecciones. Cuando se selecciona un modelo para determinar la eficacia, el experto en la técnica puede guiarse por el estado de la técnica para elegir un modelo, dosis y ruta de administración apropiadas y régimen. Por supuesto, también pueden usarse ensayos clínicos humanos para determinar la eficacia de un compuesto en los seres humanos.

Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede comprender por ejemplo una lámina de metal o plástico, tal como un envase en lámina al vacío. El envase o dispositivo dispensador puede acompañarse de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también puede acompañarse de una notificación asociada con el contenedor en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de compuestos farmacéuticos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la forma del fármaco para la administración humana o veterinaria. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser la etiqueta aprobada por la Food and Drug Administration de EEUU para la prescripción de fármacos o el prospecto del producto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, ponerse en un contenedor apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1- Procedimientos Generales

Cultivo celular y reactivos. Las líneas celulares de MM humano, MM.1S sensible a Dex y MM.1R resistente a Dex se obtuvieron del Dr. Steven Rosen (Northwestern University, Chicago, IL). *Véase* Moalli, P.A., Pillay, S., Weiner, D., Leikin, R. y Rosen, S.T. (1992) Blood 79, 213-22 y Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R.L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. y Anderson, K.C. (2002) Blood 100, 2187-94. Las células RPMI-8226 y resistentes a Doxorrubicina (Dox) (Dox-40) se obtuvieron del Dr. William Dalton (Moffit Cancer Center, Tampa, FL). Las líneas celulares de MM U266 y OPM2 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). Las líneas celulares tumorales humanas DU 145, HT-29, Jurkat, LoVo, MDA-MB-231, MIA PaCa-2, NCI-H292, OVCAR-3, PANC-1 y PC-3 se adquirieron de ATCC (Manassas, VA). Las líneas celulares de MM se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado con calor, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, y 2mM de L-glutamina. Las células de MM se aislaron en el momento de pacientes que recaían después de múltiples terapias anteriores incluyendo Dexametasona (Dex), melfalán, talidomida o Bortezomib. Las células de MM se purificaron a partir de muestras de médula ósea de los pacientes por el método de selección de CD138 positivo usando Micro Lechos de CD138 (Syndecan-1) y el separador de células magnético Auto MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). *Véase* Chauchan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R.L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. y Anderson, K.C. (2002) Blood 100, 2187-94. Los fibroblastos de piel humanos normales CCD-27sk se obtuvieron de ATCC y se crecieron en DMEM suplementado todo con 10% FBS inactivado con calor, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 4 mM de L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se trataron con varias concentraciones del compuesto de fórmula II (X=Cl) (Nereus Pharmaceuticals, Inc., San Diego, CA), Bortezomib o Dex (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO).

Viabilidad celular y ensayos de apoptosis. La viabilidad celular se evaluó por el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Chemicon International Inc., Temecula, CA), según las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) y como se describe en Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R.L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. y Anderson, K.C. (2002) Blood 100, 2187-94. Se utilizó ELISAplus de Detección de Muerte Celular para cuantificar la muerte celular, según las instrucciones del fabricante (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN).

Ejemplo 2- Ensayo de actividad del proteasoma 20S *in vitro*

La actividad semejante a quimiotripsina del proteasoma 20S se midió como se describe en Stein, R.L., Melandri, F. y Dick, L. (1996) Biochemistry 35, 3899-908 y Lightcap, E.S., McCormack, T.A., Pien, C.S., Chau, V., Adams, J. y Elliott, P.J. (2000) Clin Chem 46, 673-83. El proteasoma 20S derivado de eritrocitos humano purificado se obtuvo de Biomol, Plymouth Meeting, PA. Las actividades semejante a quimiotripsina, semejante a caspasa y semejante a tripsina del proteasoma 20S se determinaron usando Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC (Boston Biochem, Cambridge, MA) y Boc-LRR-AMC (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA) como sustratos peptídicos, respectivamente. La fluorescencia del sustrato peptídico escindido se midió usando un lector de microplacas de 96 pocillos Fluoroskan Ascent (Thermo Electron, Waltham, MA). Los valores de $CE_{50}$ se calcularon por Prism (Software GraphPad) usando un modelo de pendiente variable de respuesta a la dosis sigmoidal. Los valores de $CE_{50}$ se definieron como la concentración de fármaco a la que se inhibe el 50% de la fluorescencia máxima relativa. Los resultados, representados en la Figura 1, indicaron que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) inhibe las tres actividades del proteasoma, aunque a diferentes concentraciones.

Ejemplo 3- Análisis de actividad del proteasoma 20S *ex vivo* en células de sangre completa en ratones (administración i.v. u oral única)

Para determinar directamente si el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) inhibe la actividad del proteasoma *in vivo*, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se disolvió en 100% DMSO y se diluyó seriadamente con 5% Solutol (Solutol® HS 15; polietilen glicol 660 12-hidroxiestearato, BASF, Shreveport, LA) rindiendo una concentración final de 2% DMSO. El control con vehículo consistió en 2% DMSO y 98% (5% Solutol® HS15). Se trataron ratones machos Swiss-Webster (cinco por grupo, 20-25 gramos de peso) en Bolder BioPATH, Inc. (Boulder, CO) con varias concentraciones del compuesto bien intravenosamente u oralmente a un volumen de 10 mL/kg. Un grupo de animales no se trató para establecer una línea base de actividad del proteasoma. Noventa minutos después de la administración del compuesto, los animales se anestesiaron y se tomó sangre por punción cardiaca. Las células de sangre completa empaquetadas se recogieron por centrifugación, se lavaron con PBS y se congelaron en nieve carbónica para la determinación de actividad del proteasoma *ex vivo*. La actividad semejante a quimiotripsina del proteasoma 20S en lisados de células sanguíneas blancas (WBC) se determinó usando el sustrato peptídico suc-LLVY-AMC. Las Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) se normalizaron usando las concentraciones de proteína de los lisados celulares. La actividad del proteasoma 20S de los ratones individuales se muestra en la Figura 2 con la barra horizontal representando la actividad media. La línea base representa la actividad del proteasoma 20S observada en los lisados de WBC preparados a partir de ratones no tratados. Los resultados, representados en la Figura 2, indican que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) inhibe la actividad semejante a quimiotripsina de los

proteasomas 20S en células sanguíneas blancas de una manera dependiente de la dosis. De forma importante, estos descubrimientos establecen que el compuesto es activo oralmente e inhibe la actividad del proteasoma *in vivo*.

Ejemplo 4- Determinación de alteraciones desencadenadas en la actividad del proteasoma en células de MM (i*n vitro*)

La determinación de si el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) afecta la actividad del proteasoma en células de mieloma múltiple *in vitro* se hizo usando un experimento de competición con $AdaY^{125}Iahx_3L_3VS$. En este ensayo, los sitios que no son diana del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se marcan con $AdaY(^{125}I)Ahx_3L_3VS$ y se visualizan por autorradiografía, mientras que los sitos que son diana del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) no pueden verse en el autorradiograma. Las células de MM, MM.1S se incubaron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 30 mins, 1h, 3h ó 6h y la lisis celular se realizó con lechos de vidrio. Se incubaron 60 µg de extractos de proteína durante 2h con el inhibidor de proteasoma yodado $AdaY^{125}Iahx_3L_3VS$ a $37^0$C. Las proteínas se desnaturalizaron hirviendo en tampón de muestra reductor y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 12,5%, seguido de autorradiografía. Como puede verse en la Figura 3, la subunidad beta-5 (β-5) del proteasoma está mucho menos marcada con $AdaY(^{125}I)Ahx_3L_3VS$ en las células tratadas que en las células control. Como la subunidad β-5 media la actividad semejante a quimiotripsina, estos resultados sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se une a la subunidad β-5, inhibiendo de esta manera la actividad semejante a quimiotripsina en las células MM.1S. Además, el tratamiento de las células MM.1S con el compuesto (7 nM) durante 6h también disminuyó el marcaje de las subunidades β-2 (actividad tríptica) y las subunidades β-1 (actividad semejante a caspasa) (datos no mostrados).

Ejemplo 5- Determinación de alteraciones desencadenadas en la actividad del proteasoma en células de MM (*in vivo*)

La determinación *in vivo* de la actividad del proteasoma se realizó usando un experimento de competición con Dansilo-$Ahx_3L_3VS$, que modifica covalentemente todas las subunidades activas del proteasoma. Este inhibidor contiene un hapteno dansilo sulfonamida hexanoilo que puede visualizarse por inmunotransferencia usando anticuerpos frente al resto dansilo. Las células MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 30 mins, 1h ó 3h, seguido de 1h de incubación con 5 µM de Dansilo-$Ahx_3L_3VS$ a $37^0$C. Las células se lisaron incubándolas durante 30 mins en tampón de lisis NP-40 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40), seguido de 5 min de centrifugación para eliminar las fracciones de membrana, núcleos y restos celulares. Se separaron 60 µg de extracto de proteínas por gel de SDS-PAGE al 12,5%, seguido de análisis por inmunotransferencia usando Ab policlonal anti-dansilo (1:7.500, conejo, Molecular Probes) y anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Southern Biotech). Las transferencias se desarrollaron por quimioluminiscencia aumentada (Western Lightning, Perkin-Elmer). Como puede verse en la Figura 4, el tratamiento de las células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye el marcaje de dansilo$Ahx_3L_3VS$ de las subunidades β-5. Además, el compuesto también disminuyó el marcaje de dansilo$Ahx_3L_3VS$ de las subunidades β-1 y β-2, aunque a concentraciones más altas: 1 nM y 20 nM, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento de las células MM.1S con dosis incluso más altas de Bortezomib no inhibe las subunidades β-2 (datos no mostrados). Tomados en conjunto, estos descubrimientos demuestran la capacidad del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) para inhibir las tres actividades del proteasoma en células de MM.

Ejemplo 6- Efecto en la viabilidad de células de MM

La viabilidad celular se evaluó por el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Chemicon International Inc., Temecula, CA), según las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), y como se describe en Chauhan, D., Catley, L., Hideshima, T., Li, G., Leblanc, R., Gupta, D., Sattler, M., Richardson, P., Schlossman, R.L., Podar, K., Weller, E., Munshi, N. y Anderson, K.C. (2002) Blood 100, 2187-94. La viabilidad celular después del tratamiento de células MM.1S (-■-), MM.1R resistentes a Dex (-□-), RPMI-8226 (-●-), Dox-40 resistentes a Doxorrubicina (-♦-), OPM2 (-○-) y U266 (-◊-) con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) durante 24h se ilustra en la Figura 5A. Los resultados son la media ± S.D de tres experimentos independientes ($P < 0,005$; n= 3 para todas las líneas celulares). Se observó una disminución significativa dependiente de la dosis en la viabilidad celular en todas las líneas celulares (intervalo de $CI_{50}$ 7-24 nM).

Las viabilidad celular también se evaluó en células de MM purificadas de pacientes. Se trataron células tumorales recién aisladas de nueve pacientes con MM que habían recaído después de múltiples terapias anteriores incluyendo Dex, Bortezomib y talidomida con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (10 nM) durante 24h y se analizaron para apoptosis. Como se observa en la Figura 5B, se observó una apoptosis significativa en estas células según se mide por ensayos de fragmentación del ADN ($P<0,005$; n= 2). Los valores representados con la media ± SD de muestras en triplicado. De forma importante, 4 de 9 pacientes examinados eran refractarios a terapia con Bortezomib y 5 pacientes eran resistentes a terapias con Talidomida y Dex. Estos datos sugieren que 1) el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) induce la apoptosis en células de MM sensibles y resistentes a terapias convencionales y con Bortezomib; y 2) la $CI_{50}$ del compuesto para células de MM está dentro de la concentración nanomolar.

Ejemplo 7- Efecto en la viabilidad de Células Estromales de Médula Ósea (BMSC)

Las células de MM se localizan predominantemente en el microentorno de la médula ósea y su interacción con las BMSC induce la producción de citoquinas que median el crecimiento de las células de MM, así como las protegen frente a la apoptosis inducida por fármacos. *Véase* Anderson, K.C. (2003) *Cancer* **97**, 796-801. Por lo tanto, se determinó el efecto del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) en BMSC derivadas de MM de cinco pacientes. Como se observa en la Figura 6, el tratamiento de las BMSC (Pacientes#1-5) con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (20 nM) durante 24h no induce apoptosis en estas células, como se pone de manifiesto por el ensayo de fragmentación del ADN. El control positivo mostrado es un control interno para el ensayo. Las células de MM purificadas (CD138+) de dos de cinco pacientes con MM también se examinaron en los mismos experimentos. Los resultados son la media ± SD de muestras en triplicado. El compuesto desencadenó un incremento significativo (10-12 veces) en la apoptosis de células de MM purificadas (CD138 positivas) de pacientes. Estos resultados sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) actúa directamente en las células de MM, pero no en las BMSC.

Ejemplo 8- Efecto de los anti-apoptóticos interleuquina-6 humana recombinante (rhIL-6) y factor de crecimiento semejante a insulina-I humano recombinante (rhIGF-I)

La adhesión de las células de MM a BMSC induce la secreción de IL-6 e IGF-I por las BMSC, que no sólo regulan el crecimiento de las células de MM sino que también las protegen frente a la quimioterapia. *Véase* Hardin, J., MacLeod, S., Grigorieva, I:; Chang, R., Barlogie, B., Xiao, H. y Epstein, J. (1984) *Blood* **84**, 3063-70 y Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D.W. y Anderson, K.C. (1997) *Blood* **89**, 227-234. Así, se evaluó si rhIL-6 o rhIGF-I inhibe la apoptosis en células de MM inducida por el compuesto de Fórmula (II) (X=Cl). Las células MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) o Dex (0,5 µM) durante 24h, en presencia y ausencia de rhIL-6 (10 ng/ml) o rhIGF (50 ng/ml). A las 24h, las células se recogieron y se analizó la viabilidad por ensayos MTT. Como se observa en la Figura 7, la viabilidad celular media fue 47 ± 2,3% después de tratamiento con el compuesto solo; 51,2 ± 3,2% con el compuesto + rhIL-6 (P= 0,26, ensayo de Wilcoxon) y 50,3% ± 2,0% con el compuesto + rhIGF-I (P= 0,28). La viabilidad media fue 51 ± 2,1% después de tratamiento con Dex y 92 ± 5,5% para Dex + rhIL-6 (P= 0,05, según se determina por el ensayo de la suma de rangos unilateral de Wilcoxon). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes. Estos descubrimientos sugieren que ni IL-6 ni IGF-I bloquean la actividad anti-MM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl). Al contrario y como en otros estudios, tanto IL-6 como IGF-I bloquean la viabilidad disminuida de las células MM.1S inducida por Dex. *Véase* Chauhan, D., Hideshima, T. y Anderson, K.C. (2003) *Int J Hematol* **78**, 114-20 y Mitsiades, C.S. Mitsiades, N., Poulaki, V., Schlossman, R., Akiyama, M., Chauhan, D., Hideshima, T., Treon, S.P., Munshi, N.C., Richardson, P.G. y Anderson, K.C. (2002) *Oncogene* **21**, 5673-83. Así, los datos sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) supera los efectos de crecimiento y protectores de IL-6 e IGF-I en las células de MM e indican mecanismos de acción distintos para el compuesto y Dex frente a las células de MM. Las publicaciones de que altos niveles séricos de IL-6 contribuyen a la quimiorresistencia clínica y fallo del tratamiento, acoplado con la capacidad del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) para inducir apoptosis en células de MM incluso en presencia de IL-6 o IGF-I, sugieren que el compuesto puede superar la resistencia a fármacos en pacientes con MM avanzado. *Véase*, Kyrstsonis, M.C., Dedoussis, G., Baxevanis, C., Stamatelou, M. y Maniatis, A. (1996) *Br J Haematol* **92**, 420-422.

Ejemplo 9- Efecto en la migración de células de MM inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El VEGF está elevado en el microentorno de la médula ósea y desencadena la migración, crecimiento y angiogénesis en células de MM. *Véase* Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B.K., Narsimhan, R.P., Sattler, M., Kijima, T., Salgia, R., Gupta, D., Chauhan, D. y Anderson, K.C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 7875-81. Así, se evaluó si el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) altera la migración de las células de MM inducida por VEGF. La migración inducida por VEGF se examinó en presencia o ausencia del compuesto (7 ó 10 nM). La migración celular se ensayó como se ha descrito anteriormente en Podar, K., Tai, Y.T., Davies, F.E., Lentzsch, S., Sattler, M., Hideshima, T., Lin, B.K., Gupta, D., Shima, Y., Chauhan, D., Mitsiades, C., Raje, N., Richardson, P. y Anderson, K.C. (2001) *Blood* **98**, 428-35. Como se muestra en la Figura 8, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye significativamente (P<0,05) la migración de las células de MM, MM.1S inducida por VEGF. Estos descubrimientos indican que el compuesto puede regular negativamente tanto la migración de retorno de las células de MM a la médula ósea como su salida a la sangre periférica.

Ejemplo 10- Efecto en los efectos protectores mediados por Bcl2

Bcl2 confiere resistencia a las terapias convencionales en células cancerosas, incluyendo MM. *Véase* Cory, S. y Adams, J.M. (2002) *Nat Rev Cancer* **2**, 647-56 y Gazitt, Y., Fey, V., Thomas, C. y Alvarez, R. (1998) *Int J Oncol* **13**, 397-405. Bcl2 puede atenuar modestamente la apoptosis inducida por Bortezomib. Así, se evaluó si la expresión ectópica de Bcl2 en las células MM.1S afecta la capacidad de respuesta al compuesto de fórmula (II) (X=Cl). Las células MM.1S se transfectaron de manera estable con una construcción Bcl2 y se analizaron para alteraciones en la viabilidad celular usando un ensayo MTT. Como se observa en la Figura 9, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye significativamente la viabilidad celular de células MM.1S transfectadas con Bcl2 (P<0,005) de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, el compuesto indujo 15 ± 1,1% menos de muerte celular en las células transfectadas con Bcl2 comparado con las células MM.1S transfectadas con vector vacío. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes. Estos descubrimientos sugieren que el compuesto puede superar la protección mediada por Bcl2.

Ejemplo 11- Evaluación *in vivo* en un modelo tumoral murino

Se obtuvieron ratones de seis semanas de edad triple inmunodeficientes beige-nude-xid (BNX) de Frederick Cancer Research and Development Center (Frederick, MD). Todos los estudios con animales se realizaron según los protocolos aprobados por el Animal Ethics Committee del Dana-Farber Cancer Institute. Los ratones se observaron diariamente para signos de toxicidad. Se hizo hemorragia terminal bajo anestesia usando inhalación de isoflurano y los animales se sacrificaron por asfixia con $CO_2$. Para determinar la actividad anti-MM *in vivo* del compuesto de fórmula (II) (X=Cl), se inocularon en 21 ratones BNX subcutáneamente en el flanco $3x10^7$ células de MM RPMI 8226 en 100 µl de medio RPMI-1640. Cuando los tumores se volvieron mensurables, los ratones se asignaron a grupos de tratamiento que reciben el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) 0,25 mg/kg (n= 7), 0,5 mg/kg (n= 7) o a grupos control (n= 7) que reciben vehículo solo. El tratamiento con fármaco empezó después del desarrollo de tumor mensurable. El fármaco (0,25 mg/kg ó 0,5 mg/kg) se proporcionó oralmente dos veces a la semana. Se hicieron varias medidas con calibrador seriadas de diámetros perpendiculares cada dos días para calcular el volumen tumoral, usando la fórmula siguiente: 4/24 x (diámetro más corto)2 x (diámetro más largo). Los animales se sacrificaron si el tumor tenía ≥2 cm o era necrótico. Para los estudios de crecimiento tumoral, se usaron 7 ratones en cada grupo.

Como se observa en las Figuras 10A-C, el tratamiento de los ratones que presentan tumor con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl), pero no con vehículo solo, inhibe significativamente el crecimiento de tumor MM y prolonga la supervivencia de estos ratones. Todos los ratones en el grupo control desarrollaron tumores progresivos, mientras que se observó una regresión completa de los tumores en el 70% de los ratones tratados. El ratón en el panel superior de la Figura 10B recibió dosis orales de vehículo solo, mientras que el ratón del panel inferior recibió el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (0,25 mg/kg). Los paneles de la izquierda en la Figura 10B son ampliaciones de plasmacitomas subcutáneos que crecen en los flancos derechos de los ratones. La supervivencia se evaluó desde el primer día de tratamiento hasta la muerte; los ratones se sacrificaron cuando los diámetros de su tumor alcanzaron 2 cm o estaban moribundos (Figura 10C). Además, no se observaron cambios de comportamiento neurológico incluso después de 12 semanas de tratamiento. Las concentraciones del compuesto administradas fueron bien toleradas por los ratones, sin evidencia de pérdida de peso. Los ratones tanto en el grupo no tratado como tratado se pesaron cada semana. Los cambios medios en el peso corporal de los ratones se muestran en la Figura 10D.

Los análisis en el día 300 no mostraron recurrencia del tumor en el 57% de los ratones tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (Figura 10C). Además, los análisis histológicos realizados en los sitios de inoculación confirmaron la desaparición de células plasmáticas en los ratones tratados con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl)- frente a los tratados con vehículo (Figura 10E, paneles de la izquierda y la derecha, respectivamente). Estos datos muestran que el compuesto es activo oralmente; inhibe el crecimiento tumoral MM *in vivo*; y prolonga la supervivencia.

Ejemplo 12- Análisis comparativo de actividad antitumoral *in vivo*

Para comparar la actividad *in vivo* del compuesto de fórmula (II) y Bortezomib, los modelos de ratón como se han descrito anteriormente se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (0,15 mg/kg i.v.) o Bortezomib (1,0 mg/kg i.v.) dos veces a la semana. Ambos agentes redujeron significativamente la progresión tumoral ($p<0,01$) y prolongaron la supervivencia ($p= 0,0137$) (Figuras 10F y 10G).

Ejemplo 13- Mecanismos que median la actividad anti-MM

Las mitocondrias juegan un papel crítico en la inducción de la apoptosis durante el estrés. *Véase* Bossy-Wetzel, E. y Green, D.R. (1999) *Mutat Res* **434**, 243-51 y Chauhan, D. y Anderson, K.C. (2003) *Apoptosis* **8**, 337-43. Se trataron células MM.1S sin suero con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 12h y se incubaron con CMXRos durante los últimos 20 min; se tiñeron con el agente de tinción catiónico lipofílico CMXRos (Mitotracker Red) (Molecular Probes, Eugene, OR) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 20 mins a $37^0$C; y se analizaron por citometría de flujo para ensayar alteraciones en $\Delta\Psi m$ (potencial de membrana mitocondrial). La producción de superóxido ($O_2^-$) se midió tiñendo las células con el agente de tinción permeable a membranas dihidroetidio (HE) durante los últimos 15 min. Los aniones superóxido oxidan HE a etidio fluorescente, lo que permite el análisis por citometría de flujo.

Como se observa en las Figuras 11A y 11B, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye $\Delta\Psi m$, evidenciado por un número incrementado de células CMXRos negativas ($P<0,005$, n= 2) y desencadena la producción de $O_2^-$ en células MM.1S. Los resultados son la media ± SD de dos experimentos independientes. Las alteraciones en $\Delta\Psi m$ están asociadas con la liberación de las proteínas mitocondriales cyto-c y Smac en el citosol, desencadenando de esta manera la caspasa 9 y caspasa-3. *Véase* Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. y Wang, X. (2000) *Cell* **102**, 33-42 y Liu, X., Naekyung Kim, C., Yang, J., Jemmerson, R. y Wang, X. (1996) *Cell* **86**, 147-157.

Como se observa en la Figura 11C, el tratamiento de las células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) desencadena una disminución de cyto-c (panel izquierdo superior) y smac (panel derecho superior) mitocondriales y un incremento concurrente de estas proteínas en las fracciones citosólicas (paneles izquierdo y derecho de la parte media, respectivamente). El reensayo de las inmunotransferencias con los Abs anti-Hsp60 (panel izquierdo inferior) y anti-tubulina (panel derecho inferior) confirma la pureza de los extractos mitocondriales y la misma carga de

proteínas. La liberación de las proteínas apoptogénicas mitocondriales cyto-c y Smac/DIABLO induce la activación de las caspasas-9 y 3. Las células MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 24h y se recogieron; las fracciones de proteínas mitocondriales y citosólicas se separaron por SDS-PAGE al 12,5% y se analizaron por inmunotransferencia con Abs ant-cyto-c (panel superior) o anti-Smac (panel medio). Como un control para la misma carga de proteínas y pureza de las fracciones mitocondriales, los filtros también se volvieron a ensayar con Abs anti-tubulina (panel derecho inferior) y anti-Hsp60 (panel izquierdo inferior), respectivamente. Las transferencias son representativas de tres experimentos independientes.

Las células MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 24h y se recogieron; las proteínas citosólicas se separaron por SDS-PAGE al 12,5% y se analizaron por inmunotransferencia con Abs anti-caspasa-8 y Abs anti-caspasa-9. Como se observa en la Figura 11D, el tratamiento de las células MM.1S con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) induce la escisión proteolítica de la caspasa-9. Además, el compuesto también activa la caspasa-8 (Figura 11E). Se sabe que tanto la caspasa-9 (dependiente de mitocondrias) como la caspasa-8 (independiente de mitocondrias) escinden proteolíticamente y activan un efector aguas abajo común, la caspasa-3, que resulta en la escisión de PARP. *Véase* Miller, L.K. (1999) *Trends Cell Biol* **9**, 323-8. Así, las células de MM, MM.1S o MM-1R se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (7 nM) durante 24h y se evaluaron para apoptosis por ensayos de escisión tanto de PARP como de caspasa-3. Los lisados de proteína total se sometieron a análisis por SDS-PAGE. El análisis por inmunotransferencia de los lisados se realizó con Abs anti-PARP (panel superior) o anti-caspasa-3 (panel inferior). “FL” indica “longitud completa” y “CF” indica fragmento escindido. Estos datos muestran adicionalmente que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) desencadena la escisión de la caspasa-3 y PARP (Figura 11F).

El análisis por inmunotransferencia se realizó usando anticuerpos frente a citocromo-c, Smac, Caspasa-8, 9 ó 3 (Cell Signaling, Beverly, MA), tubulina (Sigma, St. Louis, MO), PARP, Hsp60 o Bax (BD Bioscience Pharmigen, San Diego, CA). Las transferencias se desarrollaron por quimioluminiscencia aumentada (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL).

Ejemplo 14- Diferencias mecanísticas de la apoptosis de células de MM comparado con bortezomib

Las células MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib en presencia o ausencia de inhibidor de caspasa-9 (LEHD-FMK), inhibidor de caspasa-8 (IETD-fmk) o inhibidor de caspasa-3 (Z-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona, z-VAD-fmk). Como se observa en la Figura 12A, la inhibición de la caspasa-3 suprime en gran medida tanto la apoptosis inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) como por Bortezomib. Los resultados son la media ± SD de cuatro experimentos independientes ($P<0,004$). El bloqueo de la caspasa-8 dio lugar a una disminución significativa en la muerte celular desencadenada por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) ($P<0,005$, $n=4$), mientras que la inhibición de la caspasa-9 sólo bloqueó moderadamente la viabilidad disminuida de las células MM.1S desencadenada por el compuesto. Por el contrario, la disminución inducida por Bortezomib en la viabilidad de las células MM.1S se bloquea igualmente en presencia del inhibidor de caspasa-8 o caspasa-9 ($P<0,005$). Conjuntamente, estos datos sugieren que la activación de caspasa-8 y caspasa-9 contribuye igualmente durante la muerte celular desencadenada por Bortezomib, mientras que la apoptosis desencadenada por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se produce principalmente a través de la ruta de señalización de la caspasa-8.

Estos datos bioquímicos se confirmaron por estudios genéticos usando estrategias dominantes negativas (DN). Las células MM.1S también se transfectaron temporalmente usando el kit V Cell line Nucleofecto, según las instrucciones del fabricante (Amaxa Biosystems, Alemania), con vector solo, DN-caspasa-8, DN-caspasa-9 o DN-FADD y se cotransfectaron con vector que contiene proteína verde fluorescente (GFP) sola. Después de las transfecciones, las células GFP-positivas se seleccionaron por citometría de flujo, se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib y se analizaron para viabilidad. El tratamiento de las células de MM transfectadas con DN-caspasa-8 con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (CI50, 7 nM) incrementó en gran medida la supervivencia de estas células, comparado con las células transfectadas con DN-caspasa-9 (Figura 12B). Por el contrario, el tratamiento de células MM.1S transfectadas con DN-caspasa-8 o DN-caspasa-9 con Bortezomib (CI50, 5 nM) incrementó la supervivencia en un grado similar. La especificidad funcional de DN-caspasa-8 y DN-caspasa-9 se confirmó por tratamiento de las células MM.1S con inductores conocidos de caspasa-9 (Dex) y caspasa-8 en estas células (MoAb anti-Fas) (Chauhan et al., 1997) (Figura 12C). Estos datos sugieren que (1) la apoptosis de las células de MM inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) está mediada principalmente por la caspasa-8; y (2) la apoptosis inducida por Bortezomib requiere tanto la activación de la caspasa-8 como de la caspasa-9.

A continuación se determinó si la inhibición de una ruta de señalización aguas arriba que da lugar a la activación de la caspasa-8 influye en la respuesta al compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib. La proteína del dominio de muerte asociado con fas (FADD) es una parte importante de los complejos de señalización que inducen la muerte (DISC) que se ensamblan después de la unión de los miembros de la familia del receptor de TNF, tales como Fas, lo que resulta en el procesamiento proteolítico y autoactivación de pro-caspasa-8. Como tanto el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) como Bortezomib desencadenan la activación de la caspasa-8, se evaluó el papel de FADD durante este evento en las células de MM usando DN-FADD. El bloqueo de FADD con DN-FADD atenuó significativamente la citotoxicidad inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) comparado con las células MM.1S transfectadas con vector vacío (42% ± 2,0% células viables en células transfectadas con vector frente a 76% ± 5,1% células viables en células transfectadas con DN-FADD; $p<0,05$) (Figura 12D). DN-FADD disminuyó la activación de caspasa-8 inducida

por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl); sin embargo, todavía se observó una activación mínima de la caspasa-8 (datos no mostrados), lo que puede deberse a activadores de caspasa-8 aguas arriba distintos de FADD. De forma importante, el tratamiento de células MM.1S transfectadas con DN-FADD con Bortezomib resultó sólo en un 16% de incremento en la supervivencia comparado con las células transfectadas con vector (39% ± 2,4 células viables en células transfectadas con vector frente a 55% ± 4,1 células viables en células transfectadas con DN-FADD; p<0,05) (Figura 12D). Estos datos, acoplados con los estudios de inhibición de caspasa-8 o caspasa-9, sugieren que el compuesto de fórmula (II) se basa más en el eje de señalización FADD-caspasa-8 de lo que lo hace el Bortezomib, lo que confirma adicionalmente el mecanismo de acción diferencial del compuesto de fórmula (II) frente a Bortezomib en células de MM.

Estudios previos han establecido que Bax induce la ruta apoptótica mitocondrial. *Véase* Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. y Korsmeyer, S.J. (2001) Science **292**, 727-30 y Lei, K., Nimnual, A., Zong, W.X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B., Bar-Sagi, D. y Davis, R.J. (2002) Mol Cell Biol **22**, 4929-42. Así, se evaluó si la apoptosis de las células de MM inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se correlaciona con alteraciones en Bax. Las células de MM, MM.1S se trataron con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o con Bortezomib y los extractos de proteínas mitocondriales se sometieron a análisis por inmunotransferencia con Abs anti-Bax o anti-Hsp60. Como se observa en la Figura 12E, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) induce un incremento pequeño, si es que induce alguno, en los niveles de Bax en la mitocondria. Las transferencias son representativas de tres experimentos independientes. De forma importante, Bortezomib desencadena una acumulación significativa de Bax en la mitocondria.

Se trataron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) que portan Bax de tipo salvaje o inactivaciones con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib durante 48h y se analizaron para viabilidad celular por ensayos MTT. Como se observa en la Figura 12F, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) disminuye la viabilidad tanto en Bax (WT) como Bax (inactivado), mientras que la deleción de Bax confiere una resistencia significativa a Bortezomib. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (P<0,05). Estos datos muestran el requerimiento diferencial de Bax durante la apoptosis inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y Bortezomib y sugieren un mecanismo de acción distinto de estos agentes.

Ejemplo 15- Efectos diferenciales en linfocitos normales comparado con bortezomib

La terapia con Bortezomib está asociada con toxicidad en pacientes. Así, se compararon los efectos del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y Bortezomib en células normales. Los linfocitos de cinco donantes sanos se trataron con varias concentraciones (0-20 nM) del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib (0-20 nM) durante 72h y se analizaron para citotoxicidad por un ensayo MTT. Como se observa en la Figura 13, el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) no disminuye significativamente la supervivencia de linfocitos normales (P= 0,27 de ensayo de tendencia J-T), incluso a las dosis más altas (20 nM). Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes. Por el contrario, Bortezomib disminuye significativamente la viabilidad de los linfocitos incluso a las concentraciones más bajas de 6-10 nM. Debe indicarse que la $CI_{50}$ de las células de MM del paciente se alcanza a concentraciones del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) que no tienen efecto en los linfocitos normales, mientras que la $CI_{50}$ de Bortezomib para las células de MM desencadena un 50% de disminución en la viabilidad de los linfocitos normales. Conjuntamente, estos datos sugieren que el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) tiene una actividad anti-MM selectiva; y particularmente, es menos tóxico para las células normales que el Bortezomib.

También se examinó si el compuesto de fórmula (II) o Bortezomib altera la actividad del proteasoma en los linfocitos normales y los fibroblastos de piel. Tanto el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) como Bortezomib inhibieron significativamente la actividad del proteasoma en estas células: 20 nM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) o Bortezomib desencadenaron 99% ó 59 ± 11% de inhibición de actividad del proteasoma semejante a quimiotripsina, respectivamente (datos no mostrados). Así, aunque 20 nM del compuesto de fórmula (II) (X=Cl) no desencadenó una citotoxicidad significativa en los linfocitos normales, redujo la actividad del proteasoma semejante a quimiotripsina en estas células. De manera similar, el tratamiento de fibroblastos normales CCD-27sk a la CI50 para el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (317 nM) o Bortezomib (15 nM) también inhibió la actividad del proteasoma (datos no mostrados).

Ejemplo 16- Efectos diferenciales en células de MM que sobreexpresan Bcl-2 comparado con bortezomib

Durante la apoptosis, Bax neutraliza la función antiapoptótica de Bcl-2, facilitando de esta manera la liberación de cyto-c y la activación de la caspasa-9. Bcl-2 también confiere resistencia fármacos en células cancerosas, incluyendo MM, y proporciona protección parcial frente a la muerte inducida por Bortezomib. Por lo tanto, se evaluó si la expresión ectópica de Bcl-2 en células MM.1S afecta la capacidad del compuesto de fórmula (II) o Bortezomib para desencadenar la citotoxicidad y señalización apoptótica postmitocondrial en células de MM. La sobreexpresión de Bcl-2 estimuló un incremento modesto en la viabilidad de las células tratadas con ambos agentes: para el compuesto de fórmula (II) (X=Cl), 50% ± 2,6% de viabilidad en células transfectadas con Bcl-2 frente a 39% ± 1,5% de viabilidad en células transfectadas con vector (p<0,05) y para Bortezomib, 61% ± 2,9% de viabilidad en células transfectadas con Bcl-2 frente a 40% ± 2,1% de viabilidad en células transfectadas con vector (p<0,05) (Figura 14A). La supervivencia incrementada de los transfectantes Bcl-2 en respuesta a Bortezomib fue mayor (21%) que la de en respuesta al compuesto de fórmula (II) (X=Cl) (11%) (p<0,04; n= 3) (Figura 14A). Además, el Bortezomib

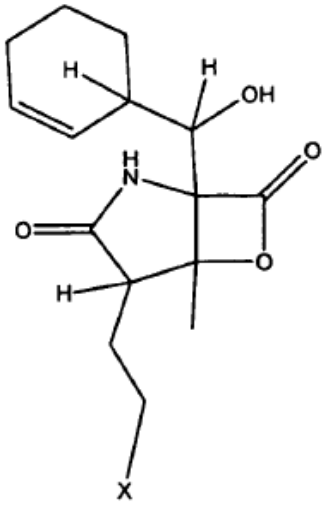
desencadenó una escisión significativa de caspasa-9 en células transfectadas con vector control, que se atenúa en gran medida (disminución de 3 veces por densitometría) en células transfectadas con Bcl-2; por el contrario, la escisión de la caspasa-9 inducida por el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) se ve afectada mínimamente por la sobreexpresión de Bcl-2 (Figura 14B). Estos descubrimientos, conjuntamente con los resultados de viabilidad, sugieren que Bcl-2 proporciona más protección frente a Bortezomib que el compuesto de fórmula (II).

Ejemplo 17- Tratamiento de combinación

Como se observa en la Figura 15, el tratamiento de células de MM, MM.1S o MM-1R con el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) en combinación con Bortezomib durante 24h induce una inhibición del crecimiento sinérgica. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (P<0,005). La interacción entre los agentes anti-MM de fórmula (II) (X=Cl) y Bortezomib se analizó usando análisis de isobolograma con el programa informático “CalcuSyn” (Biosoft, Ferguson, MO y Cambridge, Reino Unido). Los datos del ensayo de viabilidad celular (MTT) se expresaron como la fracción de células con crecimiento afectado (FA) en células tratadas con fármaco frente a no tratadas. El programa CalcuSyn se basa en el método de Chou-Talalay según la ecuación siguiente: “CI= (D)1/(Dx)1 + (D)2/(Dx)2 + (D)1(D)2/(Dx)1(Dx)2”, en la que (D)1 y (D)2 son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 que tienen efecto x cuando se usan en combinación; y (Dx)1 y (Dx)2 son las dosis del fármaco 1 y el fármaco 2 que tienen el mismo efecto x cuando se usan solos. Cuando CI= 1, esta ecuación representa el isobolograma de conservación e indica efectos aditivos. Los valores de CI de < 1,0 indican sinergismo. Un índice de combinación (CI) < 1,0 se obtuvo para Bortezomib + NPI-0052, lo que indica sinergismo. Además, se observó una actividad anti-MM máxima cuando se proporcionaron concomitantemente, en lugar de otros programas de tratamiento. Las dosis bajas de compuesto de fórmula (II) (X=Cl) y Bortezomib combinado no afectan significativamente la viabilidad de PBMNC normales (datos no mostrados). La terapia de combinación con Bortezomib y el compuesto de fórmula (II) (X=Cl) puede por lo tanto: 1) permitir el uso de concentraciones sub-tóxicas de cada agente; 2) retrasar o prevenir el desarrollo de la resistencia a fármacos; y 3) permitir aumentar las dosis sinérgicas de estos agentes para incrementar el umbral apoptótico.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste:




**(I)**

en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad neoplásica que es resistente a bortezomib, dexametasona o talidomida,

en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que X es cloro.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) es Salinosporamida A.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer.

5. El uso de la reivindicación 4, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, sarcoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer ureteral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer de cerebro o del sistema nervioso central (SNC).

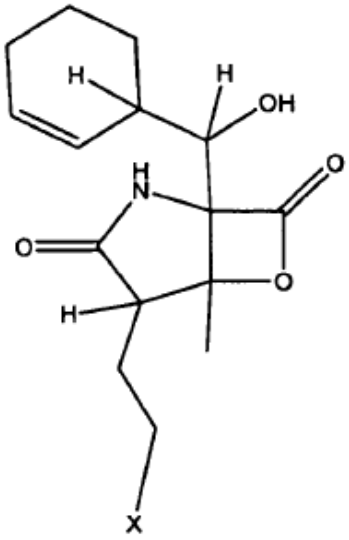
6. El uso de la reivindicación 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y un carcinoma de ovario o melanoma.

7. El uso de la reivindicación 6, en el que el cáncer es un mieloma múltiple.

8. El uso de la reivindicación 1, en el que el paciente es un ser humano.

9. El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad neoplásica es resistente a bortezomib.

10. Uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste:




**(I)**

en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad neoplásica en combinación con bortezomib,

en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo.

11. El uso de la reivindicación 10, en el que X es cloro.

12. El uso de la reivindicación 10, en el que el compuesto de fórmula (I) es Salinosporamida A.

13. El uso de la reivindicación 10, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer.

14. El uso de la reivindicación 13, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, sarcoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer ureteral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer de cerebro o del sistema nervioso central (SNC).

15. El uso de la reivindicación 14, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y un carcinoma de ovario o melanoma.

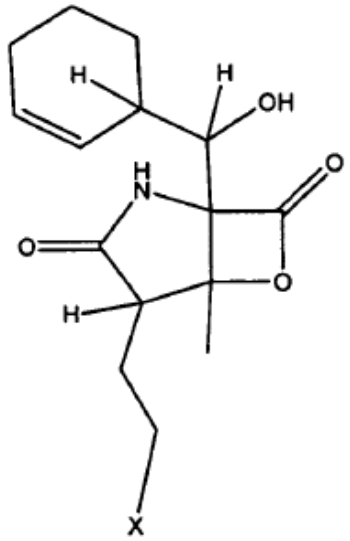
16. El uso de la reivindicación 15, en el que el cáncer es un mieloma múltiple.

17. El uso de la reivindicación 10, en el que el paciente es un ser humano.

18. El uso de la reivindicación 10, en el que la combinación es sinérgica.

19. Una composición farmacéutica, que comprende:

un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste:

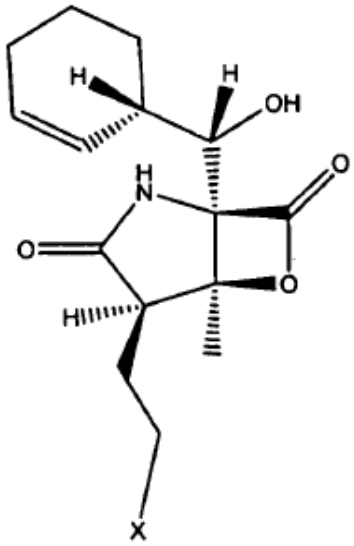



**(I)**

en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo; y bortezomib.

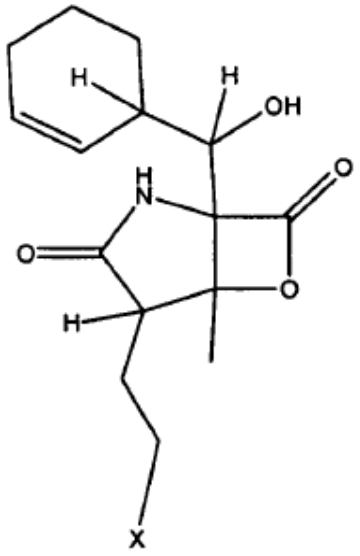
20. La composición de la reivindicación 19, en la que X es cloro.

21. La composición de la reivindicación 19, en la que el compuesto de fórmula (I) tiene la estructura de fórmula (II):




**(II)**

22. Uso de una combinación sinérgica de bortezomib con un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de éste:




**(I)**

en el que X se selecciona del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo o yodo, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad neoplásica.

23. El uso de la reivindicación 22, en el que la enfermedad neoplásica es cáncer.

24. El uso de la reivindicación 23, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, sarcoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer ureteral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer endocrino, cáncer de piel, melanoma, angioma y cáncer de cerebro o del sistema nervioso central (SNC).

25. El uso de la reivindicación 24, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, carcinoma colorrectal, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y un carcinoma de ovario o melanoma.

26. El uso de la reivindicación 25, en el que el cáncer es un mieloma múltiple.

27. El uso de la reivindicación 22, en el que el paciente es un ser humano.

28. El uso de la reivindicación 22, en el que el compuesto de fórmula (I) es Salinosporamida A.

FIGURA 1

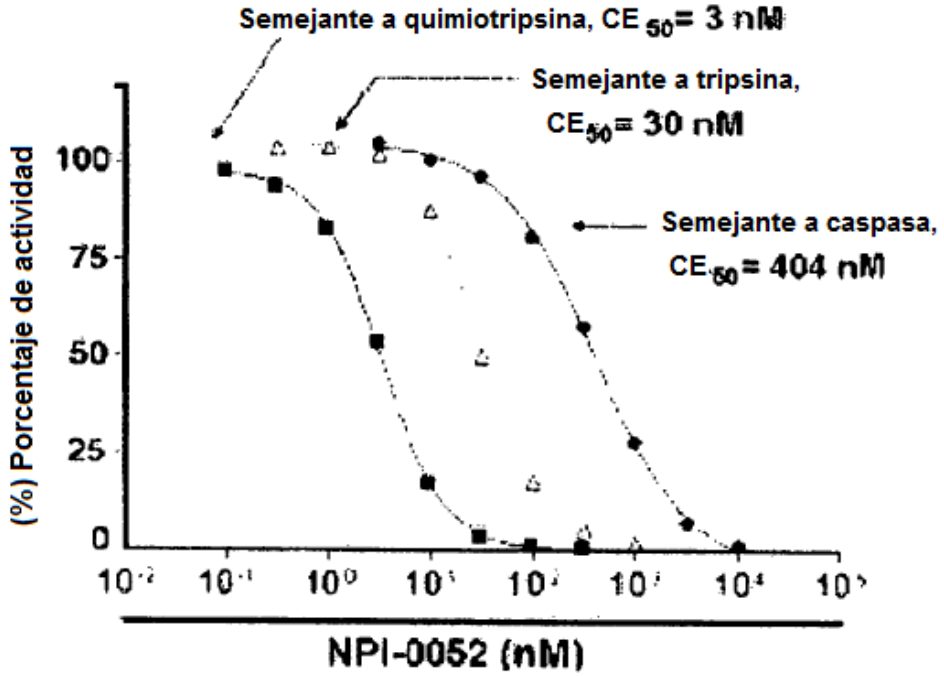

Semejante a quimiotripsina, CE 50= 3 nM
Semejante a tripsina,
CE50= 30 nM
Semejante a caspasa,
CE50= 404 nM
(%) Porcentaje de actividad
100
75
50
25
0
NPI-0052 (nM)

FIGURA 2

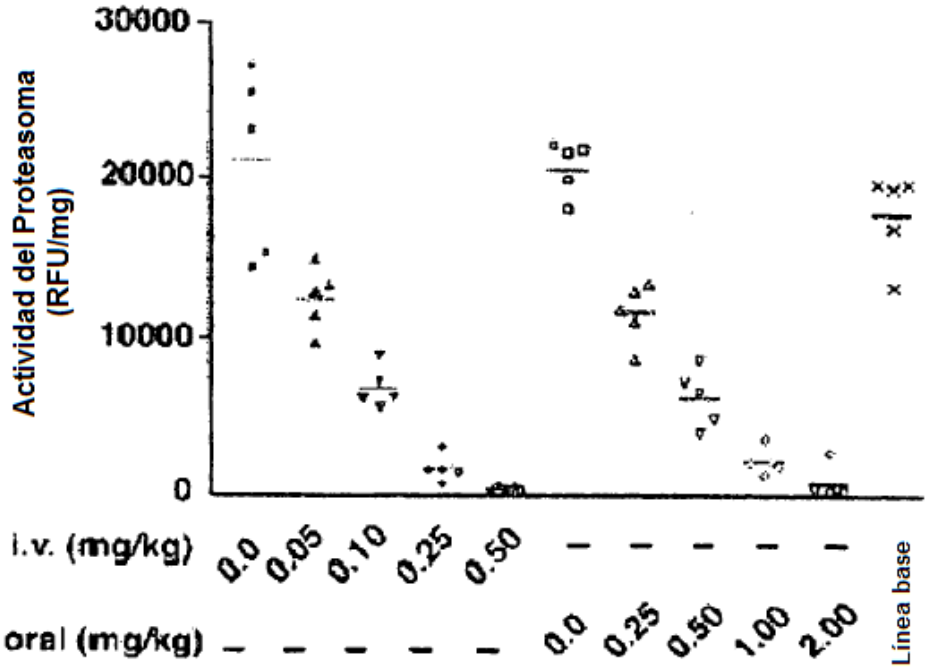

Actividad del Proteasoma (RFU/mg)
30000
20000
10000
0
i.v. (mg/kg)
0.0
0.05
0.10
0.25
0.50
oral (mg/kg)
0.0
0.25
0.50
1.00
2.00
Línea base

FIGURA 3

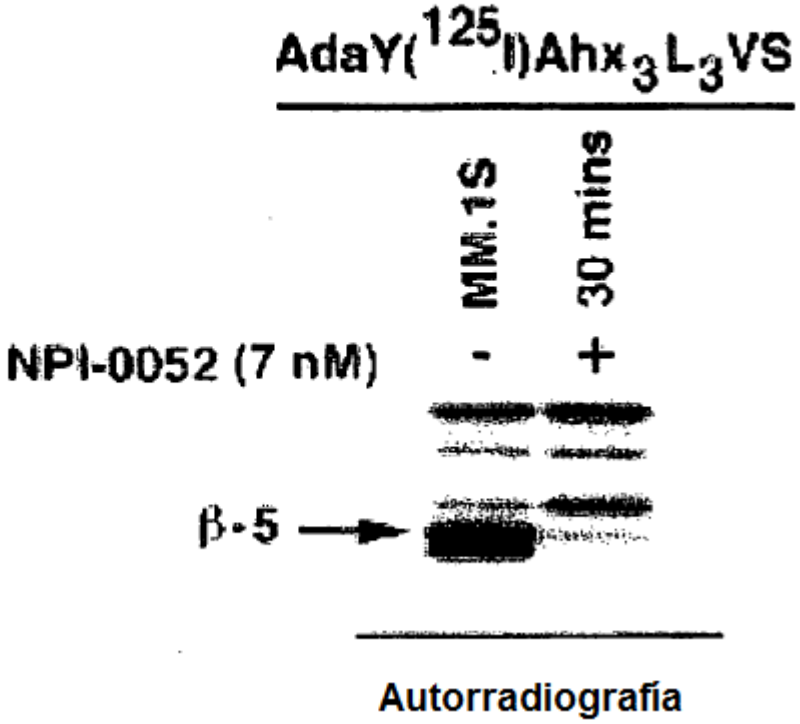

AdaY($^{125}$I)Ahx$_3$L$_3$VS
MM.1S
30 mins
NPI-0052 (7 nM)
-
+
β-5
Autorradiografía

FIGURA 4

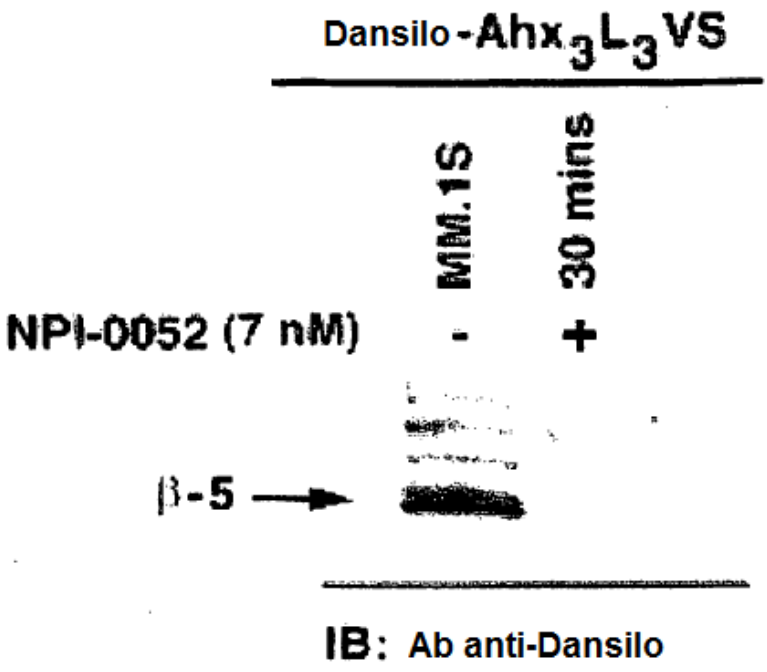

Dansilo-Ahx3L3VS
MM.1S
30 mins
NPI-0052 (7 nM)
-
+
β-5
IB: Ab anti-Dansilo

FIGURA 5A

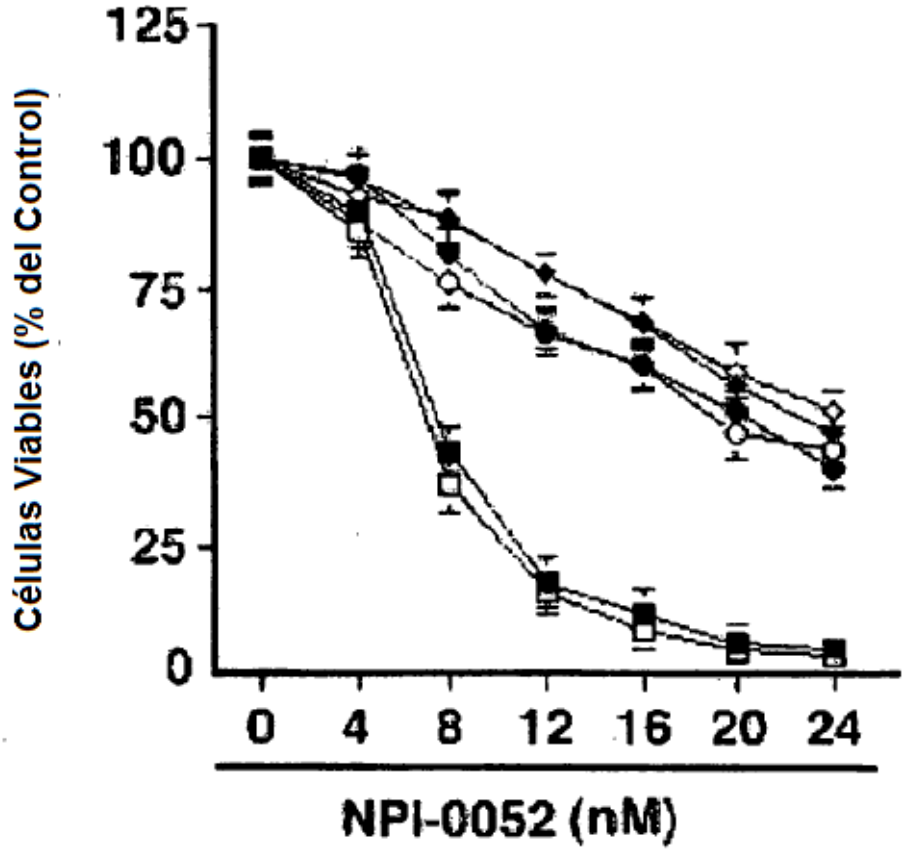

125
100
75
50
25
0
Células Viables (% del Control)
0
4
8
12
16
20
24
NPI-0052 (nM)

FIGURA 5B

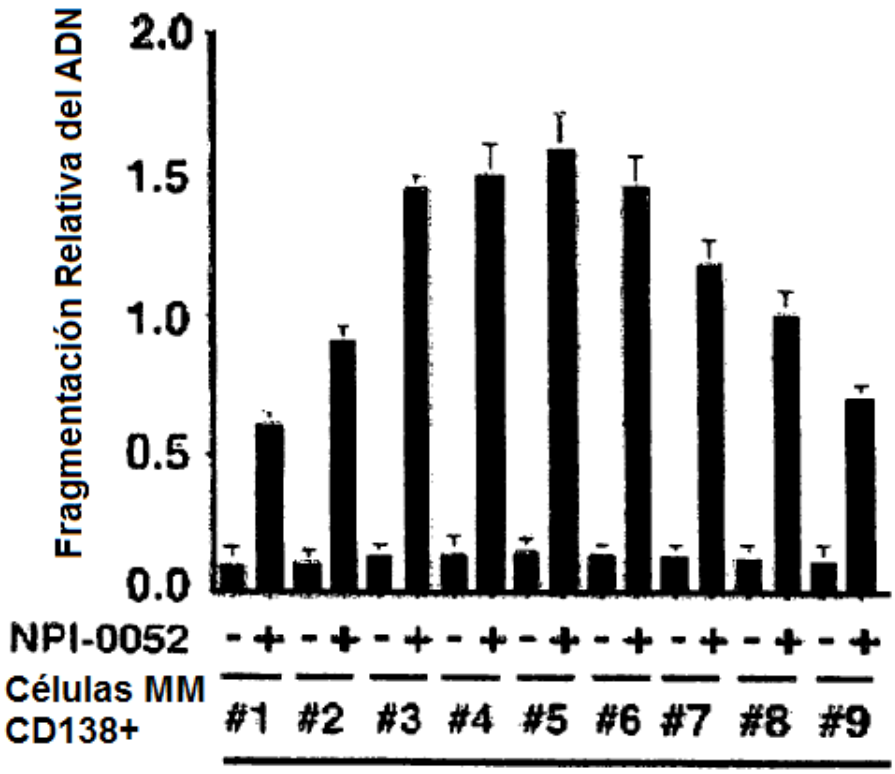

Fragmentación Relativa del ADN
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NPI-0052
- + - + - + - + - + - + - + - + - +
Células MM
CD138+
#1 #2 #3 #4 #5 #6 #7 #8 #9

FIGURA 6

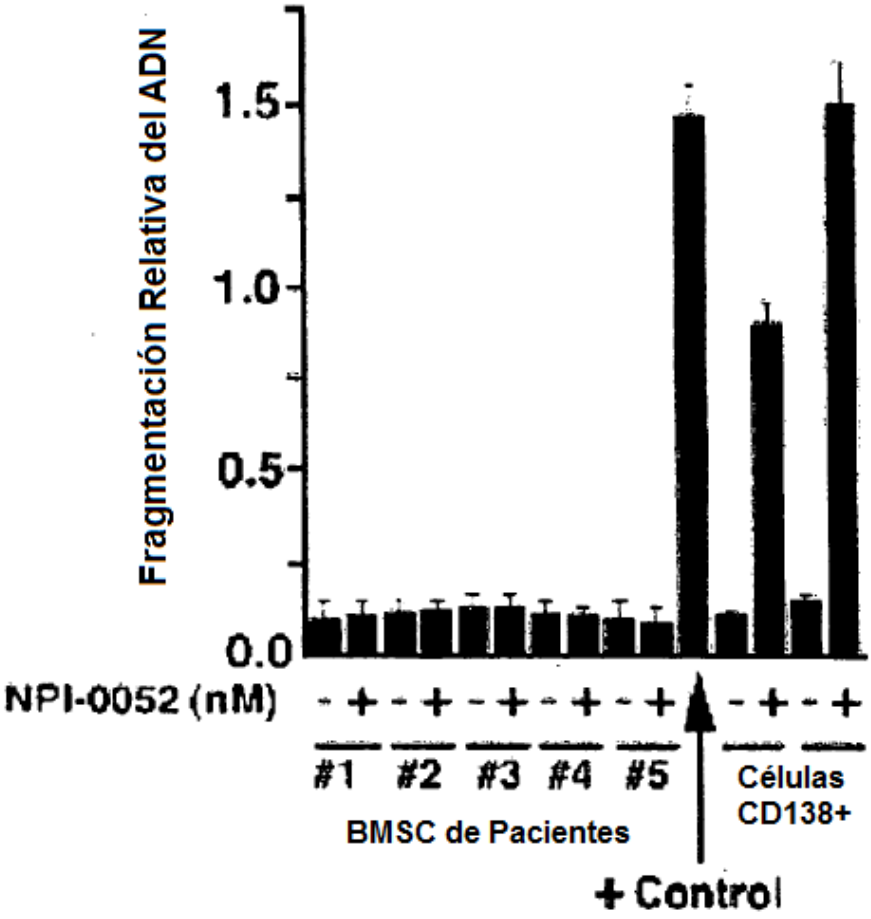

Fragmentación Relativa del ADN
1.5
1.0
0.5
0.0
NPI-0052 (nM)
- + - + - + - + - + - + - +
#1
#2
#3
#4
#5
BMSC de Pacientes
Células CD138+
+ Control

FIGURA 7

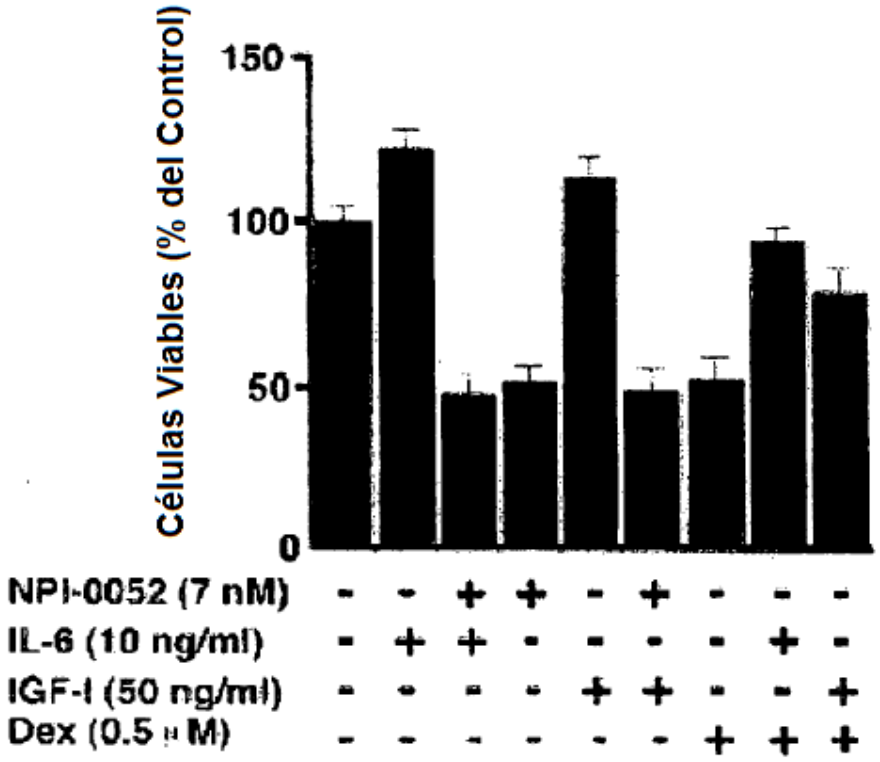

Células Viables (% del Control)
150
100
50
0
NPI-0052 (7 nM) - - + + - + - - -
IL-6 (10 ng/ml) - + + - - - - + -
IGF-I (50 ng/ml) - - - - + + - - +
Dex (0.5 μM) - - - - - - + + +

FIGURA 8

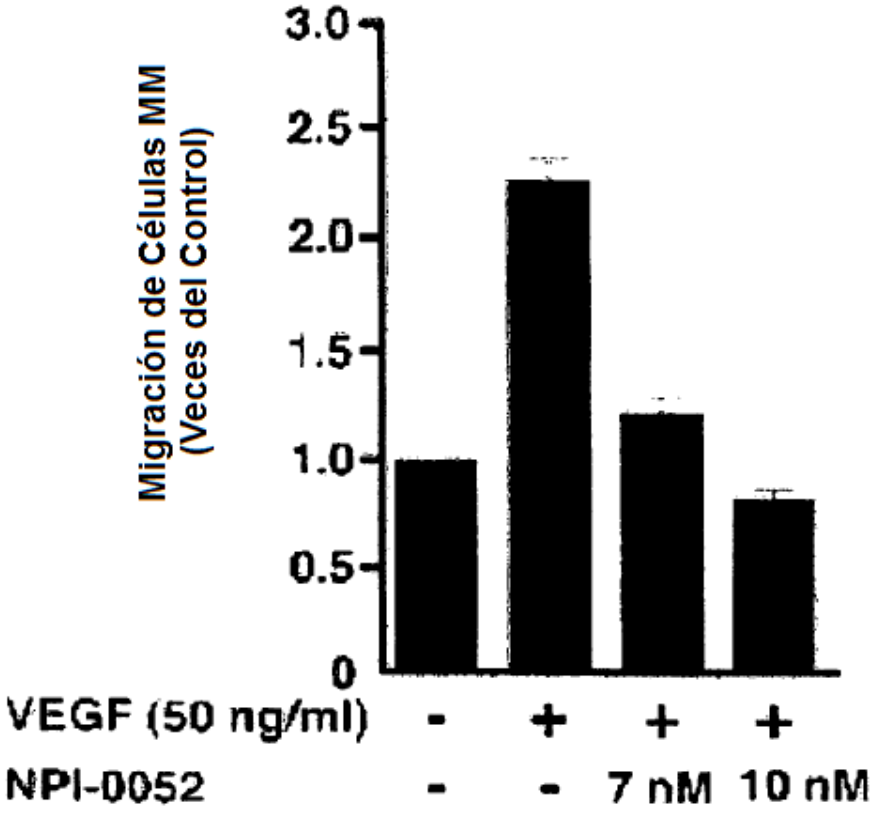

Migración de Células MM
(Veces del Control)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
VEGF (50 ng/ml) - + + +
NPI-0052 - - 7 nM 10 nM

FIGURA 9

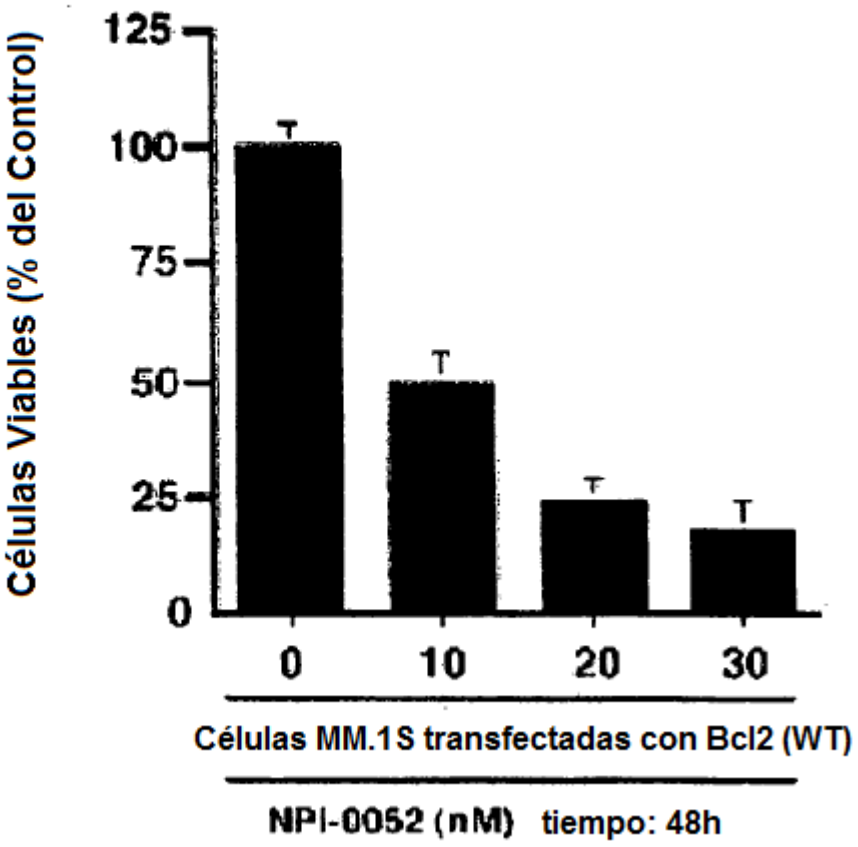

Células Viables (% del Control)
125
100
75
50
25
0
0
10
20
30
Células MM.1S transfectadas con Bcl2 (WT)
NPI-0052 (nM) tiempo: 48h

FIGURA 10A

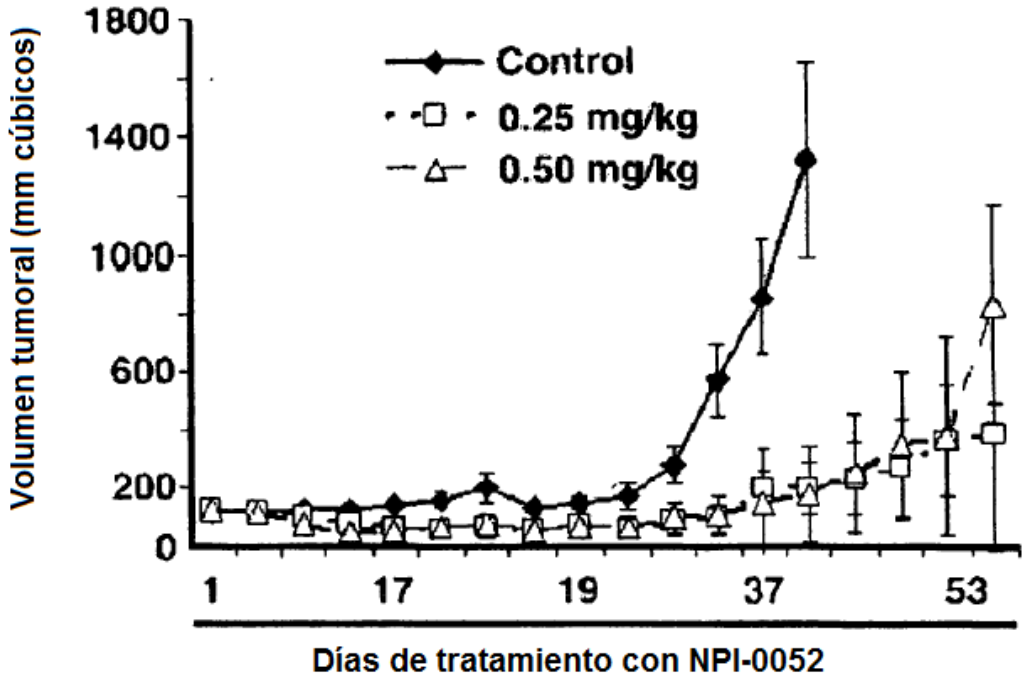

Volumen tumoral (mm cúbicos)
1800
1400
1000
600
200
0
Control
0.25 mg/kg
0.50 mg/kg
1
17
19
37
53
Días de tratamiento con NPI-0052

FIGURA 10B

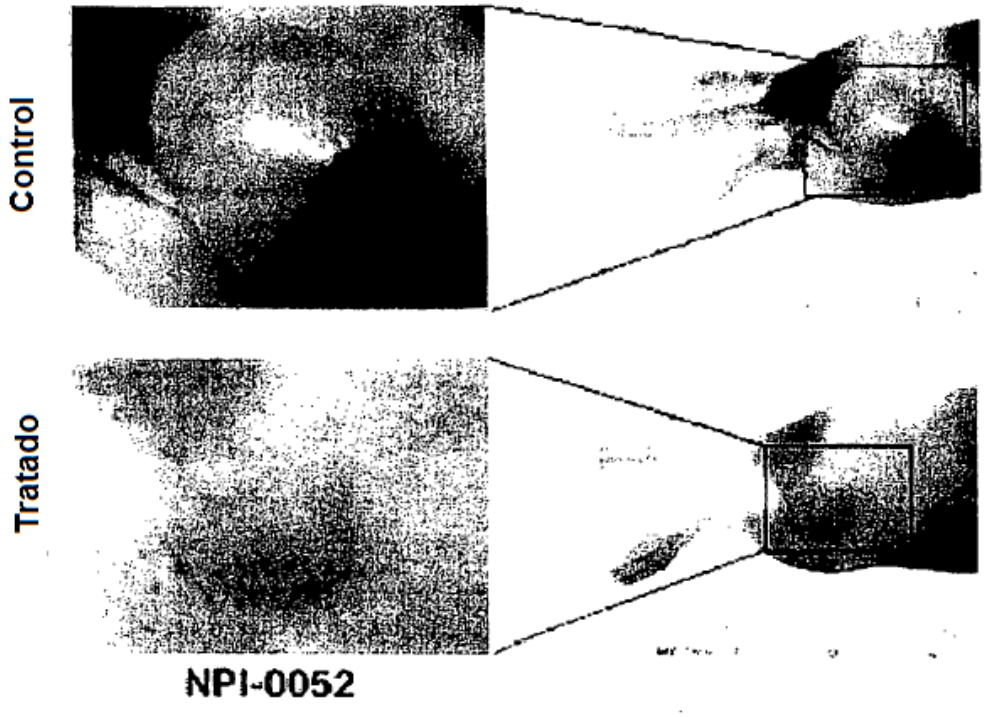


FIGURA 10C

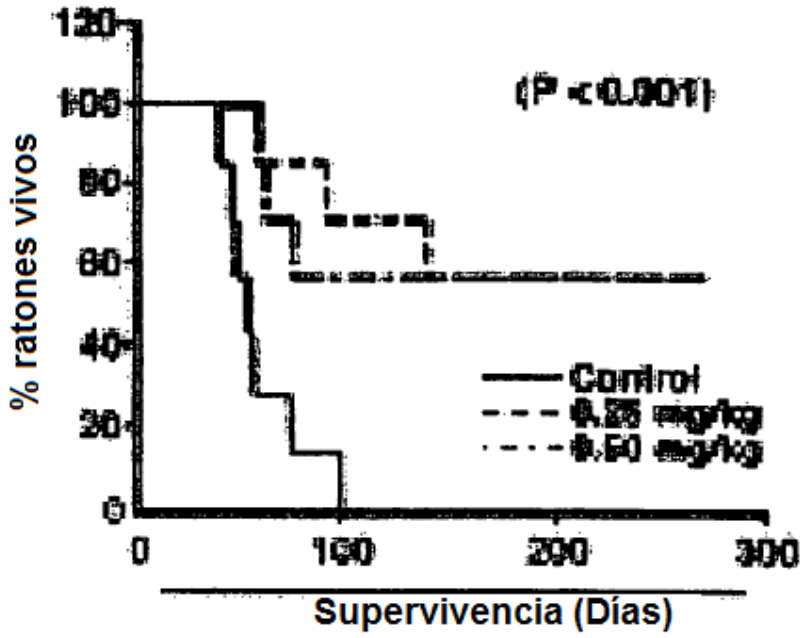

% ratones vivos
120
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
Supervivencia (Días)
(P <0.001)
Control

FIGURA 10D

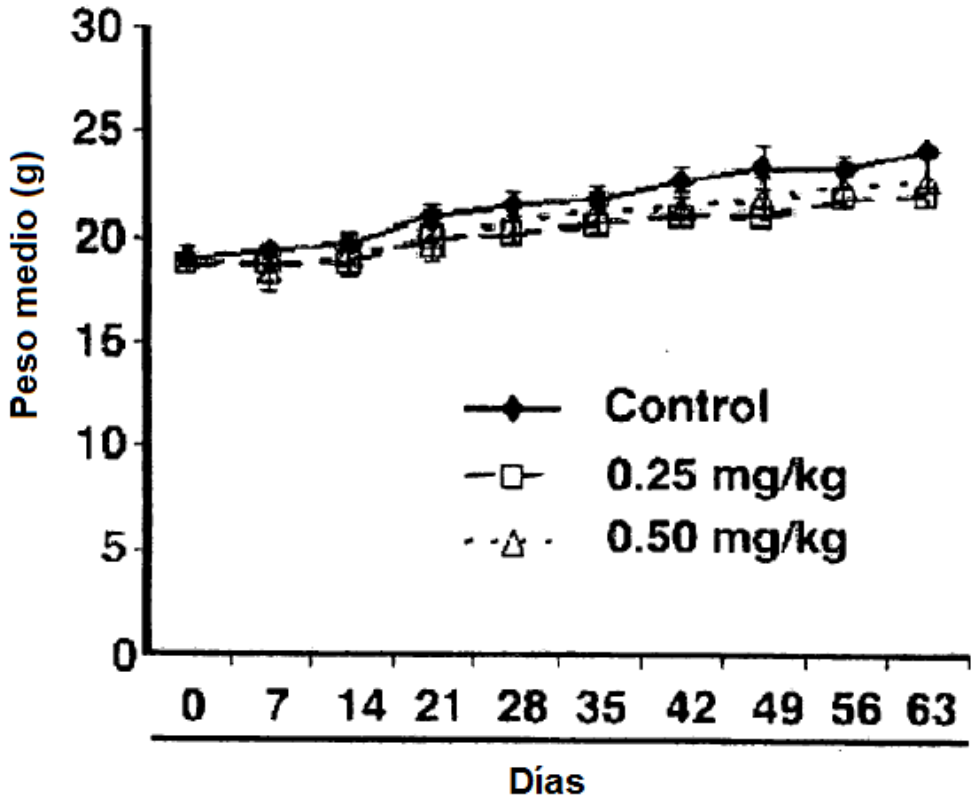

30
25
20
15
10
5
0
Peso medio (g)
Control
0.25 mg/kg
0.50 mg/kg
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Días

**FIGURA 10E**

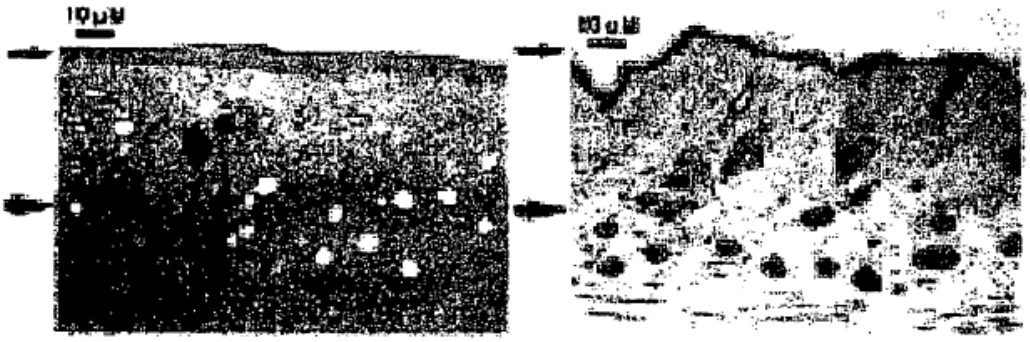


FIGURA 10F

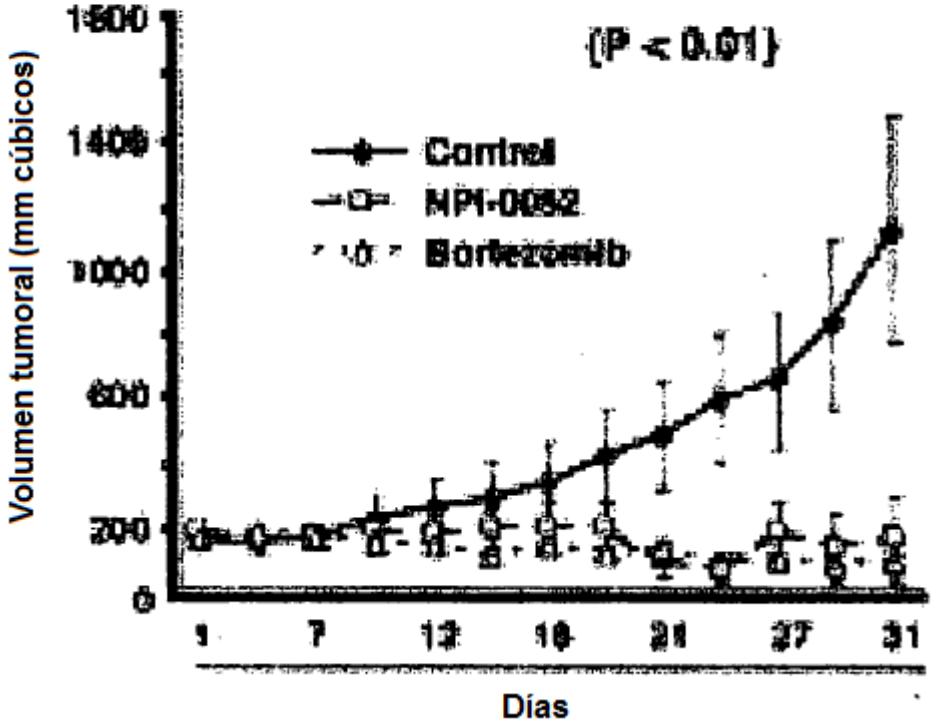

(P < 0.01)
Control
NPI-0052
Bortezomib
Volumen tumoral (mm cúbicos)
1600
1400
1000
600
200
0
1
7
13
19
21
27
31
Días

FIGURA 10G

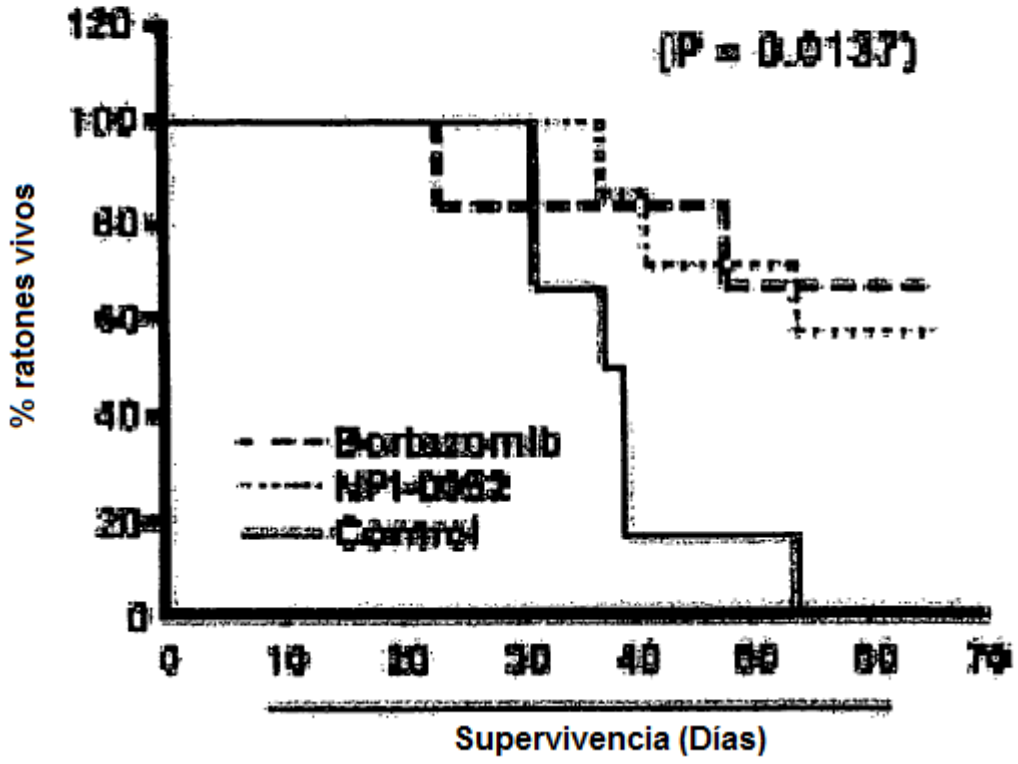

(P = 0.0137)
% ratones vivos
120
100
80
60
40
20
0
Bortezomib
NPI-0052
Control
0
10
20
30
40
50
60
70
Supervivencia (Días)

FIGURA 11A

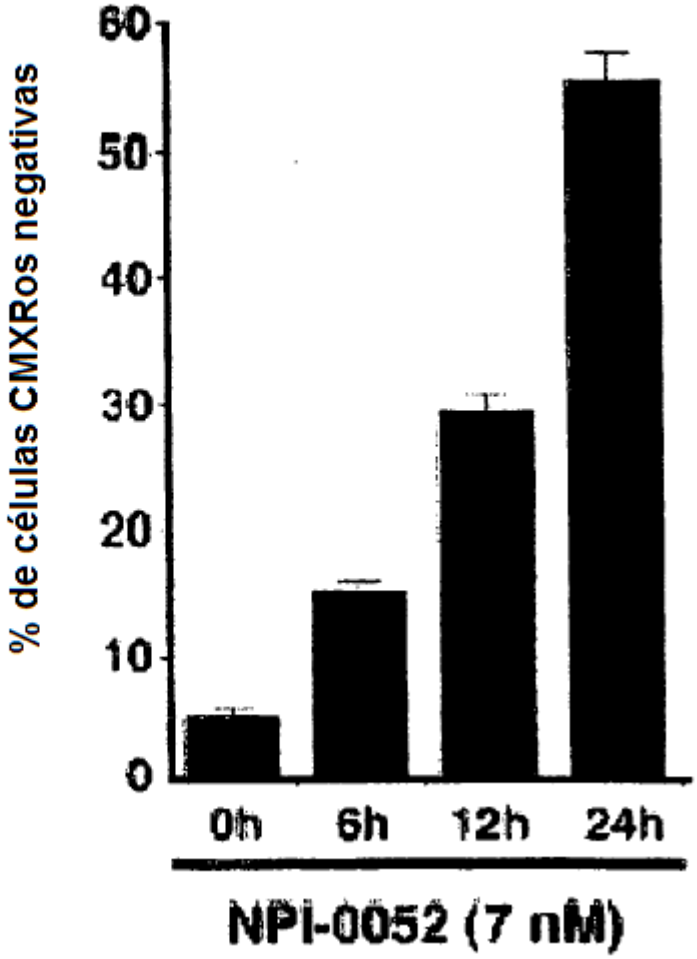

% de células CMXRos negativas
60
50
40
30
20
10
0
0h
6h
12h
24h
NPI-0052 (7 nM)

FIGURA 11B

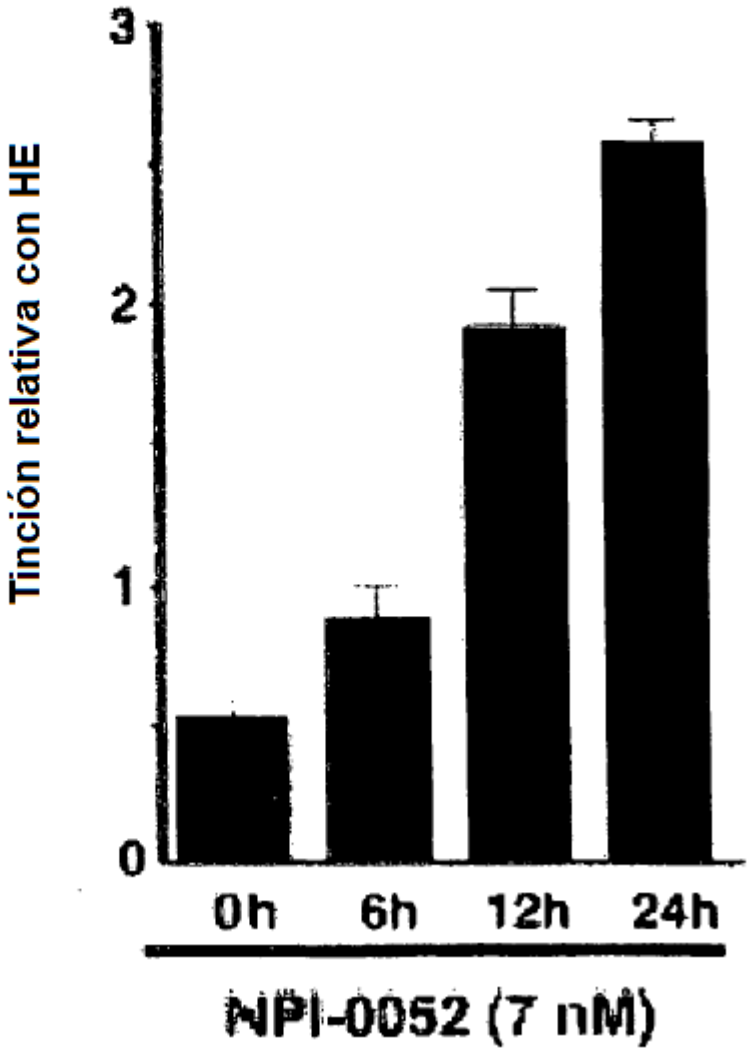


FIGURA 11C

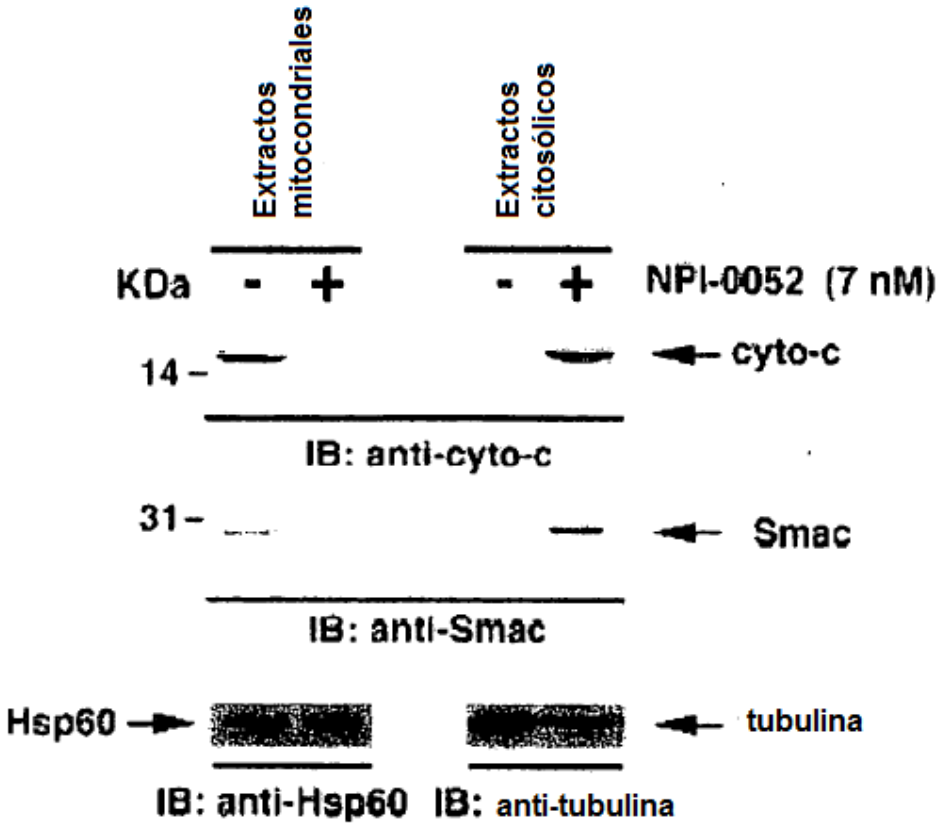

Extractos mitocondriales
Extractos citosólicos
KDa
-
+
-
+
NPI-0052 (7 nM)
14 –
cyto-c
IB: anti-cyto-c
31 –
Smac
IB: anti-Smac
Hsp60
tubulina
IB: anti-Hsp60
IB: anti-tubulina

FIGURA 11D

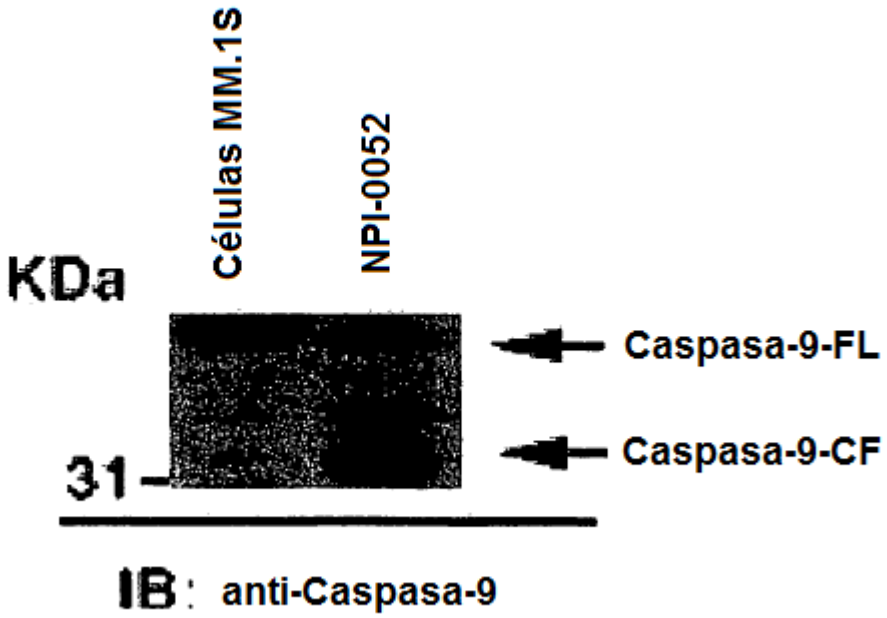

Células MM.1S
NPI-0052
KDa
Caspasa-9-FL
Caspasa-9-CF
31
IB: anti-Caspasa-9

FIGURA 11E

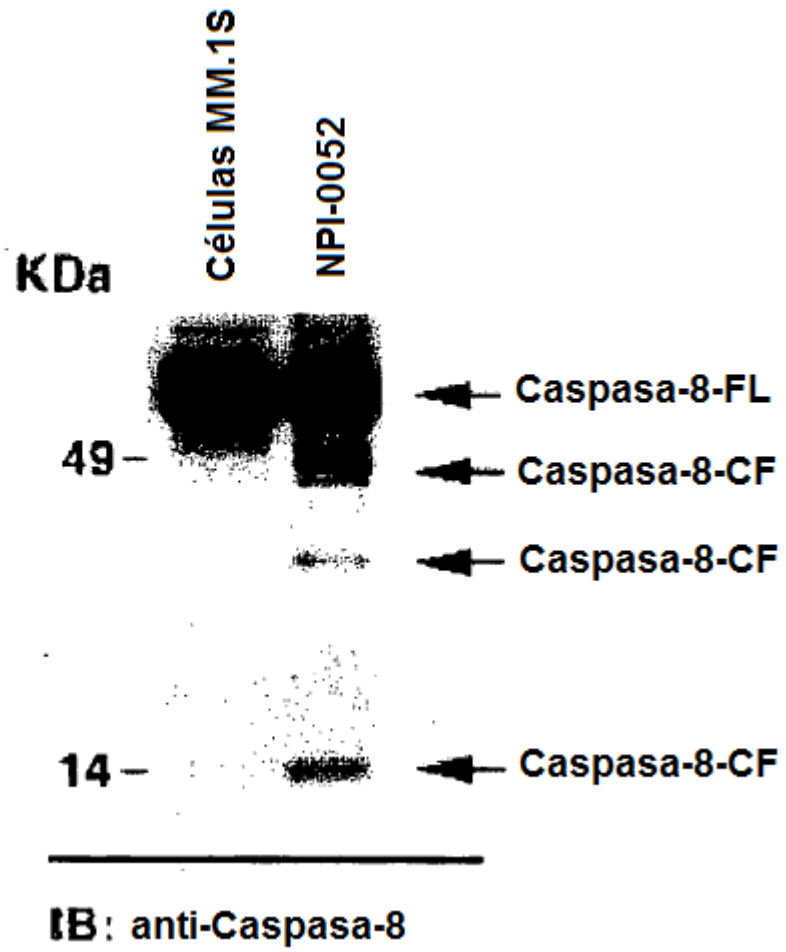

Células MM.1S
NPI-0052
KDa
49
14
Caspasa-8-FL
Caspasa-8-CF
Caspasa-8-CF
Caspasa-8-CF
IB: anti-Caspasa-8

FIGURA 11F

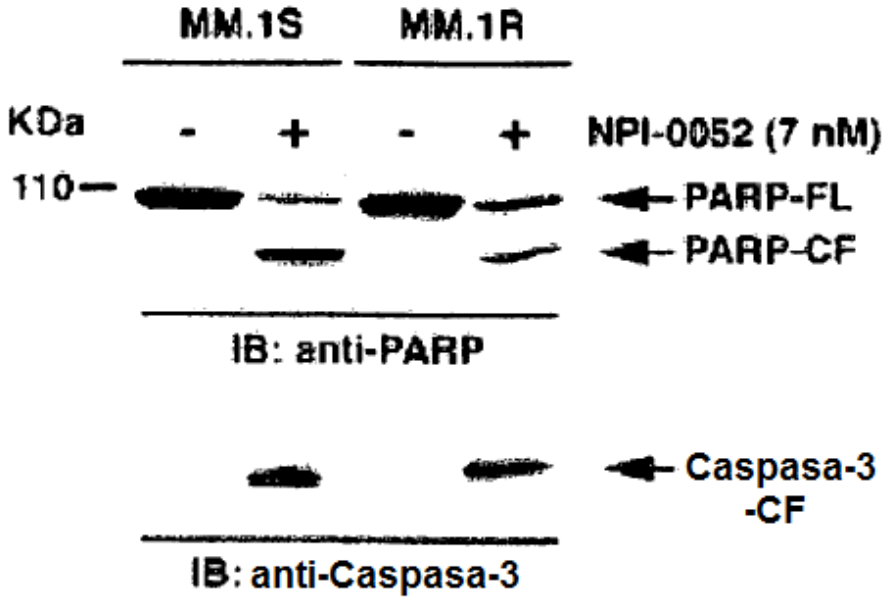

MM.1S
MM.1R
KDa
-
+
-
+
NPI-0052 (7 nM)
110
PARP-FL
PARP-CF
IB: anti-PARP
Caspasa-3
-CF
IB: anti-Caspasa-3

FIGURA 12A

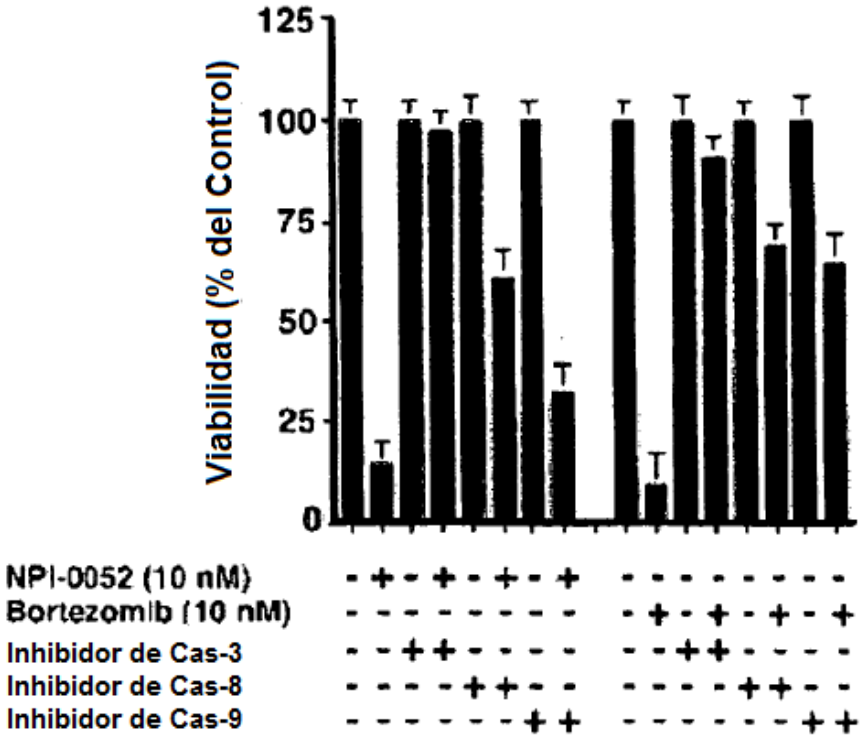

Viabilidad (% del Control)
125
100
75
50
25
0
NPI-0052 (10 nM)
Bortezomib (10 nM)
Inhibidor de Cas-3
Inhibidor de Cas-8
Inhibidor de Cas-9

FIGURA 12B

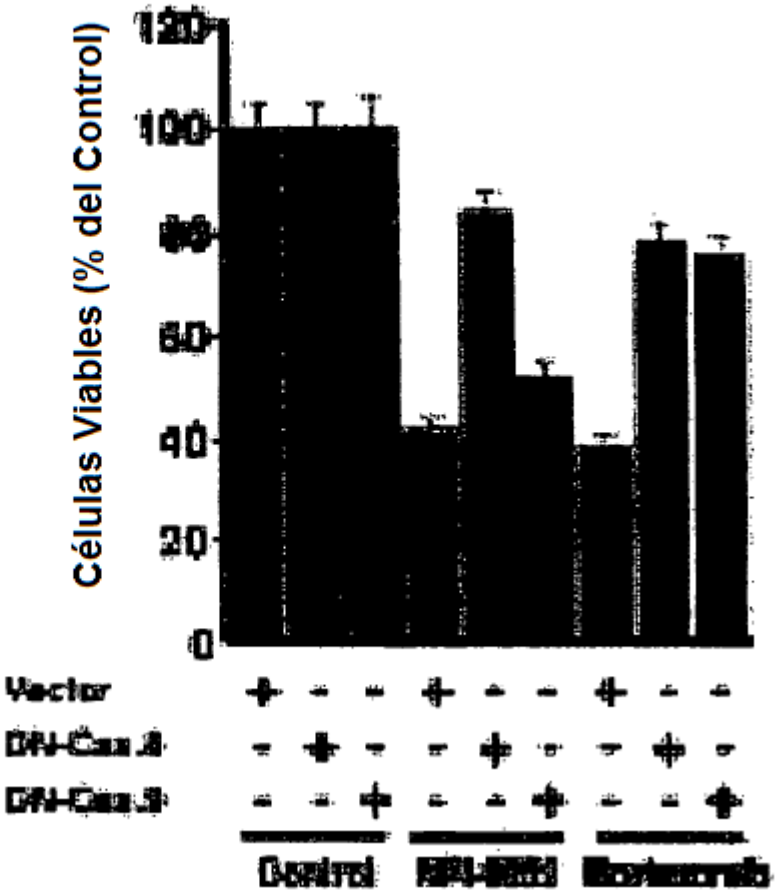

Células Viables (% del Control)
120
100
80
60
40
20
0
Vector
DN-Cas 8
DN-Cas 9
Control

FIGURA 12C

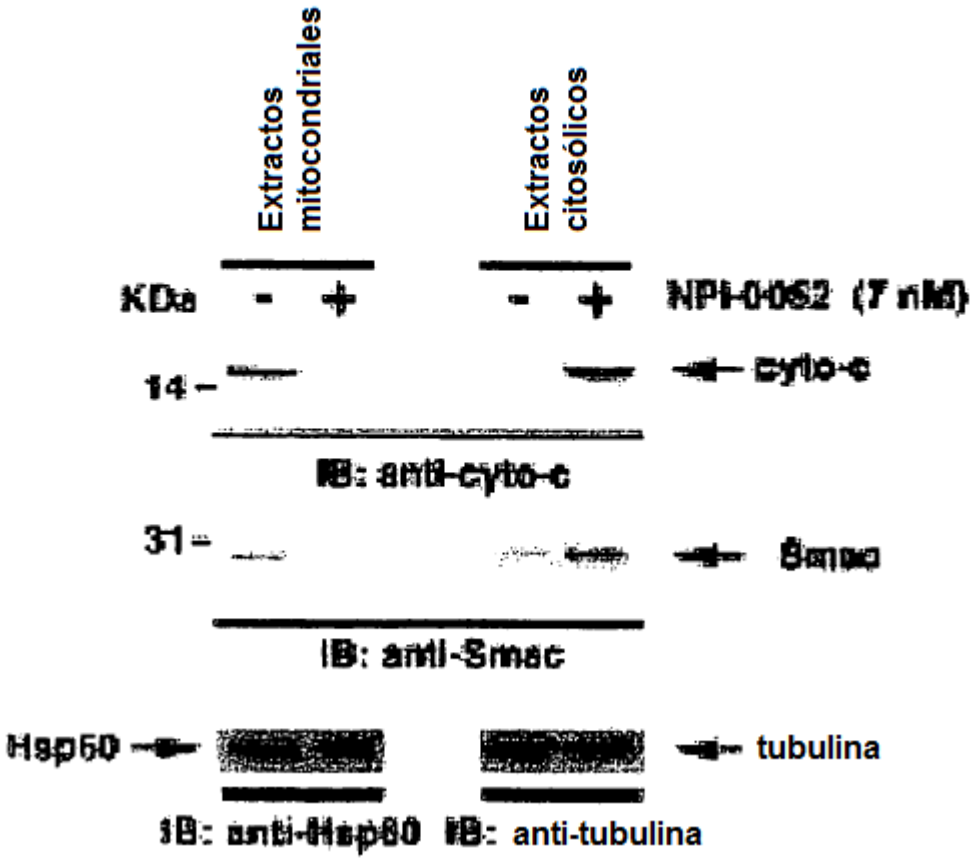

Extractos mitocondriales
Extractos citosólicos
KDa
-
+
-
+
NPI-0052 (7 nM)
14 –
cyto-c
IB: anti-cyto-c
31 –
Smac
IB: anti-Smac
Hsp60
tubulina
IB: anti-Hsp60
IB: anti-tubulina

FIGURA 12D

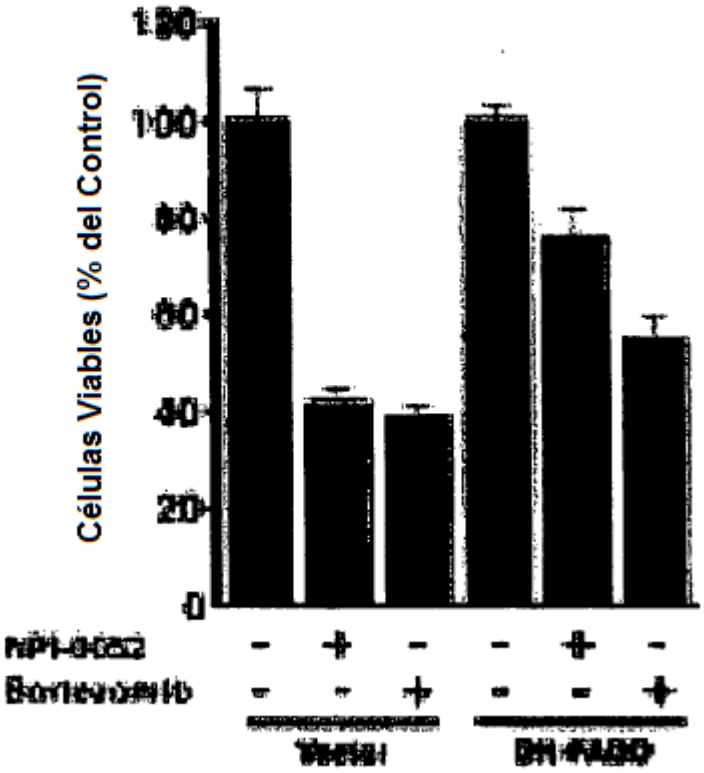


FIGURA 12E

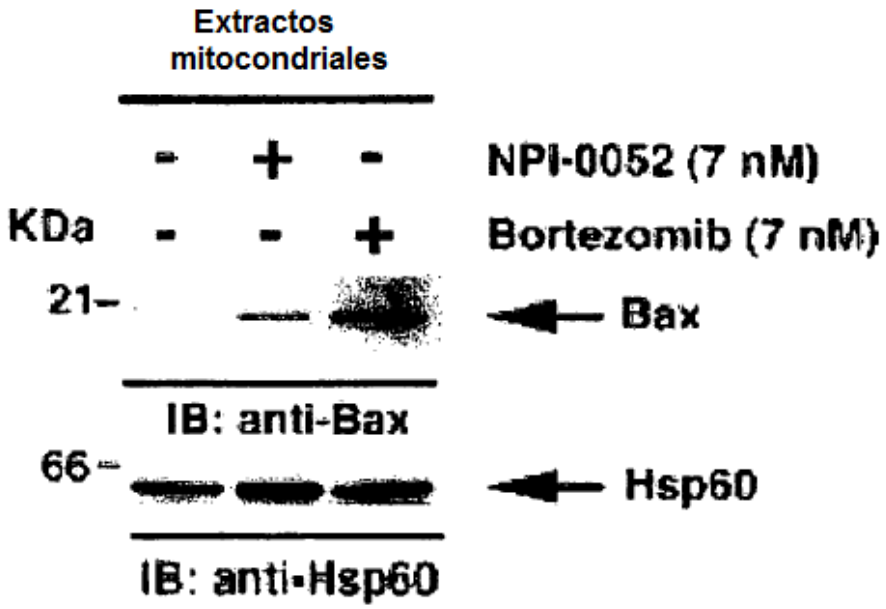

Extractos mitocondriales
- + -
NPI-0052 (7 nM)
KDa
- - +
Bortezomib (7 nM)
21–
Bax
IB: anti-Bax
66–
Hsp60
IB: anti-Hsp60

FIGURA 12F

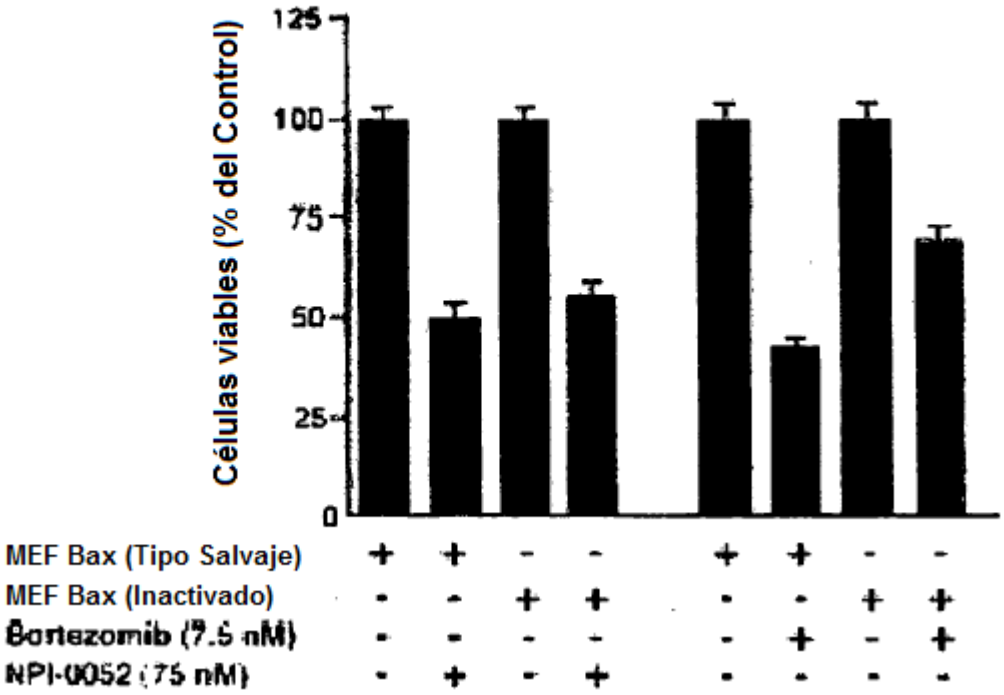

Células viables (% del Control)
125
100
75
50
25
0
MEF Bax (Tipo Salvaje) + + - - + + - -
MEF Bax (Inactivado) - - + + - - + +
Bortezomib (7.5 nM) - - - - - + - +
NPI-0052 (75 nM) - + - + - - - -

FIGURA 13

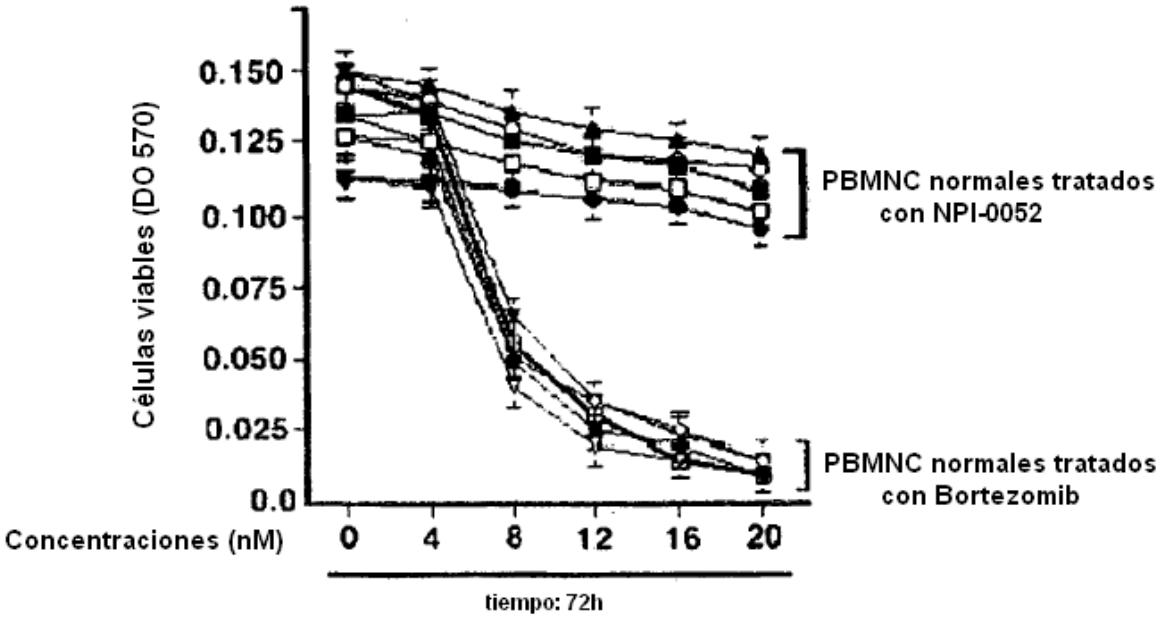

Células viables (DO 570)
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.0
Concentraciones (nM)
0
4
8
12
16
20
tiempo: 72h
PBMNC normales tratados con NPI-0052
PBMNC normales tratados con Bortezomib

**FIGURA 14A**

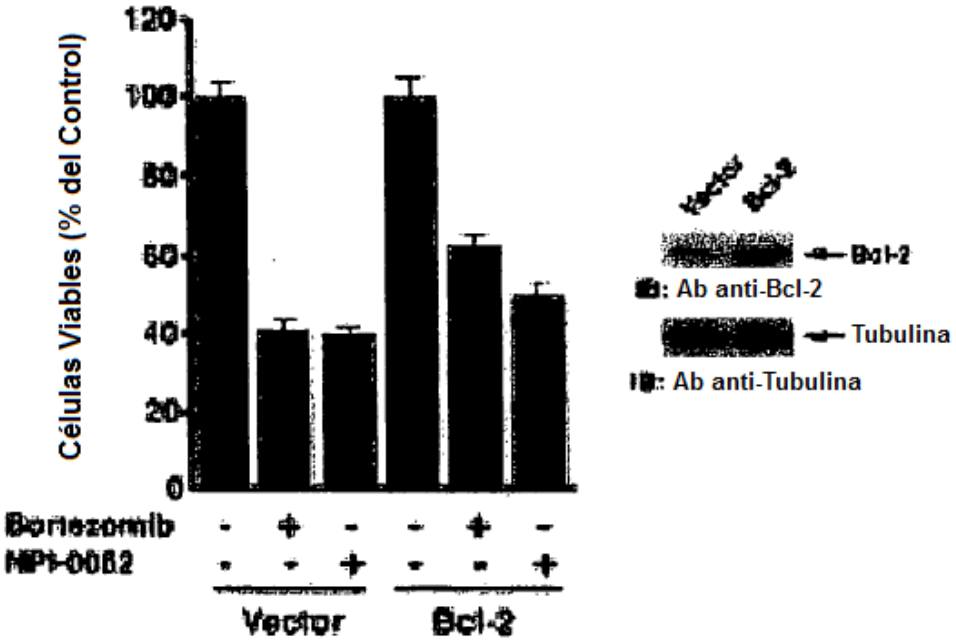

Células Viables (% del Control)
120
100
80
60
40
20
0
Bortezomib
NPI-0052
Vector
Bcl-2
Bcl-2
Ab anti-Bcl-2
Tubulina
Ab anti-Tubulina

FIGURA 14B

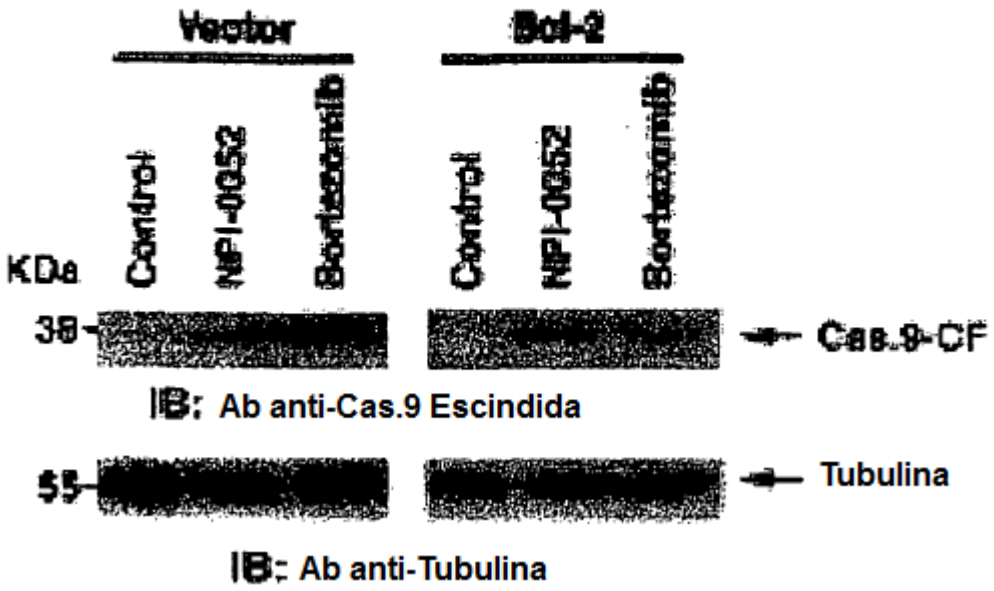
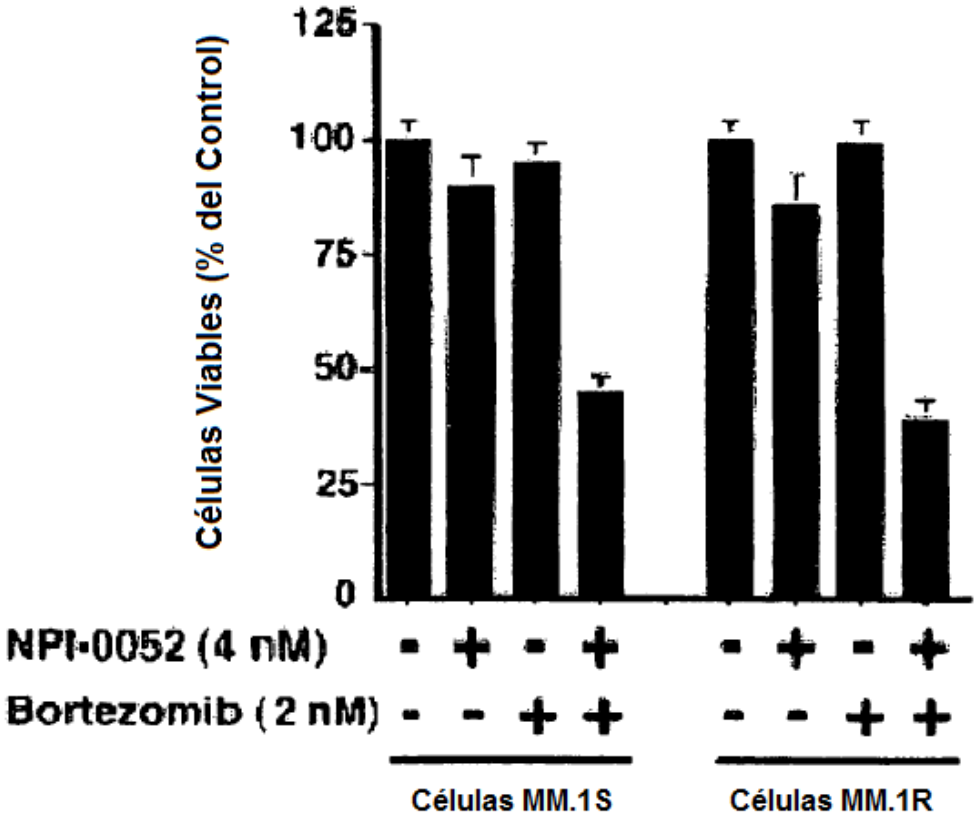

Vector
Bcl-2
Control
NPI-0052
Bortezomib
Control
NPI-0052
Bortezomib
KDa
38
Cas.9-CF
IB: Ab anti-Cas.9 Escindida
55
Tubulina
IB: Ab anti-Tubulina

FIGURA 15


Células Viables (% del Control)
125
100
75
50
25
0
NPI-0052 (4 nM)
Bortezomib (2 nM)
Células MM.1S
Células MM.1R